

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 892 627**

(51) Int. Cl.:

A01N 63/25 (2010.01)
A61K 35/742 (2015.01)
C07K 14/415 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2016 PCT/US2016/048714**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17035364**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2016 E 16840130 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3349582**

(54) Título: **Proteínas inhibidoras de insectos novedosas**

(30) Prioridad:

27.08.2015 US 201562210737 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.02.2022

(73) Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard. Mail Zone E1nA
St. Louis, MO 63167, US**

(72) Inventor/es:

**BOWEN, DAVID J.;
CHAY, CATHERINE A.;
CICHE, TODD A.;
KESANAPALLI, UMA R. y
LUTKE, JENNIFER L.**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 892 627 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas inhibidoras de insectos novedosas

Referencia a solicitud relacionada

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/210.737, presentada el 27 de agosto de 2015.

Listado de secuencias

10 El archivo de nombre "38-21_61627US0001SEQLISTING_ST25.txt" que contiene un formulario legible por ordenador del listado de secuencias se creó el 3 de agosto de 2016. Este archivo es de 94 508 bytes (según lo medido en MS-Windows®), se presentó a la vez mediante presentación electrónica (utilizando el sistema de presentación EFS-Web de la Oficina de Patentes de los Estados Unidos).

Campo de la invención

15 La invención hace referencia, en términos generales, al campo de las proteínas inhibidoras de insectos. Se describe una clase novedosa de proteínas que presenta actividad inhibidora de insectos contra plagas relevantes en la agricultura de plantas de cultivo y semillas. En particular, la clase de proteínas descrita es activa como insecticida contra plagas relevantes en la agricultura de plantas de cultivo y semillas, particularmente especies de lepidópteros de plagas de insectos. Se proporcionan plantas, partes de plantas y semillas que contienen una construcción de polinucleótidos recombinantes que codifica una o más de las toxinas proteicas descritas.

Antecedentes de la invención

20 Mejorar el rendimiento de cultivo de plantas significativas desde el punto de vista agrícola, las cuales incluyen, entre otras, maíz, soja, caña de azúcar, arroz, trigo, verduras y algodón, se ha vuelto cada vez más importante. Además de la necesidad de cultivar productos agrícolas para alimentar, vestir y proporcionar energía a una población humana creciente, se predice que los efectos relacionados con el clima y la presión de la población creciente para usar la tierra para fines diferentes de las prácticas agrícolas reducirán la cantidad de tierra disponible para el cultivo. Estos factores han llevado a pronósticos negativos respecto a la seguridad del alimento, particularmente en ausencia de mejoras 25 importantes en la biotecnología vegetal y las prácticas agronómicas. A la vista de estas presiones, las mejoras sostenibles desde el punto de vista ambiental en tecnología, técnicas agrícolas y el manejo de plagas son herramientas vitales para expandir la producción de cultivos en la cantidad limitada de tierra arable disponible para el cultivo.

30 Los insectos, particularmente los insectos del orden de lepidópteros y coleópteros, se consideran una causa principal de daño a los campos de cultivo, lo cual reduce el rendimiento de cultivo en las áreas infestadas. Las especies de plagas de lepidópteros que afectan negativamente la agricultura incluyen, de modo no taxativo, gusano soldado africano (*Spodoptera exempta*), gusano cortador grasiendo (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodonero (*Alabama argillacea*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), cogollero del maíz resistente a Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (OWB, *Helicoverpa armigera*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano gris del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como gusano defoliador), gusano trozador occidental del frijol (*Striacosta albicosta*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

40 Históricamente, la aplicación intensiva de insecticidas químicos sintéticos era considerada como un agente de control de plagas en la agricultura. Las preocupaciones por el medioambiente y la salud humana, además de los problemas emergentes de resistencia, estimularon la investigación y desarrollo de pesticidas biológicos. Este esfuerzo de investigación llevó al descubrimiento y uso progresivo de varias especies microbianas entomopatógenas, inclusive bacterias.

45 El paradigma de control biológico cambió cuando se descubrió el potencial de bacterias entomopatógenas, especialmente las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, y se desarrolló como un agente de control de plagas biológicas. Se han usado cepas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) como fuente de proteínas pesticidas, dado que se descubrió que las cepas de *Bt* presentan una toxicidad elevada contra insectos específicos. Se conoce que las cepas de *Bt* producen delta-endotoxinas que están localizadas dentro de cuerpos de inclusión cristalinos paraesporales al comienzo de la esporulación y durante la fase de crecimiento estacionario (por ejemplo, proteínas Cry), y también se conoce que producen proteínas insecticidas secretadas. Cuando son ingeridas por un insecto susceptible, las delta-endotoxinas, así como las toxinas secretadas, ejercen sus efectos en la superficie del epitelio del intestino medio y rompen la membrana celular, lo cual lleva a la ruptura y muerte de la célula. Los genes que codifican proteínas insecticidas también se han identificado en especies bacterianas que no son *Bt*, inclusive otros *Bacillus* y una diversidad de especies bacterianas adicionales, tales como *Brevibacillus laterosporus*, *Lysinibacillus sphaericus* ("Ls", conocido anteriormente como *Bacillus sphaericus*) y *Paenibacillus popilliae*.

Las toxinas insecticidas solubles secretadas y cristalinas son altamente específicas para sus hospedadores y han obtenido una aceptación mundial como alternativas a los insecticidas químicos. Por ejemplo, las toxinas proteicas insecticidas se han empleado en varias aplicaciones agrícolas para proteger plantas importantes desde el punto de vista agrícola de infestaciones de insectos, disminuir la necesidad de aplicaciones de pesticidas químicos y aumentar los rendimientos.

5 Las toxinas proteicas insecticidas se usan para controlar plagas relevantes desde el punto de vista agrícola mediante procedimientos mecánicos, tal como aspersión para dispersar formulaciones microbianas que contienen varias cepas bacterianas en la superficie de las plantas, y mediante el uso de técnicas de transformación genética para producir plantas y semillas transgénicas que expresan toxinas proteicas insecticidas.

10 El uso de plantas transgénicas que expresan toxinas proteicas insecticidas se ha adoptado a nivel mundial. Por ejemplo, en 2012, 26,1 millones de hectáreas se plantaron con cultivos transgénicos que expresan toxinas de *Bt* (James, C., Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. Informe ISAAA N.º 44). El uso mundial de cultivos transgénicos protegidos contra insectos y la cantidad limitada de toxinas proteicas insecticidas usadas en esos cultivos ha creado una presión para seleccionar alelos de insectos existentes que imparten resistencia a las proteínas insecticidas utilizadas actualmente.

15 20 25 30 El desarrollo de resistencia en las plagas diana a las toxinas proteicas insecticidas crea una necesidad continua para descubrir y desarrollar nuevas formas de toxinas proteicas insecticidas que sean útiles en el manejo del aumento de la resistencia de los insectos a cultivos transgénicos que expresan toxinas proteicas insecticidas. Nuevas toxinas proteicas con mejor eficacia y que exhiben control sobre un espectro más amplio de especies de insectos susceptibles reducirán la cantidad de insectos supervivientes que pueden desarrollar alelos de resistencia. Además, el uso en una planta de dos o más toxinas proteicas insecticidas transgénicas tóxicas para la misma plaga de insectos y que presente modos diferentes de acción reduce la probabilidad de resistencia en cualquier especie de insecto diana individual.

Por lo tanto, los inventores describen en la presente una familia de toxinas proteicas novedosa de *Paenibacillus popilliae* junto con toxinas proteicas similares, proteínas variantes y ejemplos de proteínas recombinantes que presentan actividad insecticida contra especies de lepidópteros diana, particularmente contra gusano soldado africano (*Spodoptera exempta*), gusano cortador grasiendo (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodonero (*Alabama argillacea*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), cogollero del maíz resistente a Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (OWB, *Helicoverpa armigera*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano gris del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como gusano defoliador), gusano trozador occidental del frijol (*Striacosta albicosta*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

Sumario de la invención

35 En la presente se describe un grupo novedoso de proteínas pesticidas con actividad inhibidora de insectos (toxinas proteicas), denominadas en la presente TIC6757, TIC7472 y TIC7473 que pertenecen a la clase de toxinas proteicas TIC6757, que se demostró que exhiben actividad inhibidora contra una o más plagas de plantas de cultivo. La proteína TIC6757 y las proteínas en la clase de toxinas proteicas TIC6757 se pueden usar solas o junto con otras proteínas insecticidas y agentes tóxicos en formulaciones e *in planta*, lo que proporciona alternativas a las proteínas insecticidas y químicos insecticidas que actualmente se usan en los sistemas agrícolas.

40 45 50 55 60 En una modalidad, en la presente solicitud se describe una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un fragmento promotor heterólogo unido operativamente a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o fragmento de esta, donde (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, o 95 %, o 98 %, o 99 % o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18; o (d) dicho segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o un fragmento de este comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 90 %, o 95 %, o 98 %, o 99 %, o alrededor de 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17 o (e) dicha molécula de ácido nucleico recombinante se une de manera operativa con un vector, y dicho vector se selecciona del grupo que consiste en un plásmido, fagémido, bácmido, cósmido y un cromosoma artificial de levadura o bacteriano. La molécula de ácido nucleico recombinante puede comprender una secuencia que funciona para expresar la proteína pesticida en una planta, o se expresa en una célula vegetal para producir una cantidad eficaz como pesticida de la proteína pesticida.

55 60 En otra modalidad de la presente solicitud hay células hospedadoras que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante de la solicitud, donde la célula hospedadora se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana y una célula vegetal. Las células hospedadoras bacterianas contempladas incluyen *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Erwinia*. En determinadas modalidades, dicha especie de *Bacillus* es *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, dicho *Brevibacillus* es *Brevibacillus laterosporous*, o dicha *Escherichia* es *Escherichia coli*. Las células hospedadoras vegetales contempladas incluyen

una célula vegetal dicotiledónea y una célula vegetal monocotiledónea. Las células vegetales contempladas incluyen además una célula vegetal de alfalfa, plátano, cebada, judía, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, yuca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón (*Gossypium sp.*), una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino taeda, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto forrajero, guisante, cacahuete, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rábano, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo.

En otra modalidad, la proteína pesticida presenta actividad contra insectos lepidópteros, que incluye oruga del frijol terciopelo, taladro de la caña de azúcar, gusano barrenador del tallo inferior del maíz, gusano elotero, oruga del tabaco, lagarta verde, gusano soldado africano, gusano meridional, cogollero de maíz, gardama, oruga del viejo mundo, gusano defoliador, gusano rosado, gusano cortador grasiendo, barrenador del maíz del suroeste, gusano medidor de la hoja del algodonero, palomilla dorso de diamante, gusano de cápsula moteado, gusano gris del tabaco, gusano trozador occidental del frijol y taladro del maíz.

También se contemplan en la presente solicitud plantas que comprenden una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un fragmento promotor heterólogo unido de manera operativa a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida o un fragmento de esta, donde: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18; o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, o 95 %, o 98 %, o 99 % o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18; (d) dicha planta presenta una cantidad detectable de dicha proteína pesticida. En determinadas modalidades, la proteína pesticida comprende la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18. En una modalidad, la planta es una planta dicotiledónea o una planta monocotiledónea. En otra modalidad, la planta se selecciona además del grupo que consiste en alfalfa, plátano, cebada, judía, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, yuca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino taeda, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto forrajero, guisante, cacahuete, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rábano, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo.

En modalidades adicionales, se describen las semillas que comprenden las moléculas de ácido nucleico recombinantes.

En otra modalidad, se contempla una composición inhibidora de insecto que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente solicitud. La composición inhibidora de insectos puede comprender además una secuencia de nucleótidos que codifica al menos otro agente pesticida distinto de dicha proteína pesticida. En determinadas modalidades, al menos otro agente pesticida se selecciona del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, una molécula de ARNbc inhibidora de insectos y una proteína auxiliar. También se contempla que al menos otro agente pesticida en la composición inhibidora de insectos presente actividad contra una o más especies de plagas de los órdenes de lepidópteros, coleópteros o hemípteros. En una modalidad, el al menos otro agente pesticida en la composición inhibidora de insectos se selecciona del grupo que consiste en Cry1A, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B, Cry1C, variantes de Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, quimeras de Cry1A/F, Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, Cry2A, Cry2Ab, Cry2Ae, Cry3, variantes de Cry3A, Cry3B, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry34, Cry35, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET29, ET33, ET34, ET35, ET66, ET70, TIC400, TIC407, TIC417, TIC431, TIC800, TIC807, TIC834, TIC853, TIC900, TIC901, TIC1201, TIC1415, TIC2160, TIC3131, TIC836, TIC 860, TIC 867, TIC869, TIC1100, VIP3A, VIP3B, VIP3Ab, AXMI-AXMI-, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100, AXMI-115, AXMI-113 y AXMI-005, AXMI134, AXMI-150, AXMI-171, AXMI-184, AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209, AXMI-205, AXMI-218, AXMI-220, AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z y AXMI-225z, AXMI-238, AXMI-270, AXMI-279, AXMI-345, AXMI-335, AXMI-R1 y variantes de estos, IP3 y variantes de estos, DIG-3, DIG-5, DIG-10, DIG-657 y una proteína de DIG-11.

También se contemplan productos básicos que comprenden una cantidad detectable de las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente solicitud. Dichos productos básicos incluyen maíz envasado por una empresa de comercialización de granos, copos de maíz, tortas de maíz, harina de maíz, maíz triturado, jarabe de maíz, aceite de maíz, forraje de maíz, almidón de maíz, cereal de maíz, y similares, y productos básicos de soja, arroz, trigo, sorgo, guandú, cacahuete, fruta, melón y vegetales correspondientes que incluyen, cuando corresponda, zumos, concentrados, conservas, jaleas, mermeladas, y otras formas comestibles de dichos productos básicos que contienen una cantidad detectable de dichos polinucleótidos y/o polipéptidos de la presente solicitud, semilla de algodón entera o procesada, aceite de algodón, hila, semillas y partes de planta procesadas para alimento, fibra, papel, biomasa, y productos de combustible como combustible derivado de aceite o sedimentos de algodón derivados de desecho de fibras de algodón, semilla de soja entera o procesada, aceite de soja, proteína de soja, soja triturada, harina de soja, copos de soja, salvado de soja, leche de soja, queso de soja, vino de soja, alimento para animales que comprende soja, papel que comprende soja, crema que comprende soja, biomasa de soja, y productos de combustible producidos

con plantas de soja y partes de planta de soja.

También se describe en la presente solicitud un procedimiento para producir una semilla que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente solicitud. El procedimiento comprende plantar al menos una de la semilla que comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en la presente solicitud; cultivar una planta a partir de la semilla; y cosechar una semilla a partir de las plantas, donde la semilla cosechada comprende las moléculas de ácido nucleico recombinantes en la presente solicitud.

En otra modalidad ilustrativa, se provee una planta resistente a infestación de insectos, donde las células de dicha planta comprenden: (a) una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una cantidad eficaz como insecticida de una proteína pesticida que se establece en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18; o (b) una cantidad eficaz como insecticida de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos o 90 %, o 95 %, o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: :4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18.

También se desvelan en la presente solicitud los procedimientos para controlar una plaga de especie de lepidópteros, y controlar una infestación de plaga de especie de lepidópteros de una planta, particularmente una planta de cultivo. En una modalidad, el procedimiento comprende (a) poner en contacto la plaga con una cantidad eficaz como insecticida de una proteína pesticida que se establece en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18; o (b) poner en contacto la plaga con una cantidad eficaz como insecticida de una o más proteínas pesticidas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, o 95 %, o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 o la SEQ ID NO: 18.

Además, en la presente se desvela un procedimiento para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o un fragmento de esta, en el que: (a) dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18 o (b) dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 %, o 95 % o 98 %, o 99 % o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18 o (c) dicho segmento de polinucleótidos se hibrida con un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17. El procedimiento desvelado comprende poner una muestra de ácidos nucleicos en contacto con una sonda de ácido nucleico que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con ADN genómico de una planta que comprende un segmento de polinucleótidos que codifica una proteína pesticida o un fragmento de este provisto en la presente y que no se hibrida en dichas condiciones de hibridación con ADN genómico de una planta isogénica que no comprende el segmento, donde la sonda es homóloga o complementaria a SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:17, o una secuencia que codifica una proteína pesticida que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 %, o 95 %, o 98 %, o 99 % o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18. El procedimiento descrito puede comprender adicionalmente (a) someter la muestra y la sonda a condiciones rigurosas de hibridación y (b) detectar la hibridación de la sonda con ADN de la muestra.

También se desvelan en la presente procedimientos para detectar la presencia de una proteína pesticida o un fragmento de esta en una muestra que comprende una proteína y en el que dicha proteína pesticida comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 90 %, o 95 % o 98 %, o 99 % o alrededor de 100 % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16 o SEQ ID NO:18. En una modalidad, el procedimiento desvelado comprende: (a) poner una muestra en contacto con un anticuerpo inmunorreactivo y (b) detectar la presencia de la proteína. En algunas modalidades, la etapa de detección comprende un ensayo ELISA o de inmunotransferencia Western.

50 Breve descripción de las secuencias

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína pesticida TIC6757 obtenida de una especie de *Paenibacillus popilliae* DSC004343.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC6757.

La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC6757PL diseñada para la expresión en una célula vegetal donde un codón de alanina adicional se inserta inmediatamente después del codón de metionina de inicio.

La SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de TIC6757PL codificada por una secuencia de codificación sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal (SEQ ID NO: 3), y donde un aminoácido de alanina adicional se inserta inmediatamente después de la metionina de inicio.

La SEQ ID NO:5 es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína pesticida TIC6757_His, en la que

una secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de Histidina se encuentra unida de forma operativa en 5' y en un marco con la secuencia que codifica TIC6757.

La SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC6757 His.

La SEQ ID NO:7 es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína pesticida TIC7472 obtenida a partir de la especie *Paenibacillus popilliae* DSC007648.

La SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7242.

La SEQ ID NO:9 es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína pesticida TIC7472_His, en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de Histidina se encuentra unida de forma operativa en 3' y en un marco con la secuencia que codifica TIC7472.

La SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7472_His.

La SEQ ID NO:11 es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína pesticida TIC7473 de un marco abierto de lectura en la posición de nucleótidos 1-2391 y un codón de terminación de la traducción.

La SEQ ID NO:12 es la traducción de la secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7243 obtenida a partir de la especie *Paenibacillus popilliae* DSC008493.

La SEQ ID NO:13 es una secuencia de ácidos nucleicos recombinantes que codifica una proteína pesticida TIC7473_His, en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica una etiqueta de Histidina se encuentra unida de forma operativa en 3' y en un marco con la secuencia que codifica TIC7472.

La SEQ ID NO:14 es la traducción de secuencia de aminoácidos de la proteína pesticida TIC7473_His.

La SEQ ID NO:15 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC7472PL diseñada para la expresión en una célula vegetal donde un codón de alanina adicional se inserta inmediatamente después del codón de metionina de inicio.

La SEQ ID NO:16 es la secuencia de aminoácidos de TIC7472PL codificada por una secuencia codificante sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal (SEQ ID NO:15) donde un aminoácido de alanina adicional se inserta inmediatamente después de la metionina de inicio.

La SEQ ID NO:17 es una secuencia de codificación sintética que codifica una proteína pesticida TIC7473PL diseñada para la expresión en una célula vegetal donde un codón de alanina adicional se inserta inmediatamente después del codón de metionina de inicio.

La SEQ ID NO:18 es la secuencia de aminoácidos de TIC7473PL codificada por una secuencia codificante sintética diseñada para la expresión en una célula vegetal (SEQ ID NO:17) y donde un aminoácido de alanina adicional se inserta inmediatamente después de la metionina de inicio.

Descripción detallada de la invención

El problema en la técnica del control de plagas agrícolas puede caracterizarse como una necesidad de nuevas toxinas proteicas que sean eficaces contra plagas diana, que presenten un amplio espectro de toxicidad contra especies de plagas diana, que sean capaces de expresarse en plantas sin provocar problemas agronómicos indeseables y proporcionen un modo alternativo de acción en comparación con las toxinas actuales que se utilizan en las plantas a nivel comercial.

Las proteínas pesticidas novedosas ejemplificadas por TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL se describen en la presente, y abordan cada una de estas necesidades, particularmente contra un amplio espectro de plagas de insectos lepidópteros, y más particularmente contra gusano soldado africano (*Spodoptera exempta*), gusano cortador grasiendo (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodonero (*Alabama argillacea*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), cogollero del maíz resistente a Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (OWB, *Helicoverpa armigera*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano gris del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como gusano defoliador), gusano trozador occidental del frijol (*Striacosta albicosta*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

La referencia en la presente solicitud a TIC6757, "proteína TIC6757", "toxina proteica TIC6757", "toxina proteica TIC6757", "proteína pesticida TIC6757", "toxinas relacionadas con TIC6757", "toxinas proteicas relacionadas con TIC6757", TIC6757PL, "proteína TIC6757PL", "toxina proteica TIC6757PL", "proteína de toxina TIC6757PL", "proteína pesticida TIC6757PL", "toxinas relacionadas con TIC6757PL", "toxinas proteicas relacionadas con TIC6757PL", TIC7472, "proteína TIC7472", "toxina proteica TIC7472", "proteína pesticida TIC7472", "toxinas relacionadas con TIC7472", "toxinas proteicas relacionadas con TIC7472", TIC7472PL, "proteína TIC7472PL", "toxina proteica TIC7472PL", "proteína de toxina TIC7472PL", "proteína pesticida TIC7472PL", "toxinas relacionadas con TIC7472PL", "toxinas proteicas relacionadas con TIC7472PL", TIC7473, "proteína TIC7473", "toxina proteica TIC7473", "toxina proteica TIC7473", "proteína pesticida TIC7473", "toxinas relacionadas con TIC7473", "toxinas proteicas relacionadas con TIC7473", TIC7473PL, "proteína TIC7473PL", "toxina proteica TIC7473PL", "proteína de toxina TIC7473PL", "proteína pesticida TIC7473PL", "toxinas relacionadas con TIC7473PL", "toxinas proteicas relacionadas con TIC7473PL", y similares, se refiere a cualquier proteína pesticida o proteína inhibidora de insectos novedosa que comprende, consiste en, es sustancialmente homóloga a, es similar a o deriva de cualquier proteína pesticida o secuencia proteica inhibidora de insectos de TIC6757 (SEQ ID NO: 2), TIC6757PL (SEQ ID NO: 4), TIC7472 (SEQ ID NO:8), TIC7472PL (SEQ ID NO:16), TIC7473 (SEQ ID NO:12) o TIC7473PL (SEQ ID NO:18) y

segmentos pesticidas o inhibidores de insectos de estas, o combinaciones de estos, que otorgan actividad contra plagas de lepidópteros, que incluyen cualquier proteína que presenta actividad pesticida o inhibidora de insectos si la alineación de dicha proteína con TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL genera identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción de alrededor de 85 % a alrededor de 100 %. Las proteínas TIC6757 y TIC6757PL incluyen tanto la forma dirigida al plástido como la forma no dirigida al plástido de las proteínas.

El término "segmento" o "fragmento" se usa en esta solicitud para describir secuencias consecutivas de aminoácidos o ácidos nucleicos que son más cortas que la secuencia completa de aminoácidos o ácidos nucleicos que describe una proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. Un segmento o fragmento que presenta actividad inhibidora de insectos también se describe en la presente solicitud si la alineación de dicho segmento o fragmento, con la sección correspondiente de la proteína TIC6757 que se establece en la SEQ ID NO: 2, la proteína TIC6757PL que se establece en la SEQ ID NO: 4, la proteína TIC7472 que se establece en la SEQ ID NO: 8, la proteína TIC7472PL que se establece en la SEQ ID NO: 16, la proteína TIC7473 que se establece en la SEQ ID NO: 12 o la proteína TIC7473PL que se establece en la SEQ ID NO: 18 genera identidad de secuencia de aminoácidos de cualquier porcentaje de fracción de alrededor de 85 a alrededor de 100 por ciento entre el segmento o fragmento y la sección correspondiente de la proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL.

En la presente solicitud, la referencia a los términos "activo" o "actividad", "actividad pesticida", "pesticida" o "actividad insecticida", "inhibidora de insectos" o "insecticida", se refiere a la eficacia de un agente tóxico, tal como una toxina proteica, para inhibir (inhibir el crecimiento, la alimentación, la fecundidad o la viabilidad), suprimir (suprimir el crecimiento, la alimentación, la fecundidad o la viabilidad), controlar (controlar la infestación de plagas, controlar las actividades de alimentación de plagas en un cultivo específico que contiene una cantidad eficaz de la proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL) o destruir (provocar la morbilidad, la mortalidad o la fecundidad reducida de) una plaga. Estos términos pretenden incluir el resultado de proporcionar una cantidad eficaz como pesticida de una proteína tóxica a una plaga donde la exposición de la plaga a la proteína tóxica produce morbilidad, mortalidad, fecundidad reducida o debilitamiento. Estos términos también incluyen la repulsión de la plaga de la planta, un tejido de la planta, una parte de la planta, semilla, células de la planta o de la ubicación geográfica específica donde la planta puede crecer, como resultado de proporcionar una cantidad eficaz como pesticida de la proteína tóxica en o sobre la planta. En general, la actividad pesticida se refiere a la capacidad de una proteína tóxica de ser eficaz para inhibir el crecimiento, desarrollo, viabilidad, comportamiento alimenticio, comportamiento de apareamiento, fecundidad o cualquier disminución medible de los efectos adversos provocados por la alimentación de un insecto con esta proteína, fragmento de proteína, segmento de proteína o polinucleótido de una plaga diana específica, incluso, entre otros, insectos del orden de lepidópteros. La proteína tóxica puede ser producida por la planta o puede ser aplicada a la planta o al ambiente dentro de la ubicación donde se encuentra la planta. Los términos "bioactividad", "efectivo", "eficaz" o variaciones de estos, también son términos utilizados de forma intercambiable en la presente solicitud para describir los efectos de las proteínas de la presente invención en plagas de insectos diana.

Una cantidad eficaz como insecticida de un agente tóxico, cuando se proporciona a la dieta de una plaga diana, presenta actividad pesticida cuando el agente tóxico entra en contacto con la plaga. Un agente tóxico puede ser una proteína pesticida o uno o más agentes químicos conocidos en la técnica. Los agentes químicos pesticidas o insecticidas y agentes de proteína pesticidas o insecticidas se pueden usar solos o en combinaciones entre sí. Los agentes químicos incluyen, de modo no taxativo, moléculas de ARNbc que se dirigen a genes específicos para la supresión en una plaga diana, organocloruros, organofosfatos, carbamatos, piretroides, neonicotinoides y rianoides. Los agentes proteicos pesticidas o insecticidas incluyen las toxinas proteicas que se establecen en la presente solicitud, así como otros agentes tóxicos proteináceos que incluyen los que se dirigen a lepidópteros, así como toxinas proteicas que se usan para controlar otras plagas vegetales, tales como proteínas Cry y Cyt disponibles en la técnica para su uso para controlar especies de coleópteros, hemípteros y homópteros.

Se pretende que la referencia a una plaga, particularmente una plaga de una planta de cultivo, se refiera a plagas de insectos de plantas de cultivo, particularmente a las plagas de insectos lepidópteros que son controladas por la clase de toxinas proteicas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. Sin embargo, la referencia a una plaga también puede incluir plagas de insectos coleópteros, hemípteros y homópteros de plantas, así como nematodos y hongos cuando los agentes tóxicos que se dirigen a estas plagas se colocan o presentan junto con la proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL o una proteína que sea 85 a alrededor de 100 por ciento idéntica a TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL.

Las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL se relacionan por función común y presentan actividad insecticida hacia plagas de insectos de las especies de insectos de lepidópteros que incluyen adultos, pupas, lavas y neonatos.

Los insectos del orden de los lepidópteros incluyen, de modo no taxativo, cogolleros, cortadores, medidores y polillas de la familia Noctuidae, por ejemplo, cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano soldado africano (*Spodoptera exempta*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), gusano de las crucíferas (*Mamestra configurata*), gusano cortador grasiendo (*Agrotis ipsilon*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), lagarta verde (*Pseudoplusia includens*), oruga de las leguminosas (*Anticarsia gemmatalis*), gusano verde de la soja (*Hypena scabra*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano trozador (*Agrotis subterranea*), oruga militar verdadera

(*Pseudaletia unipuncta*), gusano cortador pálido del oeste (*Agrotis orthogonia*); barrenadores, bichos canasto, tejedores, gusanos de las piñas, gusanos de la col y esqueletizadores de la familia Pyralidae, por ejemplo, taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), gusano de la naranja navel (*Amyelois transitella*), gusano de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), gusano tejedor del césped (*Herpetogramma licarsialis*), palomilla del capítulo (*Homoeosoma electellum*), gusano perforador del brote (*Elasmopalpus lignosellus*); enrolladores de hojas, gusanos belloteros, gusanos de las semillas y gusanos de las frutas de la familia Tortricidae, por ejemplo, polilla del manzano (*Cydia pomonella*), polilla de la uva (*Endopiza viteana*), polilla oriental del melocotonero (*Grapholita molesta*), polilla de la yema del girasol (*Suleima helianthana*); y muchos otros lepidópteros económicamente importantes, por ejemplo, palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) y polilla gitana (*Lymantria dispar*). Otras plagas de insectos del orden de lepidópteros incluyen, por ejemplo, gusano medidor de la hoja del algodonero (*Alabama argillacea*), enrollador de hojas frutales (*Archips argyrospila*), enrollador de los brotes (*Archips rosana*) y otras especies Archips, (*Chilo suppressalis*, barrenador del arroz o barrenador del tallo del arroz), enrollador de las hojas de arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), gusano de la raíz del maíz (*Crambus caliginosellus*), oruga del césped (*Crambus teterrellus*), barrenador del maíz (*Diatraea grandiosella*), barrenador de la caña de azúcar (*Diatraea saccharalis*), oruga espinosa (*Earias insulana*), gusano moteado (*Earias vittella*), gusano cogollero (*Helicoverpa armigera*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*, también conocido como gusano de la soja y gusano del algodón), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano tejedor del césped (*Herpetogramma licarsialis*), gusano trozador occidental del frijol (*Striacosta albicosta*), polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana*), minador de hojas de los cítricos (*Phyllocnistis citrella*), blanca de la col (*Pieris brassicae*), blanquita de la col (*Pieris rapae*, también conocida como mariposa de la col), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano gris del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como gusano defoliador) y polilla de tomate (*Tuta absoluta*).

Se pretende que la referencia en la presente solicitud a una "molécula aislada de ADN", o una frase o término equivalente, signifique que la molécula de ADN está presente sola o en combinación con otras composiciones, pero no está en su entorno natural. Por ejemplo, los elementos de ácido nucleico, tales como una secuencia codificante, una secuencia de intrones, una secuencia líder sin traducir, una secuencia promotora, una secuencia de terminación transcripcional y similares, que se encuentran naturalmente dentro del ADN del genoma de un organismo no se consideran "aisladas", siempre y cuando el elemento esté dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el que se encuentra naturalmente. Sin embargo, cada uno de estos elementos, y subpartes de estos elementos, se encuentra "aislado" dentro del alcance de la presente descripción siempre que el elemento no se encuentre dentro del genoma del organismo y en la ubicación dentro del genoma en el cual se encuentra naturalmente. De manera similar, una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína insecticida o cualquier variante insecticida de origen natural de la proteína podría ser una secuencia de nucleótidos aislada siempre que la secuencia de nucleótidos no esté dentro del ADN de la bacteria en la cual la secuencia que codifica la proteína se encuentra naturalmente. Una secuencia sintética de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína insecticida de origen natural se podría considerar aislada a los fines de la presente descripción. A los fines de la presente descripción, cualquier secuencia transgénica de nucleótidos, es decir, la secuencia de nucleótidos del ADN insertado en el genoma de las células de una planta o bacteria, o presente en un vector extracromosómico, se podría considerar una secuencia aislada de nucleótidos ya sea que esté presente dentro del plásmido o estructura similar usada para transformar las células, dentro del genoma de la planta o bacteria, o presente en cantidades detectables en tejidos, descendencia, muestras biológicas o productos básicos derivados de la planta o bacteria.

Como se describe de manera adicional en la presente solicitud, se descubrió un marco de lectura abierto (ORF) que codifica TIC6757 (SEQ ID NO: 19) en el ADN obtenido de la cepa *Paenibacillus popilliae* DSC004343. La secuencia codificante se clonó y expresó en células hospedadoras microbianas para producir proteínas recombinantes usadas en ensayos biológicos. Se utilizan técnicas de análisis de alto rendimiento y bioinformática para analizar las secuencias microbianas para genes que codifican proteínas que exhiben similitudes con TIC6757. Se descubrió un marco abierto de lectura (ORF) que codifica TIC7472 (SEQ ID NO:7) en el ADN obtenido de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC007648. Se descubrió un marco abierto de lectura (ORF) que codifica TIC7473 (SEQ ID NO:11) en el ADN obtenido de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC008493. El ensayo biológico usando proteínas derivadas de células hospedadoras microbianas de TIC6757 demostró actividad contra la especie de lepidópteros gusano soldado (*Spodoptera exigua*), gusano cortador grasiendo (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodonero (*Alabama argillacea*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), taladro del maíz (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), cogollero del maíz resistente a Cry1Fa1 (*Spodoptera frugiperda*), oruga del viejo mundo (OWB, *Helicoverpa armigera*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano moteado (*Earias vittella*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano gris del tabaco (*Spodoptera litura*, también conocido como gusano defoliador) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*). Los ensayos biológicos con proteínas derivadas de células hospedadoras microbianas de TIC7472 y TIC7473 demostraron actividad contra la especie de lepidópteros gusano elotero (*Helicoverpa zea*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), gusano meridional (*Spodoptera eridania*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*) y barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*).

Para la expresión en células vegetales, las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL pueden expresarse para que residan en el citosol o dirigirse a varios orgánulos de la célula vegetal. Por ejemplo, dirigir una proteína hacia el cloroplasto puede dar como resultado un aumento en los niveles de proteína

expresada en una planta transgénica, a la vez que previene la aparición de elementos fuera del fenotipo. El direccionamiento también puede dar como resultado un aumento de la eficacia de resistencia a las plagas en el evento transgénico. Un péptido diana o péptido de tránsito es una cadena peptídica corta (3-70 aminoácidos de longitud) que dirige el transporte de una proteína hacia una región específica en la célula, inclusive el núcleo, mitocondria, retículo endoplásmico (RE), cloroplasto, apoplasto, peroxisoma y membrana plasmática. Algunos péptidos diana se escinden de la proteína mediante peptidasas de señal después de transportarse las proteínas. Para dirigirse hacia el cloroplasto, las proteínas contienen péptidos de tránsito que tienen alrededor de 40-50 aminoácidos. Para descripciones del uso de péptidos de tránsito a cloroplastos, véanse las patentes estadounidenses n.º 5.188.642 y 5.728.925. Muchas de las proteínas localizadas en cloroplastos se expresan a partir de genes nucleares como precursores y se dirigen al cloroplasto mediante un péptido de tránsito a cloroplastos (CTP, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de dichas proteínas de cloroplastos aislados incluyen, de modo no taxativo, las asociadas con la subunidad pequeña (SSU) de ribulosa-1,5,-bisfosfato carboxilasa, ferredoxina, ferredoxina oxidoreductasa, la proteína I y proteína II del complejo captador de luz, tiorredoxina F, enolpiruvil shikimato fosfato sintasa (EPSPS), y los péptidos de tránsito descritos en la patente estadounidense n.º 7.193.133. Se ha demostrado *in vivo* e *in vitro* que las proteínas que no son cloroplastos pueden dirigirse al cloroplasto mediante el uso de fusiones de proteínas con un CTP heterólogo, y que el CTP es suficiente para dirigir una proteína hacia el cloroplasto. Se ha observado que la incorporación de un péptido de tránsito a cloroplastos adecuado, tal como *Arabidopsis thaliana* EPSPS CTP (CTP2) (véase, Klee et ál., *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442, 1987) o *Petunia hybrida* EPSPS CTP (CTP4) (véase della-Cioppa et ál., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:6873-6877, 1986) dirige secuencias de proteína de EPSPS heteróloga a cloroplastos en plantas transgénicas (véanse las patentes estadounidenses n.º 5.627.061; 5.633.435; y 5.312.910; y EP 0218571; EP 189707; EP 508909; y EP 924299). Para dirigir la toxina proteica TIC6757 o TIC6757PL al cloroplasto, una secuencia que codifica un péptido de tránsito a cloroplastos se coloca en la posición 5', unido de manera operativa y en el marco de una secuencia codificante sintética que codifica la toxina proteica TIC6757 o TIC6757PL que se diseñó para su expresión óptima en células vegetales.

Se pueden crear secuencias de toxinas proteicas adicionales relacionadas con TIC6757, TIC7472 y TIC7473 mediante el uso de la secuencia de aminoácidos de TIC6757, TIC7472 o TIC7473 para crear proteínas novedosas con propiedades novedosas. Las toxinas proteicas TIC6757, TIC7472 y TIC7473 se pueden alinear para combinar diferencias en el nivel de secuencia de aminoácidos en variantes de secuencia de aminoácidos y realizar cambios apropiados a la secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica las variantes.

La presente descripción contempla adicionalmente que las variantes mejoradas de la clase de toxina proteica TIC6757 se pueden diseñar *in planta* mediante varios procedimientos de edición de genes conocidos en la técnica. Tales tecnologías utilizadas para la edición del genoma incluyen, de modo no taxativo, sistemas de ZFN (nucleasa con dedos de cinc), meganucleasas, TALEN (nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción) y CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas espaciadas y regularmente agrupadas)/Cas (asociado a CRISPR). Estos procedimientos de edición genómica se pueden emplear para modificar la secuencia codificante de toxina proteica transformada dentro de una célula vegetal en una secuencia codificante de toxina diferente. Específicamente, a través de estos procedimientos, se modifican uno o más codones en la secuencia codificante de toxinas para diseñar una nueva secuencia de aminoácidos de proteínas. De manera alternativa, se reemplaza o se elimina un fragmento en la secuencia codificante o se insertan fragmentos de ADN adicionales en la secuencia codificante para diseñar una nueva secuencia codificante de toxinas. La nueva secuencia codificante puede codificar una toxina proteica con propiedades nuevas, tal como aumento de actividad o espectro contra plagas de insectos, así como también provee actividad contra una especie de plaga de insectos en cuyo caso se ha desarrollado resistencia contra la toxina proteica original. Los procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizar la célula vegetal que comprende la secuencia codificante de toxinas con gen editado para generar plantas enteras que expresen la nueva toxina proteica.

También se contempla que fragmentos de TIC6757, TIC7472 y TIC7473 o variantes de proteína de esta pueden ser formas truncadas, donde uno o más aminoácidos se eliminan del extremo N, extremo C, la mitad de la proteína, o combinaciones de estos, donde los fragmentos y variantes conservan actividad inhibidora de insectos. Estos fragmentos pueden ser de origen natural o variantes sintéticas de TIC6757, TIC7472 y TIC7473 o variantes de proteína derivadas, pero deberían conservar la actividad inhibidora de insectos de al menos TIC6757, TIC7472 o TIC7473.

Las proteínas que se asemejan a las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, y TIC7473PL pueden identificarse y compararse entre sí usando varios algoritmos informáticos conocidos en la técnica (ver las Tablas 1 y 2). Las identidades de secuencia de aminoácidos indicados en la presente solicitud son el resultado de una alineación Clustal W utilizando estos parámetros por defecto: Matriz de peso: blosum, penalización por abertura de hueco: 10,0, Penalización por extensión de hueco: 0,05, Huecos hidrofílicos: Activado, Restos hidrofílicos: GPSNDQERK, Penalizaciones por huecos específicos de restos: Activado (Thompson et ál (1994) *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680). El porcentaje de identidad de aminoácidos se calcula adicionalmente mediante el producto de 100 % multiplicado por (identidades de aminoácidos/longitud de la proteína de la invención). También se encuentran disponibles otros algoritmos de alineación en la técnica, y proporcionan resultados similares a los obtenidos usando una alineación Clustal W y se contemplan en la presente.

Se pretende que una proteína que presenta actividad inhibidora de insectos contra una especie de insectos lepidópteros se relacione con TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL si la proteína se usa en una consulta, por ejemplo, en una alineación Clustal W, y las proteínas de la presente invención que se establecen

en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 18 se identifican como aciertos en dicha alineación donde la proteína de consulta presenta al menos una identidad de aminoácidos a lo largo de la longitud de la proteína de consulta que es de alrededor de 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, o cualquier fracción de porcentaje en este intervalo.

- 5 Los ejemplos de proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL se alinearon entre sí con un algoritmo Clustal W. Se generó una matriz de pares de porcentajes de identidad de secuencia de aminoácidos para cada una de las proteínas de longitud completa, tal como se indicó en la Tabla 1.

Tabla 1. Representación de la matriz de pares de ejemplos de proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL.

Toxina	TIC6757 (SEQ ID NO:2)	TIC6757 PL (SEQ ID NO:4)	TIC7472 (SEQ ID NO:8)	TIC7472PL (SEQ ID NO:16)	TIC7473 (SEQ ID NO:12)	TIC7473PL (SEQ ID NO:18)
TIC6757 (SEQ ID NO:2)	-	99,9 (796)	99,7 (795)	99,6 (794)	99,9 (796)	99,7 (795)
TIC6757 PL (SEQ ID NO:4)	99,7 (796)	-	99,5 (794)	99,7 (796)	99,6 (795)	99,9 (797)
TIC7472 (SEQ ID NO:8)	99,7 (795)	99,6 (794)	-	99,9 (796)	99,9 (796)	99,7 (795)
TIC7472PL (SEQ ID NO:16)	99,5 (794)	99,7 (796)	99,7 (796)	-	99,6 (795)	99,9 (797)
TIC7473 (SEQ ID NO:12)	99,9 (796)	99,7 (795)	99,9 (796)	99,7 (795)	-	99,9 (796)
TIC7473PL (SEQ ID NO:18)	99,6 (795)	99,9 (797)	99,6 (795)	99,9 (797)	99,7 (796)	-

Descripción de la tabla: La alineación entre (X) y (Y) de Clustal W se indica en una matriz de pares. Se calcula el porcentaje de identidad de aminoácidos entre todos los pares y se indica con el primer número en cada celda. El segundo número (entre paréntesis) en cada celda representa el número de aminoácidos idénticos entre el par.

10

Además del porcentaje de identidad, TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, TIC7473PL y proteínas relacionadas también pueden estar relacionadas por estructura principal (motivos de aminoácidos conservados), por longitud (alrededor de 797 aminoácidos) y por otras características. Las características de las toxinas proteicas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL se registran en la Tabla 2.

15

Tabla 2. Características seleccionadas de las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL TIC7473, TIC7473PL.

<u>Proteína</u>	<u>Peso molecular (en Dalton)</u>	<u>Longitud de aminoácidos</u>	<u>Punto isoelectrónico</u>	<u>Carga a PH 7,0</u>	<u>N.º de aminoácidos fuertemente básicos</u> <u>(Σ)</u>	<u>N.º de aminoácidos fuertemente ácidos</u>	<u>N.º de aminoácidos hidrófobos</u>	<u>N.º de aminoácidos polares</u>
TIC6757	90011,21	797	4,4289	-34,5	81	112	391	406
TIC6757PL	90082,29	798	4,4289	-34,5	81	112	392	406
TIC7472	90096,28	797	4,4141	-35,5	81	113	390	407
TIC7472PL	90167,36	798	4,4141	-35,5	81	113	391	407
TIC7473	90069,25	797	4,4141	-35,5	81	113	390	407
TIC7473PL	90140,33	798	4,4141	-35,5	81	113	391	407

Como se describe de manera adicional en los Ejemplos de la presente solicitud, se diseñó una secuencia de molécula de ácido nucleico sintético que codifica una variante de TIC6757, TIC6757PL para su uso en plantas. Un ejemplo de secuencia de molécula de ácido nucleico recombinante que se diseñó para su uso en plantas que codifica la proteína TIC6757PL se presenta como la SEQ ID NO: 3. La proteína TIC6757PL tiene un aminoácido de alanina adicional inmediatamente después de la metionina de inicio con respecto a la proteína TIC6757. Se cree que el resto de alanina adicional insertado en la secuencia de aminoácidos TIC6757 mejora la expresión de la proteína *in planta*. Asimismo, en la presente se hace referencia a las secuencias de moléculas de ácido nucleico sintéticas que codifican variantes de TIC7472 y TIC7473 como TIC7472PL y TIC7473PL, respectivamente, y estas fueron diseñadas para utilizarse en plantas. Los ejemplos de secuencias de moléculas de ácido nucleico sintéticas que se diseñaron para ser utilizadas en plantas que codifican TIC7472PL y TIC7473PL se presentan como SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17, respectivamente. Tanto la proteína TIC7472PL como TIC7473PL tienen un aminoácido de alanina adicional inmediatamente después de la metionina de inicio con respecto a las proteínas TIC7472 y TIC7473.

Los vectores y casetes de expresión que contienen una secuencia de molécula de ácido nucleico recombinante se pueden construir e introducir en células vegetales de maíz, soja o algodón, de acuerdo con procedimientos y técnicas de transformación conocidos en la técnica. Por ejemplo, la transformación mediada por *Agrobacterium* se describe en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense 2009/0138985A1 (soja), 2008/0280361A1 (soja), 2009/0142837A1 (maíz), 2008/0282432 (algodón), 2008/0256667 (algodón), 2003/0110531 (trigo), 2001/0042257 A1 (remolacha azucarera), patente estadounidense n.º 5.750.871 (canola), 7.026.528 (trigo) y 6.365.807 (arroz) y en Arencibia et ál. (1998) Transgenic Res. 7:213-222 (caña de azúcar). Las células transformadas se pueden regenerar y convertirse en plantas transformadas que expresan proteínas TIC6757PL, TIC7472 y TIC7473 y demuestran actividad pesticida a través de ensayos biológicos realizados en presencia de larvas de plagas de lepidópteros usando discos de hojas de planta obtenidos de las plantas transformadas. Las plantas pueden derivarse de las células vegetales mediante técnicas de regeneración y transformación de semillas, polen o meristemo. Se conocen en la técnica procedimientos para transformar plantas.

Como una alternativa a los procedimientos de transformación tradicionales, es posible insertar o integrar una secuencia de ADN, tal como un transgén, casete(s) de expresión, etc., en un sitio específico o locus en el genoma de una planta o célula vegetal mediante integración dirigida al sitio. Por lo tanto, la(s) construcción(es) y la(s) molécula(s) de ADN recombinante de la presente divulgación pueden incluir una secuencia de plantilla donante que comprende al menos un transgén, un casete de expresión u otra secuencia de ADN para su inserción en el genoma de la planta o la célula vegetal. Tal plantilla donante para la integración dirigida al sitio puede incluir adicionalmente uno o dos brazos homólogos que flanquean una secuencia de inserción (es decir, la secuencia, transgén, casete, etc., que se va a insertar en el genoma de la planta). La(s) construcción(es) de ADN recombinante de la presente divulgación pueden comprender adicionalmente un casete o casetes de expresión que codifica(n) una nucleasa específica del sitio y/o cualquier proteína asociada para llevar a cabo la integración dirigida al sitio. Estos casetes de expresión de nucleasas pueden encontrarse presentes en la misma molécula o vector que la plantilla donante (*en cis*) o en una molécula o vector independiente (*en trans*). En la técnica se conocen varios procedimientos para la integración dirigida al sitio que implican distintas proteínas (o complejos de proteínas y/o ARN guía) que cortan el ADN genómico a fin de producir una interrupción de cadena doble (DSB) o muesca en un sitio o locus genómico deseado. En resumen, tal como se entiende en la técnica, durante el proceso de reparación de la DSB o muesca introducido por la enzima nucleasa, es posible integrar la plantilla donante de ADN al genoma en el sitio de la DSB o muesca. La presencia de los brazos homólogos en la plantilla donante puede promover la adopción y la selección de la secuencia de inserción en el genoma de la planta durante el proceso de reparación mediante recombinación homóloga, aunque puede ocurrir un evento de inserción mediante la unión de extremos no homólogos (NHEJ). Los ejemplos de nucleasas específicas del sitio que se pueden utilizar incluyen nucleasas con dedos de cinc, meganucleasas diseñadas o naturales, endonucleasas TALE y endonucleasas guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cpf1). Para los procedimientos que utilizan las nucleasas específicas del sitio guiadas por ARN (por ejemplo, Cas9 o Cpf1), las construcciones de ADN recombinante también comprenderán una secuencia que codifica uno o más ARN guías para dirigir la nucleasa al sitio deseado en el genoma de la planta.

Se contemplan composiciones de moléculas de ácido nucleico recombinante que codifican TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL. Por ejemplo, las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473, y TIC7473PL pueden expresarse con construcciones de ADN recombinante en las cuales una molécula de polinucleótido con un ORF que codifica la proteína está unida de manera operativa a elementos de expresión genética, tales como un promotor, y cualquier otro elemento regulador necesario para la expresión en el sistema para el cual está destinada la construcción. Los ejemplos no taxativos incluyen un promotor funcional vegetal unido de manera operativa a la secuencia que codifica una proteína TIC6757PL, TIC7472PL o TIC7473PL para la expresión de la proteína en plantas o un promotor funcional de *Bt* unido de manera operativa a una secuencia que codifica una proteína TIC6757, TIC7472 o TIC7473 para la expresión de la proteína en una bacteria *Bt* u otra especie *Bacillus*. Otros elementos pueden estar unidos de manera operativa a la secuencia que codifica la proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL, inclusive, de modo no taxativo, potenciadores, intrones, líderes no traducidos, etiquetas de inmovilización de proteínas codificadas (etiqueta His), péptidos de translocación (es decir, péptidos de tránsito a plástidos, péptidos de señal), secuencias de polipéptidos para enzimas de modificación postraduccional, sitios de unión a ribosomas y sitios de direccionamiento a iARN. Los ejemplos de moléculas recombinantes de polinucleótidos proporcionados junto con la presente incluyen, de modo no taxativo, un promotor

- heterólogo unido de manera operativa a un polinucleótido, tal como la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:1, SIQ ID NO:7, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:15 y SEQ ID NO:17 que codifica los polipéptidos o proteínas respectivos que tienen la secuencia de aminoácidos que se establece en la SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:16 y SEQ ID NO:18. Un promotor heterólogo también puede estar unido de manera operativa a secuencias sintéticas codificantes de ADN que codifican una TIC6757PL, TIC7472PL o TIC7473PL dirigida a plástidos y una TIC6757PL, TIC7472PL o TIC7473PL no dirigida. Los codones de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica las proteínas desveladas en la presente pueden sustituirse por codones sinónimos (lo que se conoce en la técnica como sustitución silenciosa).
- Una construcción de ADN recombinante que comprende secuencias que codifican proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL puede comprender además una región de ADN que codifica uno o más agentes inhibidores de insectos que pueden configurarse para expresar o coexpresar simultáneamente con una secuencia de ADN que codifica una proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL, una proteína diferente a una proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL, una molécula de ARNbc inhibidora de insectos o una proteína auxiliar. Las proteínas auxiliares incluyen, de modo no taxativo, cofactores, enzimas, compañeros de unión u otros agentes que funcionan para contribuir a la eficacia de un agente inhibidor de insectos, por ejemplo, al contribuir a su expresión, influir en su estabilidad en plantas, optimizar la energía libre para la oligomerización, aumentar su toxicidad y su espectro de actividad. Una proteína auxiliar puede facilitar la absorción de uno o más agentes inhibidores de insectos, por ejemplo, o potenciar los efectos tóxicos del agente tóxico.
- Una construcción de ADN recombinante puede disponerse de forma que todas las proteínas o moléculas de ARNbc se expresen desde un promotor o cada proteína o molécula de ARNbc esté bajo el control de promotores separados, o una combinación de estos. Las proteínas de la presente invención se pueden expresar a partir de un sistema de expresión de múltiples genes en el cual una o más proteínas de TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL se expresan a partir de un segmento de nucleótidos común que también contiene otros marcos de lectura abiertos y promotores, según el tipo de sistema de expresión seleccionado. Por ejemplo, un sistema de expresión multigénico bacteriano puede utilizar un único promotor para dirigir la expresión de marcos de lectura abiertos en conjunto/unidos de forma múltiple del interior de un único operón (es decir, expresión policistrónica). En otro ejemplo, un sistema de expresión multigénico vegetal puede utilizar cassetes de expresión unidos o no unidos por unión múltiple, donde cada uno expresa una proteína diferente u otro agente, tal como una o más moléculas de ARNbc.
- Los polinucleótidos recombinantes o construcciones de ADN recombinantes que comprenden una secuencia codificante de proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL pueden administrarse a las células hospedadoras mediante vectores, por ejemplo, un plásmido, baculovirus, cromosoma sintético, virión, cósmido, fagémido, fago o vector viral. Dichos vectores pueden utilizarse para lograr una expresión estable o transitoria de una secuencia codificante de proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL en una célula hospedadora, o expresión posterior del polipéptido codificado. También se hace referencia en la presente a una construcción de ADN recombinante o de polinucleótido recombinante exógeno que comprende una secuencia codificante de proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL y que se introduce en una célula hospedadora como "transgén".
- Se proporcionan en la presente solicitud bacterias transgénicas, células vegetales transgénicas, plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas que contienen un polinucleótido recombinante que expresa una o más de las secuencias codificantes de TIC6757 o proteínas tóxicas de una familia relacionada. La expresión "célula bacteriana" o "bacteria" puede incluir, de modo no taxativo, una célula de *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Brevibacillus*, *Klebsiella*, *Erwinia* o *Rhizobium*. La expresión "célula vegetal" o "planta" puede incluir, de modo no taxativo, una planta dicotiledónea o monocotiledónea. La expresión "célula vegetal" o "planta" puede incluir, de modo no taxativo, una célula vegetal o planta de alfalfa, plátano, cebada, judía, brócoli, repollo, brassica, zanahoria, yuca, ricino, coliflor, apio, garbanzo, repollo chino, cítricos, coco, café, maíz, trébol, algodón, una cucurbitácea, pepino, abeto de Douglas, berenjena, eucalipto, lino, ajo, uva, lúpulo, puerro, lechuga, pino taeda, mijo, melón, nuez, avena, aceituna, cebolla, plantas ornamentales, palmera, pasto forrajero, guisante, cacahuete, pimiento, guandú, pino, patata, álamo, calabaza, pino insigne, rábano, colza, arroz, rizomas, centeno, cártamo, arbusto, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, calabacín, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, maíz dulce, liquidámbar, boniato, pasto varilla, té, tabaco, tomate, triticale, césped, sandía y trigo. En determinadas modalidades, se proporcionan plantas transgénicas y partes de plantas transgénicas regeneradas de una célula vegetal transgénica. En determinadas modalidades, las plantas transgénicas se pueden obtener de una semilla transgénica cortando, quebrando, moliendo o separando de otro modo la parte de la planta. En determinadas modalidades, la parte de planta puede ser una semilla, una cápsula, una hoja, una flor, un tallo, una raíz, o cualquier parte de estos, o una parte no regenerable de una parte de planta transgénica. Tal como se utiliza en este contexto, una parte "no regenerable" de una parte de una planta transgénica es una parte que no se puede inducir para que forme una planta entera o que no se puede inducir para que forme una planta entera que sea capaz de reproducción sexual y/o asexual. En determinadas modalidades, una parte no regenerable de una parte de una planta es una parte de una semilla, cápsula, hoja, flor, tallo o raíz transgénica.
- Se proporcionan procedimientos para generar plantas transgénicas que comprenden cantidades inhibidoras de insectos lepidópteros de una proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. Dichas plantas pueden generarse mediante la introducción de un polinucleótido recombinante que codifica cualquiera de las

proteínas proporcionadas en la presente solicitud a una célula vegetal, y la selección de una planta derivada de dicha célula vegetal que expresa una cantidad inhibidora de insectos lepidópteros de las proteínas. Las plantas pueden derivarse de células vegetales mediante técnicas de regeneración y transformación de semillas, polen o meristemo. Se conocen en la técnica procedimientos para transformar plantas.

- 5 También se desvelan en la presente productos vegetales procesados, donde el producto procesado comprende una cantidad detectable de una proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL, un segmento inhibidor de insectos o fragmento de este, o cualquier parte distingible de este. En determinadas modalidades, el producto procesado se selecciona del grupo que consiste en partes de plantas, biomasa vegetal, aceite, harina gruesa, azúcar, pienso, harina, copos, salvado, hila, vainas, semillas y semillas procesadas. En determinadas modalidades, el producto procesado no es regenerable. El producto vegetal puede comprender productos básicos u otros productos comerciales derivados de una planta transgénica o parte de planta transgénica, donde los productos básicos u otros productos pueden rastrearse comercialmente mediante la detección de segmentos de nucleótidos o proteínas o ARN expresados que codifican o comprenden partes distinguibles de una proteína TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL.
- 10 15 Las plantas que expresan las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL pueden cruzarse mediante la reproducción con eventos transgénicos que expresan otras toxinas proteicas y/o que expresan otros rasgos transgénicos, tales como genes de tolerancia a herbicidas, genes que confieren rasgos de tolerancia al estrés o resistencia y similares, o dichos rasgos pueden combinarse en un único vector, de forma que se unan estos rasgos.
- 20 25 Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos, es posible identificar las secuencias codificantes de proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL y las secuencias que tienen un porcentaje sustancial de identidad con TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL mediante el uso de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación y amplificación térmica. Por ejemplo, las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL pueden utilizarse para producir anticuerpos que se unen específicamente a proteínas relacionadas, y pueden utilizarse para buscar y hallar otros miembros proteicos muy relacionados.

Además, las secuencias de nucleótidos que codifican las toxinas proteicas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 y TIC7473PL pueden utilizarse como sondas y cebadores para analizar e identificar otros miembros de la clase mediante el uso de procedimientos de hibridación y amplificación isotérmica o termociclado. Por ejemplo, los oligonucleótidos derivados de la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17 se pueden usar para determinar la presencia o ausencia de un transgén TIC6757PL, TIC7472PL o TIC7473PL en una muestra de ácido desoxirribonucleico derivada de un producto básico. Dada la sensibilidad de determinados procedimientos de detección de ácido nucleico que emplean oligonucleótidos, se anticipa que los oligonucleótidos derivados de las secuencias que se establecen en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17 se pueden usar para detectar un transgén TIC6757PL, TIC7472PL y TIC7473PL en productos básicos derivados de fuentes conglomeradas donde solamente una fracción del producto básico deriva de una planta transgénica que contiene cualquiera de los transgenes. Se reconoce además que dichos oligonucleótidos se pueden usar para introducir variaciones de secuencia de nucleótidos en cada una de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17. Dichos oligonucleótidos de "mutagénesis" son útiles para la identificación de las variantes de secuencia de aminoácidos TIC6757PL, TIC7472PL y TIC7473PL que presentan un intervalo de actividad inhibidora o expresión variada de insectos en células hospedadoras de plantas transgénicas.

Los homólogos de secuencia de nucleótidos, por ejemplo, proteínas insecticidas codificadas por secuencias de nucleótidos que se hibridan con cada una o cualquiera de las secuencias descritas en la presente solicitud en condiciones de hibridación rigurosas, también son una modalidad de la presente invención. También se describe en el presente documento un procedimiento para detectar una primera secuencia de nucleótidos que se hibrida con una segunda secuencia de nucleótidos, donde la primera secuencia de nucleótidos (o su secuencia complementaria inversa) codifica una proteína pesticida o fragmento pesticida de esta y se hibrida con la segunda secuencia de nucleótidos. En dicho caso, la segunda secuencia de nucleótidos puede ser cualquiera de las secuencias de nucleótidos que se presentan en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17 en condiciones de hibridación rigurosas. Las secuencias codificantes de nucleótidos se hibridan entre sí en condiciones de hibridación apropiadas, como condiciones de hibridación rigurosas, y las proteínas codificadas por estas secuencias de nucleótidos reaccionan de manera cruzada con antisero generado contra cualquiera de las otras proteínas. Las condiciones de hibridación rigurosas, como se definen en la presente, comprenden al menos hibridación a 42 °C seguido de dos lavados durante cinco minutos cada uno a temperatura ambiente con SSC 2X, SDS al 0,1 %, seguido de dos lavados durante treinta minutos cada uno a 65 °C en SSC 0,5X, SDS al 0,1 %. Lavados a temperaturas incluso más altas constituyen condiciones incluso más rigurosas, por ejemplo, condiciones de hibridación de 68 °C, seguido de lavado a 68 °C, en SSC 2x con SDS al 0,1 %.

Un experto en la técnica reconocerá que, debido a la redundancia del código genético, muchas otras secuencias pueden codificar dichas proteínas relacionadas, y estas secuencias, en la medida en que funcionen para expresar proteínas pesticidas en cepas de *Bacillus* o en células vegetales, son modalidades de la presente invención, reconociendo obviamente que muchas de dichas secuencias de codificación redundantes no se hibridarán en estas

condiciones con las secuencias de *Bacillus* o *Paenibacillus* que codifican TIC6757, TIC7472 y TIC7473. La presente solicitud contempla el uso de estos y otros procedimientos de identificación conocidos por los expertos en la técnica, para identificar secuencias codificantes de proteína TIC6757, TIC7472 y TIC7473 y secuencias con un porcentaje sustancial de identidad con las secuencias codificantes de proteína TIC6757, TIC7472 y TIC7473.

- 5 La presente divulgación también contempla el uso de procedimientos moleculares conocidos en la técnica para modificar genéticamente y clonar proteínas útiles a nivel comercial que comprenden quimeras de proteínas de proteínas pesticidas; por ejemplo, las quimeras se pueden ensamblar de segmentos de las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL para derivar modalidades útiles adicionales que incluyen ensamblaje de segmentos de proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL con segmentos de diversas proteínas diferentes de TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL y proteínas relacionadas. Las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL se pueden someter a alineación entre sí y con otras proteínas de *Bacillus*, *Paenibacillus* u otras proteínas pesticidas (ya sea que estén muy o poco relacionadas de forma filogenética) y se pueden identificar segmentos de cada proteína útiles para la sustitución entre las proteínas alineadas, provocando la construcción de proteínas químéricas. Dichas proteínas químéricas se pueden someter a análisis de ensayo biológico de plagas y caracterizarse según la presencia o ausencia de un aumento de la bioactividad o un espectro de plagas diana expandido en comparación con las proteínas de origen de las cuales deriva cada uno de dichos segmentos en la quimera. La actividad pesticida de los polipéptidos se puede modificar genéticamente de forma adicional para la actividad para una plaga específica o para un amplio espectro de plagas mediante el intercambio de dominios o segmentos con otras proteínas o mediante el uso de procedimientos de evolución dirigidos conocidos en la técnica.

También se desvelan en la presente solicitud procedimientos para controlar infestaciones de lepidópteros de plantas de cultivo, con las proteínas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. Dichos procedimientos pueden comprender cultivar una planta que comprende una cantidad inhibidora de insectos o lepidópteros de una toxina proteica TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. En determinadas modalidades, dichos procedimientos pueden comprender además uno cualquiera o más de: (i) aplicar cualquier composición que comprende o codifica una toxina proteica TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL a una planta o semilla que genera una planta; y (ii) transformar una planta o una célula vegetal que genera una planta con un polinucleótido que codifica una toxina proteica TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. En general, se contempla que una toxina proteica TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL puede proporcionarse en una composición, en un microorganismo o en una planta transgénica, para conferir una actividad inhibidora de insectos contra insectos lepidópteros.

En determinadas modalidades, una molécula de ácido nucleico recombinante de las toxinas proteicas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL es el ingrediente activo como insecticida de una composición inhibidora de insectos preparada mediante el cultivo de *Bacillus* recombinante o cualquier otra célula bacteriana recombinante transformada para expresar una toxina proteica TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL en condiciones adecuadas para expresar la toxina proteica TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. Dicha composición puede prepararse mediante desecación, liofilizado, homogenización, extracción, filtrado, centrifugado, sedimentación o concentración de un cultivo de dichas células recombinantes que expresan/producen dicho polipéptido recombinante. Dicho proceso puede producir un *Bacillus* u otro extracto de célula bacteriana entomopatógena, suspensión celular, homogeneizado celular, lisado celular, sobrenadante celular, filtrado celular o sedimento celular. Al obtener los polipéptidos recombinantes así producidos, una composición que incluye los polipéptidos recombinantes pueden incluir células bacterianas, esporas bacterianas y cuerpos de inclusión parásporales y se pueden formular para varios usos, incluyendo productos en pulverización inhibidores de insectos agrícolas o como formulaciones inhibidoras de insectos en bioensayos dietarios.

45 En una modalidad, para reducir la posibilidad de desarrollo de resistencia, una composición inhibidora de insectos que comprende TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL además puede comprender al menos un polipéptido adicional que presenta actividad inhibidora de insectos contra la misma especie de insectos lepidópteros, pero que es diferente de la toxina proteica TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL. Algunos polipéptidos adicionales posibles para dicha composición incluyen una proteína inhibidora de insectos y una molécula de ARNbc inhibidora de insectos. Un ejemplo para el uso de dichas secuencias de ribonucleótidos para controlar plagas de insectos se describe en Baum et ál. (publicación de patente estadounidense 2006/0021087 A1). Tal polipéptido adicional para el control de plagas de lepidópteros se puede seleccionar del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, de modo no taxativo, Cry1A (patente estadounidense n.º 5.880.275), Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1A.105, Cry1Ae, Cry1B (publicación de patente estadounidense n.º 10/525.318), Cry1C (patente estadounidense n.º 6.033.874), Cry1D, Cry1Da y variantes de estos, Cry1E, Cry1F y quimeras de Cry1A/F (patentes estadounidenses n.º 7.070.982, 6.962.705 y 6.713.063), Cry1G, Cry1H, Cry1I, Cry1J, Cry1K, Cry1L, quimeras tipo Cry1 como, de modo no taxativo, TIC836, TIC860, TIC867, TIC869 y TIC1100 (publicación de solicitud internacional WO2016/061391 (A2)), TIC2160 (publicación de solicitud internacional WO2016/061392(A2)), Cry2A, Cry2Ab (patente estadounidense n.º 7.064.249), Cry2Ae, Cry4B, Cry6, Cry7, Cry8, Cry9, Cry15, Cry43A, Cry43B, Cry51Aa1, ET66, TIC400, TIC800, TIC834, TIC1415, Vip3A, VIP3Ab, VIP3B, AXMI-001, AXMI-002, AXMI-030, AXMI-035, y AXMI-045 (publicación de patente estadounidense 2013-0117884 A1), AMXI-52, AXMI-58, AXMI-88, AXMI-97, AXMI-102, AXMI-112, AXMI-117, AXMI-100 (publicación de patente estadounidense 2013-0310543 A1), AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005 (publicación de patente estadounidense 2013-0104259 A1), AXMI134 (publicación de patente

estadounidense 2013-0167264 A1), AXMI-150 (publicación de patente estadounidense 2010-0160231 A1), AXMI-184 (publicación de patente estadounidense 2010-0004176 A1), AXMI-196, AXMI-204, AXMI-207, AXMI-209 (publicación de patente estadounidense 2011-0030096 A1), AXMI-218, AXMI-220 (publicación de patente estadounidense 2014-0245491 A1), AXMI-221z, AXMI-222z, AXMI-223z, AXMI-224z, AXMI-225z (publicación de patente estadounidense 5 2014-0196175 A1), AXMI-238 (publicación de patente estadounidense 2014-0033363 A1), AXMI-270 (publicación de patente estadounidense 2014-0223598 A1), AXMI-345 (publicación de patente estadounidense 2014-0373195 A1), AXMI-335 (publicación de solicitud internacional WO2013/134523(A2)), DIG-3 (publicación de patente estadounidense 10 2013-0219570 A1), DIG-5 (publicación de patente estadounidense 2010-0317569 A1), DIG-11 (publicación de patente estadounidense 2010-0319093 A1), AfIP-1A y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2014-0033361 A1), AfIP-1B y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2014-0033361 A1), PIP-1APIP-1B (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), PSEEN3174 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), AECFG-592740 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), Pput_1063 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), DIG-657 (publicación de solicitud internacional 15 2015/195594 A2), Pput_1064 (publicación de patente estadounidense 2014-0007292 A1), GS-135 y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2012-0233726 A1), GS153 y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), GS154 y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), GS155 y derivados de estos (publicación de patente estadounidense 2012-0192310 A1), SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2012-0167259 A1, SEQ ID NO:2 20 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2012-0047606 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2011-0154536 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2011-0112013 A1, SEQ ID NO:2 y 4 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0192256 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0077507 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0077508 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2009-0313721 A1, SEQ ID NO:2 o 4 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense 2010-0269221 A1, SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 7.772.465 (B2), CF161_0085 y derivados de estos como se describe en WO2014/008054 A2, toxinas proteicas de lepidópteros y sus 25 derivados como se describe en las publicaciones de patente estadounidenses US2008-0172762 A1, US2011-0055968 A1 y US2012-0117690 A1; SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en US7510878(B2), SEQ ID NO:2 y derivados de estos como se describe en la patente estadounidense n.º 7812129(B1); y similares.

En otras modalidades, dicha composición/formulación puede comprender adicionalmente al menos un polipéptido adicional que exhibe la actividad inhibidora de insectos para un insecto que no se inhibe por una proteína de otra forma inhibidora de insectos de la presente invención para expandir el espectro de la inhibición de insectos obtenida. Por ejemplo, para el control de plagas de hemípteros, se pueden utilizar combinaciones de proteínas inhibidoras de insectos de la presente invención con proteínas activas de hemípteros tales como TIC1415 (publicación de patente estadounidense 2013-0097735 A1), TIC807 (patente estadounidense N.º 8609936), TIC834 (publicación de patente estadounidense 2013-0269060 A1), AXMI-036 (publicación de patente estadounidense 2010-0137216 A1) y AXMI-171 (publicación de patente estadounidense 2013-0055469 A1). Además, un polipéptido para el control de plagas de coleópteros puede seleccionarse del grupo que consiste en una proteína inhibidora de insectos, tal como, de modo no taxativo, Cry3Bb (patente estadounidense n.º 6.501.009), variantes de Cry1C, variantes de Cry3A, Cry3, Cry3B, Cry34/35, 5307, AXMI134 (publicación de patente estadounidense 2013-0167264 A1) AXMI-184 (publicación de patente estadounidense 2010-0004176 A1), AXMI-205 (publicación de patente estadounidense 2014-0298538 A1), AXMI-207 (publicación de patente estadounidense 2013-0303440 A1), AXMI-218, AXMI-220 (publicación de patente 35 40 45 50 estadounidense 20140245491A1), AXMI-221z, AXMI-223z (publicación de patente estadounidense 2014-0196175 A1), AXMI-279 (publicación de patente estadounidense 2014-0223599 A1), AXMI-R1 y variantes de este (publicación de patente estadounidense 2010-0197592 A1, TIC407, TIC417, TIC431, TIC807, TIC853, TIC901, TIC1201, TIC3131, DIG-10 (publicación de patente estadounidense 2010-0319092 A1), eHIPS (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2010/0017914), IP3 y variantes de este (publicación de patente estadounidense 2012-0210462 A1) y ω-Hexatoxina-Hv1a (publicación de solicitud de patente estadounidense US2014-0366227 A1).

Polipéptidos adicionales para el control de plagas de insectos coleópteros, lepidópteros y hemípteros se pueden encontrar en el sitio web de nomenclatura de toxinas de *Bacillus thuringiensis* mantenido por Neil Crickmore (en Internet en bt-nomenclature.info).

En la técnica se ha documentado la posibilidad de que los insectos desarrollen resistencia a determinados insecticidas. Una estrategia de manejo de resistencia a insectos es emplear cultivos transgénicos que expresan dos agentes inhibidores de insecto diferentes que operan a través de diferentes modos de acción. Por lo tanto, cualesquier insectos con resistencia a uno de los agentes inhibidores de insectos pueden ser controlados por el otro agente inhibidor de insectos. Otra estrategia de manejo de resistencia a insectos emplea el uso de plantas que no están protegidas contra la especie de plaga de lepidópteros diana para proporcionar un refugio para dichas plantas desprotegidas. Un ejemplo específico se describe en la patente estadounidense N.º 6.551.962.

Otras modalidades tales como las sustancias químicas pesticidas aplicadas tópicamente que se diseñan para controlar plagas que también se controlan por las proteínas descritas en la presente que se utilizan con las proteínas en tratamientos de semillas, formulaciones de rociado, goteo, limpieza que se pueden aplicar directamente al suelo (suelo

empapado), se pueden aplicar a plantas en crecimiento que expresan las proteínas descritas en la presente, o se pueden formular para aplicarse a semillas que contienen uno o más transgenes que codifican una o más proteínas desveladas. Dichas formulaciones para usarse en el tratamiento de semillas se pueden aplicar con varios adhesivos o pegamentos conocidos en la técnica. Dichas formulaciones pueden contener pesticidas con un modo de acción 5 sinérgico con las proteínas desveladas, de modo que los pesticidas de la formulación actúan a través de un modo de acción diferente para controlar las mismas plagas o plagas similares que se pueden controlar mediante las proteínas desveladas, o que dichos pesticidas actúan para controlar las plagas dentro de un rango de hospedadores más amplio o especies de plagas de plantas que no se controlan de manera eficaz mediante las proteínas pesticidas TIC6757, TIC6757PL, TIC7472, TIC7472PL, TIC7473 o TIC7473PL.

10 La composición/formulación mencionada anteriormente puede comprender además un portador aceptable desde el punto de vista agrícola, por ejemplo, un cebo, un polvo, arena, sedimento, gránulo, aerosol, emulsión, una suspensión coloidal, una solución acuosa, una preparación de esporas/cristal de *Bacillus*, un tratamiento de semillas, una célula vegetal/tejido vegetal/semilla/planta recombinante transformada para expresar una o más de las proteínas, o bacteria transformada para expresar una o más de las proteínas. Dependiendo del nivel de inhibidor de insectos o inhibición 15 insecticida inherente en el polipéptido recombinante y el nivel de formulación que se debe aplicar a un ensayo de dieta o planta, la composición/formulación puede incluir diversas cantidades en peso del polipéptido recombinante, por ejemplo, de 0,0001 % a 0,001 % a 0,01 % a 1 %, a 99 % en peso del polipéptido recombinante.

Ejemplos

Ejemplo 1

20 **Descubrimiento, clonación y expresión de TIC6757**

Se identificó, clonó, confirmó su secuencia y analizó en ensayo biológico de insecto las secuencias que codifican tres proteínas pesticidas de *Paenibacillus popilliae* novedosa. Las proteínas pesticidas, TIC6757, TIC7472 y TIC7473 aisladas de las cepas de *Paenibacillus popilliae*, DSC004343, DSC007648 y DSC008493, respectivamente, representan proteínas tipo Vip3C novedosas. Las secuencias con una relación distante con respecto a TIC6757, TIC7472 y TIC7473 son Vip3Ca2 (con un 83,7 % de identidad, el familiar más cercano conocido), Vip3Aa1 (66,75 % de identidad) y una proteína tipo Vip3B (60,93 % de identidad). La calidad distintiva y exclusiva de TIC6757, TIC7472 y TIC7473 indica que dichas proteínas pesticidas probablemente presentan un modo de acción (MOA) novedoso.

25 Los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se diseñaron para amplificar una copia de longitud completa de la región codificante para TIC6757, TIC7472 y TIC7473 de ADN genómico total aislado de las cepas de *Paenibacillus popilliae* DSC004343, DSC007648 y DSC008493, respectivamente. Los amplicones de PCR también incluyeron codones de inicio y terminación de la traducción de cada secuencia codificante.

30 Se clonó cada uno de los amplicones mediante procedimientos conocidos en la técnica en dos vectores de expresión de *Bt* diferentes en unión operativa con un promotor de expresión de *Bt*. Un vector de expresión de *Bt* comprendía un promotor que se encuentra activado durante la esporulación del bacilo. El otro vector de expresión comprendía un promotor de no esporulación. Además, se clonó cada uno de los amplicones en un vector utilizado para la expresión proteica en *Escherichia coli* (*E. coli*). Para el aislamiento de las proteínas expresadas por *E. coli*, se unió de forma operativa una etiqueta de histidina a las secuencias codificantes expresadas para facilitar la purificación de la columna de la proteína. A continuación, en la Tabla 3, se presentan las secuencias codificantes y sus respectivas secuencias de proteínas utilizadas para la expresión bacteriana.

35 40 **Tabla 3. Secuencias codificantes de toxinas y secuencias de proteínas correspondientes utilizadas para su expresión en *Bt* y *E. coli*.**

Toxina	Secuencia codificante de ADN SEQ ID NO:	Proteína SEQ ID NO:	Huésped de expresión bacteriana
TIC6757	1	2	<i>Bt</i>
TIC7472	7	8	<i>Bt</i>
TIC7473	11	12	<i>Bt</i>
TIC6757_His	5	6	<i>E. coli</i>
TIC7472_His	9	10	<i>E. coli</i>
TIC7473_His	13	14	<i>E. coli</i>

Ejemplo 2

TIC6757, TIC7472 y TIC7473 demuestran la actividad de lepidópteros en ensayos biológicos de insectos

Se expresaron las proteínas pesticidas TIC6757, TIC7472 y TIC7473 en *Bt* y *E. coli* y se sometieron a ensayos para determinar su toxicidad para varias especies de Lepidoptera, Coleóptera y Hemíptera. Las preparaciones de cada toxina de *Bt* se evaluaron contra las especies lepidópteras de gusano soldado (BAW, *Spodoptera exigua*), gusano

5 cortador grasierto (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano medidor de la hoja del algodonero (CLW, *Alabama argillacea*), palomilla dorso de diamante (DBM, *Plutella xylostella*), taladro del maíz (ECB, *Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), cogollero del maíz resistente a Cry1Fa1 (FAWR1, *Spodoptera frugiperda*), gusano cogollero (AWB, *Helicoverpa armigera*), gusano rosado (PBW, *Pectinophora gossypiella*), gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano moteado (SBW, *Earias vittella*), barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*), gusano bellotero (TBW, *Heliothis virescens*), gusano gris del tabaco (TCW, *Spodoptera litura*, también conocido como gusano defoliador) y oruga del frijol terciopelo (VBW, *Anticarsia gemmatalis*); las especies coleópteras de escarabajo de patata de Colorado (CPB, *Leptinotarsa decemlineata*), gusano de la raíz del maíz (WCB, *Diabrotica virgifera virgifera*); y las especies de hemípteros de chinche de la hoja (TPB, *Lygus lineolaris*), chinche de la hoja occidental (WTP, *Lygus hesperus*), chinche marrón (NBSB, *Euschistus heros*) y chinche verde (GSB, *Nezara viridula*).

10 Se evaluó la bioactividad de las proteínas pesticidas TIC6757, TIC7472 y TIC7473 mediante la producción de la proteína en un hospedador de expresión de *E. coli* o *Bt*. En el caso del hospedador de *Bt*, se cultivó una cepa de *Bt* que expresa TIC6757, TIC7472 o TIC7473 durante veinticuatro (24) horas y luego se añadió el cultivo a la dieta del insecto. Se evaluó la mortalidad y el debilitamiento comparando el crecimiento y desarrollo de insectos con una dieta del cultivo de la cepa de *Bt* que expresa TIC6757, TIC7472 o TIC7473 a insectos con una dieta de un cultivo de control no tratado. Las cepas de *E. coli* que expresan TIC6757, TIC7472 o TIC7473 se trataron de manera similar y también se proporcionaron en una dieta del insecto. La actividad del ensayo biológico observada para cada proteína de la preparación de *Bt* o *E. coli* o ambas preparaciones se presenta en las Tablas 4 y 5 a continuación, en las que "+" indica la actividad y "NT" indica que la toxina no se evaluó contra esa plaga de insecto específica.

20 25 **Tabla 4. Actividad en ensayo biológico de TIC6757, TIC7472 y TIC7473 contra plagas de insectos.**

Toxina	BAW	BCW	CEW	CLW	DBM	ECB	FAW	FAWR1	AWB	PBW	SAW	SBL
TIC6757	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
TIC7472	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+
TIC7473	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	NT	NT	NT	+	+

30 **Tabla 5. Actividad de ensayo biológico de TIC6757, TIC7472 y TIC7473 contra plagas de insectos.**

Toxina	SBW	SWCB	TBW	TCW	VBC	CPB	WCR	TPB	WTP	NBSB	SGB
TIC6757	+	+	+	+	+						
TIC7472	NT	+		NT	NT		NT			NT	NT
TIC7473	NT	+		NT	NT		NT			NT	NT

Como se puede observar en las Tablas 4 y 5 que anteceden, la toxina de insecto TIC6757 demostró actividad contra varias plagas de insectos de lepidópteros (BAW, BCW, CEW, CLW, DBM, ECB, FAW, FAWR1, AWB, SAW, SBL, SBW, SWCB, TBW, TCW y VBC). Se observó actividad para la mayoría de las plagas evaluadas con TIC7472 y TIC7473 (CEW, FAW, SAW, SBL, SWCB).

Ejemplo 3

35 **Ensayo de actividad de TIC6757PL contra plagas de lepidópteros en plantas de maíz transformadas de manera estable**

30 Se clonaron vectores de transformación de plantas binarios que comprenden casetes transgénicos diseñados para expresar proteína pesticida TIC6757PL tanto dirigida como no dirigida a plástidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se utilizaron los vectores resultantes para transformar de forma estable plantas de maíz. Se cosecharon tejidos de los transformantes y se utilizaron en ensayos biológicos de insectos contra varias plagas de insectos lepidópteros.

40 Las secuencias de codificación sintéticas se construyeron para ser utilizadas en la expresión de la proteína codificada en plantas, se clonaron en un vector de transformación de plantas binario y se utilizaron para transformar células de

plantas de maíz. Las secuencias sintéticas se sintetizaron de acuerdo con procedimientos descritos generalmente en la patente estadounidense 5.500.365 para evitar determinadas secuencias problemáticas perjudiciales, tales como secuencias de poliadenilación de plantas ricas en A/T y ATTTA y conservar al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos de la proteína *Paenibacillus* nativa. Las secuencias de codificación sintéticas codificaron una proteína 5 TIC6757PL que comprende un resto de alanina adicional inmediatamente después de la metionina de inicio con respecto a la proteína TIC6757. En el caso de la proteína dirigida a plástidos, la secuencia codificante de proteína pesticida TIC6757PL se une de forma operativa en marco con una secuencia codificante de péptido señal que selecciona como diana cloroplastos. Los vectores de transformación de plantas resultantes comprendían un primer casete transgénico para expresión de la proteína pesticida TIC6757PL que comprendía un promotor constitutivo 10 enlazado de forma operativa en dirección 5' con un líder, enlazado de forma operativa en dirección 5' con un intrón, enlazado de forma operativa en dirección 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC6757PL dirigida o no dirigida a plástidos que, a su vez, se enlaza de forma operativa en dirección 5' a 3' UTR; y un 15 segundo casete transgénico para la selección de células vegetales transformadas mediante selección de glifosato. Se presenta la secuencia codificante sintética para la proteína pesticida TIC6757PL como SEQ ID NO:3 y codifica la proteína presentada como SEQ ID NO:4.

Las plantas de maíz se transformaron con cuatro vectores de transformación binarios diferentes tal como se describió anteriormente con un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las construcciones 1 y 3 de vector de transformación vegetal binario comprendían una secuencia de codificación que codifica una proteína TIC6757PL dirigida a plástido, al tiempo que las construcciones 2 y 4 comprendían una secuencia codificante que codifica una proteína TIC6757PL no dirigida. Se induce a las células transformadas a formar platas mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se llevaron a cabo ensayos biológicos con discos de hojas de plantas análogos a los descritos en la patente estadounidense n.º 8.344.207. Se colocó una única larva neonata recién salida del huevo de menos de un día de edad en cada muestra de disco de hoja y se permitió que se alimentara durante aproximadamente cuatro días. Se utilizó una planta de maíz no transformada para obtener tejido para utilizar como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de inserción de una copia R₀ de transformación de cada vector binario contra gusano cortador grasiendo (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*) y barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*).

Las plantas R₀ transformadas que expresan TIC6757PL fueron muy eficientes (lo que se define por tener un daño de hoja de diecisiete coma cinco por ciento o menos con cien por ciento de mortalidad) contra las cuatro plagas de insectos evaluadas tal como se ilustra en la Tabla 6. Se define penetrancia elevada (indicada con "(H)") como que más de cincuenta por ciento de los eventos evaluados para cada construcción presente diecisiete coma cinco por ciento de daño de hoja o menos con cien por ciento de mortalidad. Se define penetrancia baja (indicada con "(L)") como que cincuenta por ciento o menos de los eventos evaluados para cada construcción presente diecisiete coma cinco por ciento de daño de hoja o menos con cien por ciento de mortalidad.

35 **Tabla 6. Cantidad de eventos con expresión de TIC6757 con ≤ 17,5 % de daño de hoja con cien por ciento de mortalidad y penetrancia.**

		Cantidad de eventos con ≤ 17,5 % de daño de hoja con 100 % de mortalidad (penetrancia)			
Construcción	Cantidad total de eventos	BCW	CEW	FAW	SWC
Construcción 1	22	17 (H)	18 (H)	18 (H)	11 (L)
Construcción 2	20	14 (H)	14 (H)	14 (H)	4 (L)
Construcción 3	19	17 (H)	17 (H)	17 (H)	17 (H)
Construcción 4	20	16 (H)	16 (H)	15 (H)	7 (L)

40 Se permitió que eventos R₀ seleccionados derivados de la construcción 1 (dirigido a plástido) y la construcción 2 (no dirigido a plástido) de R₀ se autopolinizaran y se produjo la descendencia F₁. Se seleccionaron varias plantas de la descendencia F₁ heterocigotas de cada evento R₀ para ensayos biológicos de discos de hoja y se evaluaron contra gusano cortador grasiendo (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*) y barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*). La Tabla 7 que se encuentra más adelante ilustra el porcentaje promedio de daño de hoja y la mortalidad promedio para cada planta derivada de cada construcción/evento. Se hace referencia a las plantas de descendencia F₁ respecto al evento R₀.

45 Por ejemplo, el "Evento-1_1" es la primera planta de descendencia F₁ heterocigota derivada del Evento-1 y el "Evento-1_2" es la primera planta de descendencia F₁ heterocigota derivada del Evento-1. "N" representa la cantidad de muestras de cada planta utilizada en el ensayo. Tal como se puede ver en las Tablas 7 y 8, la mayoría de las plantas derivadas de cada evento R₀ presentó no más de cinco por ciento de daño de hoja y cien por ciento de mortalidad contra BCW, CEW y FAW. Respecto a SWCB, múltiples plantas derivadas de cada evento R₀ presentaron menos de diez por ciento de daño de hoja y más de cincuenta por ciento de mortalidad en el ensayo.

Tabla 7. Porcentaje promedio de daño de hoja y mortalidad en descendencia F₁ derivada de eventos R₀ con expresión de TIC6757PL seleccionados.

Construcción	Evento_Planta	N	BCW		CEW	
			% promedio de daño de hoja	Mortalidad promedio	% promedio de daño de hoja	Mortalidad promedio
Construcción 1	Evento-1_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 1	Evento-1_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 1	Evento-1_3	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 1	Evento-1_4	3	5,00	100,00	6,65	100,00
Construcción 1	Evento-2_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 1	Evento-2_2	3	NT	NT	7,50	100,00
Construcción 1	Evento-2_3	3	NT	NT	8,35	100,00
Construcción 2	Evento-3_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-3_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-4_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-4_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-4_3	3	6,65	66,67	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-4_4	3	6,65	66,67	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-4_5	3	20,00	33,33	10,00	100,00
Construcción 2	Evento-5_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-5_2	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-5_3	3	5,00	100,00	5,00	100,00
NINGUNO	Control negativo	3	55,00	0,00	55,00	0,00

Tabla 8. Porcentaje promedio de daño de hoja y mortalidad en descendencia F₁ derivada de eventos R₀ con expresión de TIC6757PL seleccionados.

Construcción	Evento_Planta	N	FAW		SWCB	
			% promedio de daño de hoja	Mortalidad promedio	% promedio de daño de hoja	Mortalidad promedio
Construcción 1	Evento-1_1	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Construcción 1	Evento-1_2	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Construcción 1	Evento-1_3	3	5,00	100,00	7,50	50,00
Construcción 1	Evento-1_4	3	5,00	100,00	8,35	66,67
Construcción 1	Evento-2_1	3	5,00	100,00	5,00	50,00
Construcción 1	Evento-2_2	3	5,00	100,00	5,00	50,00
Construcción 1	Evento-2_3	3	5,00	100,00	6,65	66,67
Construcción 2	Evento-3_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-3_2	3	5,00	100,00	15,00	50,00
Construcción 2	Evento-4_1	3	5,00	100,00	12,50	0,00
Construcción 2	Evento-4_2	3	5,00	100,00	40,00	100,00
Construcción 2	Evento-4_3	3	5,00	100,00	48,35	0,00
Construcción 2	Evento-4_4	3	5,00	100,00	55,00	0,00
Construcción 2	Evento-4_5	3	5,00	100,00	55,00	0,00
Construcción 2	Evento-5_1	3	5,00	100,00	5,00	100,00
Construcción 2	Evento-5_2	3	5,00	100,00	6,65	66,67

(continuación)

			FAW		SWCB	
Construcción	Evento_Planta	N	% promedio de daño de hoja	Mortalidad promedio	% promedio de daño de hoja	Mortalidad promedio
Construcción 2	Evento-5_3	3	5,00	100,00	8,35	0,00
NINGUNO	Control negativo	3	55,00	0,00	51,65	0,00

- 5 Se permitió que eventos R_0 seleccionados derivados de la construcción 3 (dirigida a plástido) y la construcción 4 (dirigida a plástido) se autopolinizaran y se produjo la descendencia F_1 . Se seleccionó una planta de descendencia F_1 heterocigota de cada evento R_0 para ensayos biológicos de disco de hoja y se evaluó contra gusano cortador occidental del frijol (WBC, *Striacosta albicosta*). La Tabla 9 muestra el porcentaje promedio de daño de hoja y el porcentaje promedio de mortalidad de la planta de descendencia F_1 de cada evento R_0 y el control negativo. "N" representa la cantidad de muestras de cada planta utilizada en el ensayo.

10 **Tabla 9. Porcentaje promedio de daño de hoja y porcentaje promedio de mortalidad en descendencia F_1 derivada de eventos R_0 con expresión de TIC6757PL seleccionados.**

Construcción	Evento	N	% promedio de daño de hoja	Mortalidad promedio
Construcción 3	Evento-6_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-7_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-8_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-9_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-10_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-11_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-12_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-13_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-14_1	4	5,00	100,00
Construcción 3	Evento-15_1	4	27,50	50,00
Construcción 4	Evento-16_1	4	5,00	100,00
Construcción 4	Evento-17_1	4	5,00	100,00
Construcción 4	Evento-18_1	4	5,00	100,00
Control negativo		4	45,00	0,00

Tal como se puede ver en la Tabla 9 anterior, a excepción de una, todas las plantas de descendencia F_1 de cada evento R_0 evaluadas contra WBC presentaron no más de cinco por ciento de daño de hoja y cien por ciento de mortalidad.

- 15 20 25 Se evaluaron las plántulas derivadas de plantas de descendencia F_1 heterocigotas seleccionadas transformadas con la construcción 3 (dirigida a plástido) y la construcción 4 (no dirigida) para determinar su resistencia contra gusano cortador grasiendo (BCW, *Agrotis ipsilon*). Se plantaron las semillas de la descendencia F_1 , así como las semillas no transformadas (control negativo), en macetas. Después de ocho días, cuando las plántulas emergieron del suelo, se infectó cada planta con tres BCW en tercer estadio. Se inspeccionaron las plantas catorce días después de la infestación para contar la cantidad de plantas afectadas negativamente por BCW. Se utilizaron en el ensayo sesenta y ocho plantas de descendencia F_1 de diez eventos R_0 diferentes transformadas con la construcción 3 y diez plantas de descendencia F_1 derivadas de cuatro eventos R_0 transformadas con la construcción 4. También se utilizaron quince plantas de control negativo en el ensayo. Después de la inspección de las plantas, se observó que BCW afectó de forma negativa al ochenta por ciento de los controles negativos y cero por ciento de las plantas de descendencia F_1 transformadas con cualquiera de la construcción 3 y la construcción 4 se vio afectado de forma negativa.

Lo anterior demuestra que las plantas de maíz transformadas que expresan TIC6757PL tienen mayor resistencia a plagas de insectos lepidópteros, en particular, gusano cortador grasiendo (*Agrotis ipsilon*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), barrenador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella*) y gusano cortador occidental (*Striacosta albicosta*).

30 **Ejemplo 4**

Ensayo de actividad de TIC6757PL contra plagas de lepidópteros en plantas de soja transformadas de manera estable

- 5 Se clonaron vectores de transformación de plantas binarios que comprenden casetes transgénicos diseñados para expresar proteína pesticida TIC6757PL tanto dirigida como no dirigida a plástidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se utilizaron los vectores resultantes para transformar de forma estable plantas de soja. Se cosecharon tejidos de los transformantes y se utilizaron en ensayos biológicos de insectos contra varias plagas de insectos lepidópteros.
- 10 La secuencia codificante sintética diseñada para la expresión de la planta como se describió en el Ejemplo 3 que antecede se clonó en vectores de transformación de plantas binarios y se utilizó para transformar células vegetales de soja. Se construyen vectores binarios que comprenden secuencias que codifican TIC6757PL dirigidas y no dirigidas a plástidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los vectores de transformación de plantas resultantes comprendieron un primer casete transgénico para expresión de la proteína pesticida TIC6757PL que comprende un promotor constitutivo enlazado de forma operativa en dirección 5' con un líder, enlazado de forma operativa en dirección 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC6757PL dirigida o no dirigida a plástidos, que a su vez está enlazada de forma operativa en dirección 5' a 3' UTR; y un segundo casete transgénico para la selección de células vegetales transformadas mediante selección de espectinomicina. Las construcciones 1, 3 y 5 comprendieron una secuencia codificante que codifica una proteína pesticida TIC6757PL no dirigida. Las construcciones 2, 4 y 6 comprendieron una secuencia codificante que codifica una proteína pesticida TIC6757PL dirigida a plástido.
- 15 20 Se induce a las células de soja transformadas a formar plantas mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se llevaron a cabo ensayos biológicos con discos de hojas de plantas análogos a los descritos en la patente estadounidense n.º 8.344.207. Se utilizó una planta de soja no transformada para obtener tejido para utilizar como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*) y gusano de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*).
- 25 30 Las plantas de soja R₀ transformadas que expresan TIC6757PL fueron muy eficientes (lo que se define por tener un daño de hoja de veinte por ciento o menos) contra SAW, SBL y SPW tal como se ilustra en la Tabla 10. Se define penetrancia elevada (indicada con "(H)") como que más de cincuenta por ciento de los eventos evaluados para cada construcción presente veinte por ciento de daño de hoja o menos. Se define penetrancia baja (indicada con L) como que cincuenta por ciento o menos de los eventos evaluados para cada construcción presente veinte por ciento de daño de hoja o menos.

Tabla 10. Cantidad de eventos con expresión de TIC6757PL con ≤ 20 % de daño de hoja y penetrancia.

		Cantidad de eventos con ≤ 20 % de daño de hoja (penetrancia)		
Construcción	Cantidad total de eventos	SAW	SBL	SPW
Construcción 1	15	14 (H)	14 (H)	12 (H)
Construcción 2	15	5 (L)	3 (L)	8 (H)
Construcción 3	15	12 (H)	13 (H)	13 (H)
Construcción 4	15	15 (H)	15 (H)	15 (H)
Construcción 5	15	14 (H)	13 (H)	14 (H)
Construcción 6	15	15 (H)	15 (H)	15 (H)

- 35 Se permitió que las plantas de soja transgénicas R₀ que expresan toxina proteica TIC6757PL seleccionadas derivadas de la transformación de las construcciones 3, 4, 5 y 6 se autopolinizaran y se produjeron semillas R₁. Se permitió que las semillas R₁ germinaran y produjeran plantas R₁. Se seleccionaron plantas R₁ homocigotas para el casete de expresión de TIC6757PL para ensayos biológicos de disco de hoja contra gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*) y oruga del frijol terciopelo (VBW, *Anticarsia gemmatalis*). Las Tablas 11 y 12 muestran el porcentaje promedio de daño de hoja demostrado por cada insecto para cada planta de descendencia R₁ y el control negativo, variedad A3555. Las Tablas 40 11 y 12 también muestran el promedio de error estándar (SEM) del porcentaje de daño de hoja demostrado por cada insecto para cada evento evaluado respecto al control negativo. "N" representa la cantidad de muestras de cada planta utilizada en el ensayo. "SEM" representa el error estándar del daño porcentual promedio.

Tabla 11. Porcentaje promedio de daño de hoja para plantas de soja R₁ que expresan TIC6757PL.

Construcción	Cantidad de eventos	Cantidad de plantas/eventos	SAW			SBL		
			N	% promedio de daño	SEM	N	% promedio de daño	SEM
Construcción 3	5	6	4	0,37	0,30	4	1,91	0,72
Construcción 4	8	6	4	0,31	0,25	4	1,25	0,34
Construcción 5	8	6	4	0,02	0,02	4	0,75	0,35
Construcción 6	8	6	4	0,76	0,34	4	0,97	0,35
Control negativo	Variedad A3555	8	4	87,93	9,74	4	79,44	12,44

Tabla 12. Porcentaje promedio de daño de hoja para plantas de soja R₁ que expresan TIC6757PL.

Construcción	Cantidad de eventos	Cantidad de plantas/eventos	SPW			VBC		
			N	% promedio de daño	SEM	N	% promedio de daño	SEM
Construcción 3	5	6	4	16,32	3,83	4	1,89	0,60
Construcción 4	8	6	4	2,25	0,30	4	0,96	0,31
Construcción 5	8	6	4	2,40	0,50	4	0,51	0,25
Construcción 6	8	6	4	3,65	0,53	4	0,71	0,32
Control negativo	Variedad A3555	8	4	97,25	1,09	4	88,88	10,30

- 5 Tal como se puede ver en las Tablas 11 y 12, las plantas de soja R₁ que expresan proteína de toxina TIC6757PL proveen mayor resistencia a SAW, SBL, SPW y VBC. Respecto a SAW, los cuatro eventos presentaron menos de uno (1) por ciento de daño de hoja, al tiempo que el control negativo presentó aproximadamente ochenta y ocho (88) por ciento de daño de hoja. Respecto a SBL, los cuatro (4) eventos presentaron menos de dos (2) por ciento de daño de hoja, al tiempo que el control presentó aproximadamente ochenta (80) por ciento de daño de hoja. Respecto a SPW, tres de los cuatro eventos presentaron menos de cuatro (4) por ciento de daño de hoja, al tiempo que el control presentó aproximadamente noventa y siete (97) por ciento de daño de hoja. Respecto a VBC, tres de los eventos presentaron menos de uno (1) por ciento de daño de hoja y un evento presentó menos de dos (2) por ciento de daño de hoja, al tiempo que el control negativo presentó cerca de ochenta y nueve (89) por ciento de daño de hoja.
- 10 Lo anterior demuestra que las plantas de soja transformadas que expresan TIC6757PL proveen mayor resistencia a insectos lepidópteros, en particular, gusano meridional (*Spodoptera eridania*), lagarta verde (*Chrysodeixis includens*), gusano de la soja (*Helicoverpa zea*) y oruga del frijol terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*).

Ejemplo 5

Ensayo de actividad de TIC6757PL contra plagas de lepidópteros en plantas de algodón transformadas de manera estable

- 20 Se clonaron vectores de transformación de plantas binarios que comprenden casetes transgénicos diseñados para expresar proteína pesticida TIC6757PL tanto dirigida como no dirigida a plástidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se utilizaron los vectores resultantes para transformar de forma estable plantas de algodón. Se cosecharon tejidos de los transformantes y se utilizaron en ensayos biológicos de insectos contra varias plagas de insectos lepidópteros.
- 25 La secuencia codificante sintética diseñada para la expresión de la planta como se describió en el Ejemplo 3 que antecede se clonó en vectores de transformación de plantas binarios y se utilizó para transformar células vegetales de algodón. Se construyen vectores binarios que comprenden secuencias que codifican TIC6757PL dirigidas y no dirigidas a plástidos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los vectores de transformación de plantas resultantes comprendieron un primer casete transgénico para expresión de la proteína pesticida TIC6757PL que comprende un promotor constitutivo enlazado de forma operativa en dirección 5' con un líder, enlazado de forma operativa en dirección 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC6757PL dirigida o no dirigida a plástidos, que a su vez está enlazada de forma operativa en dirección 5' a 3' UTR; y un segundo casete transgénico para la selección de células vegetales transformadas mediante selección de espectinomicina.
- 30

Se induce a las células de algodón transformadas a formar platas mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se llevaron a cabo ensayos biológicos con discos de hojas de plantas análogos a los descritos en la patente estadounidense n.º 8.344.207. Se utilizó una planta de algodón no transformada para obtener tejido para utilizar como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra gusano meridional, gusano del algodón (CBW, *Helicoverpa zea*), gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*) y gusano bellotero (TBW, *Heliothis virescens*).
5

Las plantas de algodón R₀ transformadas que expresan TIC6757PL fueron muy eficientes (lo que se define por tener un daño de hoja de diez por ciento o menos) contra CBW, FAW, SBL y TBW tal como se ilustra en la Tabla 13. Se define penetrancia elevada (indicada con "(H)") como que más de cincuenta por ciento de los eventos evaluados para cada construcción presente diez por ciento de daño de hoja o menos. Se define penetrancia baja (indicada con "(L)") como que cincuenta por ciento o menos de los eventos evaluados para cada construcción presente diez por ciento de daño de hoja o menos.
10

Tabla 13. Cantidad de eventos con expresión de TIC6757PL con ≤ 10% de daño de hoja y penetrancia.

	Cantidad de eventos con ≤ 10 % de daño de hoja/cantidad de eventos evaluados (penetrancia)			
Construcción	CBW	FAW	SBL	TBW
Construcción 1	22/25 (H)	21/24 (H)	21/25 (H)	21/25 (H)
Construcción 2	12/15 (H)	6/15 (L)	13/15 (H)	13/15 (H)
Construcción 3	7/13 (H)	8/14 (H)	4/13 (L)	6/14 (L)
Construcción 4	11/14 (H)	8/14 (H)	9/14 (H)	10/14 (H)
Construcción 5	20/25 (H)	19/23 (H)	20/24 (H)	19/23 (H)
Construcción 6	6/7 (H)	7/7 (H)	7/7 (H)	6/7 (H)
Construcción 7	22/25 (H)	22/25 (H)	22/25 (H)	22/25 (H)

15 **Ejemplo 6**

Ensayo de actividad de TIC7472PL y TIC7473PL contra plagas de lepidópteros en plantas de maíz transformadas de manera estable

Los vectores de transformación de plantas binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar proteína pesticida TIC7472PL o TIC7473PL tanto dirigida a plástidos como no dirigida a plástido se clonian usando procedimientos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se usan para transformar plantas de maíz de manera estable. Los tejidos cosechados a partir de los transformantes y usados en ensayo biológico de insecto contra varias plagas de insectos lepidópteros.
20

Las secuencias codificantes sintéticas se construyen para su uso en la expresión de la proteína codificada en plantas, se clonian en un vector de transformación de planta binario, y se usan para transformar células de planta de maíz. Las secuencias sintéticas se sintetizan de acuerdo con procedimientos descritos generalmente en la patente estadounidense 5.500.365, evitando determinadas secuencias problemáticas perjudiciales, tales como secuencias de poliadenilación de plantas ricas en A/T y ATTAA, conservando al mismo tiempo la secuencia de aminoácidos de la proteína *Paenibacillus* natural. Las secuencias de codificación sintética codifican una proteína TIC7472PL y TIC7473PL que comprenden un resto de alanina adicional inmediatamente después de la metionina de inicio con respecto a la proteína TIC7472 y TIC7473. Para la proteína dirigida a plástidos, la secuencia codificante de proteína pesticida TIC7472PL o TIC7473PL se une operativamente en marco con una secuencia codificante de péptido señal dirigida al cloroplasto. Los vectores de transformación de plantas resultantes comprenden un primer casete de transgén para expresión de la proteína pesticida TIC7472PL o TIC7473PL que comprende un promotor constitutivo, enlazado operativamente 5' con un líder, enlazado operativamente 5' con un intrón, enlazado operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC7472PL o TIC7473PL dirigida o no dirigida a plástidos, que a su vez está enlazada operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas usando selección de glifosato. La secuencia codificante sintética para la proteína pesticida TIC7472PL se presenta como la SEQ ID NO: 15 y codifica la proteína que se presenta como la SEQ ID NO: 16. Se presenta la secuencia codificante sintética para la proteína pesticida TIC7473PL como SEQ ID NO:17 y codifica la proteína presentada como SEQ ID NO:18.
25
30
35
40

Las plantas de maíz se transforman con los vectores de transformación binarios descritos anteriormente usando un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium*. Las células transformadas se inducen para formar plantas mediante los procedimientos conocidos en la técnica. Los ensayos biológicos que utilizan discos de hoja de planta se realizan de manera análoga a los descritos en la patente estadounidense n.º 8.344.207. Se usa una planta de maíz no transformada para obtener tejido que se usará como control negativo. Se evaluaron múltiples eventos de
45

transformación de cada vector binario contra gusano cortador grasiendo (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*), cogollero de maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*) y barrenador del maíz del suroeste (SWCB, *Diatraea grandiosella*), así como otras plagas de insectos lepidópteros.

- 5 Las plagas de insectos se observan para determinar la mortalidad y el debilitamiento provocados por la ingestión de los discos de hoja presentados que expresan TIC7472PL o TIC7473PL y en comparación con los discos de hoja derivados de las plantas de maíz no transformadas.

Ejemplo 7

Ensayo de actividad de TIC6757PL contra plagas de lepidópteros en plantas de soja y algodón transformadas de manera estable

- 10 Los vectores de transformación de plantas binarios que comprenden casetes de transgén diseñados para expresar proteína pesticida TIC7472PL o TIC7473PL tanto dirigida como no dirigida a plástidos se clonian usando procedimientos conocidos en la técnica. Los vectores resultantes se usan para transformar plantas de soja y de algodón de manera estable. Los tejidos se cosechan a partir de los transformantes y se usan en ensayo biológico de insectos contra varias plagas de insectos lepidópteros.

- 15 Las secuencias codificantes sintéticas diseñadas para la expresión de la planta como las que se describen en el Ejemplo 6 que antecede se clonian en vectores de transformación de plantas binarios, y se usan para transformar células vegetales de soja o algodón. Se construyen vectores binarios que comprenden secuencias que codifican TIC7472PL o TIC7473PL dirigida y no dirigidas a plástidos usando los procedimientos conocidos en la técnica. Los vectores de transformación de plantas resultantes comprenden un primer casete de transgén para expresión de la proteína pesticida TIC7472 o TIC7473PL que comprende un promotor constitutivo, enlazado operativamente 5' con un líder, enlazado operativamente 5' con una secuencia codificante sintética que codifica una proteína TIC7472PL o TIC7473PL dirigida o no dirigida a plástidos, que a su vez está enlazada operativamente 5' a 3' UTR; y un segundo casete de transgén para la selección de células vegetales transformadas usando selección de espectinomicina. Las construcciones 1, 2 y 7 comprendieron una secuencia de clonación que codifica una proteína pesticida TIC6757PL no dirigida. Las construcciones 3, 4, 5 y 6 comprendieron una secuencia codificante que codifica una proteína pesticida TIC6757PL dirigida.

- 30 Las células de soja o algodón transformadas se inducen para formar plantas mediante los procedimientos conocidos en la técnica. Los ensayos biológicos que utilizan discos de hoja de planta se realizan de manera análoga a los descritos en la patente estadounidense n.º 8.344.207. Se usa una planta de soja o algodón no transformada para obtener tejido que se usará como control negativo. Se evalúan múltiples eventos de transformación de cada vector binario contra gusano meridional (SAW, *Spodoptera eridania*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano de la soja (SPW, *Helicoverpa zea*), cogollero de maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), lagarta verde (SBL, *Chrysodeixis includens*), gusano bellotero (*Heliothis virescens*), gusano del algodón (CBW, *Helicoverpa zea*) y oruga del frijol terciopelo (VBW, *Anticarsia gemmatalis*), así como otras plagas de insectos lepidópteros. Las plagas de insectos se observan para determinar la mortalidad y el debilitamiento provocados por la ingestión de los discos de hoja presentados que expresan TIC7472PL o TIC7473PL y en comparación con los discos de hoja derivados de las plantas de soja o algodón no transformadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Monsanto Technology LLC Bowen, David J Catherine, Chay A Todd, Ciche A Uma, Kesanapalli R Jennifer, Lutke L

<120> PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE INSECTOS NOVEDOSAS

<130> 38-21(61627)-0001

<150> US 62/210.737

<151> 27-08-2015

- 45 <160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2394

<212> ADN

- 50 <213> *Paenibacillus popilliae*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (2394)

<223> Secuencia de ADN derivada de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC004343 que codifica TIC6757.

ES 2 892 627 T3

<400> 1

atgaaggcaga ataataaattt tagtgtaagg gcottaccaa gtttattga tgttttaat	60
ggaatttatg gtttgccac tggcattcaa gatattttt acatgatttt tggAACAGAT	120
acaggtgatc taacactaga agaagttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct	180
ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat	240
acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaacgt attaactgat	300
gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca	360
aatatgttaa gcgtatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaaattt agaatatctc	420
agtaaacaac tacaggagat atcagataaa ctgtatgtta ttaacttaaa tgtactcatt	480
aactctacac tcacagaaaat cactcctgct tatcaacgtt taaaatatgt aatgaaaaaa	540
tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac	600
attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaacttagc gaaaagtgtt	660
acaaaaaaaaatg acatggatag tttcgagttt tatctccata cattccatgttgtattgatt	720
ggcaataatt tatttggtcg ttccggcttta aaaacagctg cagaatttgc tactaaagac	780
gagataaaga cgagtggaaag tgagatagga aaagtttata gtttcttaat tgtactaact	840
tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaatttattt gggcttatca	900

gatattgatt atactaatat tctaaatcg catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt	960
gataacatac ttccctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata	1020
ggtagtgata attatgc当地 agttatTTT gaagctgaac caggatatgc tttagttgga	1080
tttggaaatta tcaatgatcg aatcccgtt taaaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa	1140
aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaaacta	1200
ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatata tatactaaaa gtctgacatt tcctgatggc	1260
tatgttatta ctaagattac ctTTGaaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca	1320
gcaaattttt atgacccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct	1380
acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tttttacatg	1440
ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttgc tctccaaatta atagtttga attagaagtt	1500
gacgagaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaatctt atttacgaga atatttatta	1560
gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaatgt ttttatcagt	1620
aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac	1680
aagaatgcac atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa	1740
ggtgatgggg aattttcaca atttatttggaa gataaattaa aaccaaatac agattatatt	1800
attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatatt	1860
actatgtacg aagatacataa cggtagttct gaagaatttc aaactatagc tgtaaatttat	1920
acttcagaaa ctgatccttc acaaacacat ttagtttta aaagtcaaag tggctatgag	1980
gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggtcca	2040
gaattgataa aatttgcata ttggatttagt ttgggtacta cttacattag agatgatgta	2100
cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctctaaatt agacagctat	2160
tcaacttata atttgcattt ttcttttct ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat	2220
tccccacggag tagtattgtt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatacgt agatattgt	2280
gaaagttta ctaccacatc aaataaagaa ggattttta tagaactaac gggcgatagt	2340
cgtggtggtt ttgggtcggtt ccgtgatTTT tctatgaagg aaaagtttga ataa	2394

<210> 2

<211> 797

<212> PRT

5 <213> *Paenibacillus popilliae*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(797)

10 <223> Secuencia de aminoácidos de TIC6757 derivada de la secuencia codificante de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC004343 que codifica TIC6757.

<400> 2

ES 2 892 627 T3

Met Lys Gln Asn Asn Asn Phe Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile
1 5 10 15

Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp Ile
20 25 30

Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Asp Leu Thr Leu Glu Glu
35 40 45

Val Leu Lys Asn Gln Glu Leu Leu Tyr Asp Ile Ser Gly Lys Leu Glu
50 55 60

Gly Ile Ser Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Asn
85 90 95

Val Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ser Met Leu
100 105 110

His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Val Met Lys
115 120 125

Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu
130 135 140

Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu Ile
145 150 155 160

Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr
165 170 175

Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr Leu
180 185 190

Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu Glu
195 200 205

Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp
210 215 220

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile
225 230 235 240

Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu

ES 2 892 627 T3

245

250

255

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
 260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
 275 280 285

Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr
 290 295 300

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
 305 310 315 320

Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn Tyr
 325 330 335

Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ala
 340 345 350

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val
 370 375 380

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu
 420 425 430

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
 435 440 445

Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu Gln
 450 455 460

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
 465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
 485 490 495

ES 2 892 627 T3

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
530 535 540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
545 550 555 560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
565 570 575

Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys
580 585 590

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
610 615 620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
625 630 635 640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
645 650 655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
660 665 670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
675 680 685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
690 695 700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
705 710 715 720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser Asn
 755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
 770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
 785 790 795

<210> 3

<211> 2397

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN sintética diseñada para expresión en plantas que codifica TIC6757PL con un resto de alinina adicional insertado en la posición 2 con respecto a la secuencia de aminoácidos bacteriana de TIC6757 derivada de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC004343 que codifica TIC6757.

10 <400> 3

atggctaaggc	agaacaacaa	cttctccgtg	cgcgcgtc	cgtcggtcat	cgacgttttc	60
aacggcatct	acgggttcgc	caccggcatc	caggacatct	tcaacatgtat	tttcggcacc	120
gacacggcg	acctcacgt	ggaggaggtg	ctcaagaacc	aggaactgt	ctacgacatc	180
tcgggcaaggc	tggagggcat	ctccggcgac	ctcagcgaaa	ttatcgcgca	aggaaacctc	240
aacacggaggc	tggcgaaaga	gctgctcaag	atcgccaacg	agcagaacaa	cgtgctgacg	300
gacgtgaaca	acaagctcaa	cgcgatcaac	tcgatgctcc	acatctacct	cccaaagatt	360
acgaacatgc	tgtccgacgt	catgaagcag	aactatgcc	tcaagcctcca	gatcgagtac	420
ctctcgaagc	agctccagga	gatttcggat	aagctggacg	tcatcaacct	gaacgtgctg	480
ataaaactcca	cgctcacgga	gatcactccg	gcctaccaggc	gcatcaagta	cgtgaacgag	540
aagttcgacg	agctgacact	ggcgactgag	aagaccctcc	gcccggcaagca	agggtcccgag	600
gacatcattg	cgaacgacac	gctggagaac	ttgacggagt	tgaccgagct	ggccaaagagc	660
gtgacgaaga	acgacatgga	cagttcgag	ttctacctcc	acactttcca	cgacgtgctg	720
atcggcaaca	acctttcgg	ccggagcg	ctcaagaccg	cagccgagct	gattacgaag	780
gacgagatca	agacccctgg	gtccgagatc	ggaaagggtgt	acagcttctt	gatcgctc	840
acgtgcttac	aagctaaggc	gttcctcacc	ctgaccgcct	gccgtaagct	gttgggcctg	900
tccgacatcg	actacaccaa	cattctcaac	cagcacctca	acgacgagaa	gaacgtcttt	960
cgggacaaca	tcctccccac	actgagcaac	aagttcagta	acccgaaacta	cgtcaagacg	1020
attggcagcg	acaactacgc	caaggttac	ctagaggccg	agccgggtta	cggccctggc	1080
gggttcgaga	tcatcaacga	cgcgcattccg	gtcctcaagg	cgtacaaggc	caagctcaag	1140

ES 2 892 627 T3

cagaactacc aagtggacca ccagagcctc agcgagatcg tgtacctgga catcgacaag 1200
 ttgttctgcc cgaagaactc ggagcagaag tattacacca agagcctgac cttccggac 1260
 ggctacgtta ttacaaagat cacgtcgag aagaagctca acaacctccg ttacgaggca 1320
 actgccaact tctacgaccc gtccaccggc gacattgact tgaacgagaa gcaagtcgag 1380
 tccacgttcc tccaggccga ctacatcagc atcaacgtca gcgacgacga cggcgtgtac 1440
 atgcccgtcg gagtcatcag cgagaccctc ctcagccgaa tcaactcggtt cgagctggag 1500
 gtggacgaga agtccaagat tctcacccctg acctgcaaga gctacctccg ggaataccctc 1560
 ctggagagcg acctcatcaa taaggagact tcgctcatag ctccgccccaa cgtcttcatc 1620
 tccaaacatcg tcgagaactg gaacatcgag gccgacaacc tggagccgtg ggtggcaaacc 1680
 aacaagaacg cctacgtgga ctccaccggc gggatcgagg gaagcaaggc cctgttacc 1740
 cagggcgacg gtgagttctc gcagttcatc ggcgacaaggc tcaagcccaa cacggactac 1800
 atcatccagt acaccgtcaa gggcaagcca gcgcatttacc tcaagaacaa gaacaccggg 1860
 tacaccatgt acgaggacac gaacggcaggc agcgaggagt tccagaccat cgccgtcaac 1920
 tacacccctcg agaccgtatcc ctcccgatcc cacattgtt tcaagtcctt gaggcgctac 1980
 gagggcggtgg ggcgacaactt catcatcctg gagtgcaagg cttagagac tcccgagggc 2040
 ccggagctta tcaagttcga tgactggatt tcgtttggca ccacotacat ccgggacgac 2100
 gtgctaacca tcgacccgtc gcgcggcgcc tactccgccc aaagcctcaa gctggactcg 2160
 tactccacgt acaacctatc tttcagcttc tcgggcctgt gggcgaagggt gattatcaag 2220
 aactcgcacg gcgtggctct gttcgagaag gtctcccagc agtcgtcata cgtggacatc 2280
 agcgagtcct tcaccaccac cagcaacaag gagggctt tcatcgagct gaccggcgac 2340
 tcgcgcggcg ggtcggctc cttcccgac ttctccatga aggagaaatt cgagtga 2397

<210> 4

<211> 798

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de TIC6757PL codificada por una secuencia de ADN sintética en la que se ha insertado un resto de alanina en la posición 2 con respecto a la secuencia de aminoácidos de TIC6757.

<400> 4

Met	Ala	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe
1				5					10					15	

Ile	Asp	Val	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Gly	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Gln	Asp
		20						25						30	

ES 2 892 627 T3

Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Asp Leu Thr Leu Glu
35 40 45

Glu Val Leu Lys Asn Gln Glu Leu Leu Tyr Asp Ile Ser Gly Lys Leu
50 55 60

Glu Gly Ile Ser Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu
65 70 75 80

Asn Thr Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn
85 90 95

Asn Val Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ser Met
100 105 110

Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Val Met
115 120 125

Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln
130 135 140

Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu
145 150 155 160

Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys
165 170 175

Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr
180 185 190

Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu
195 200 205

Glu Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn
210 215 220

Asp Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu
225 230 235 240

Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu
245 250 255

Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys
260 265 270

Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe
275 280 285

ES 2 892 627 T3

Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp
290 295 300

Tyr Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe
305 310 315 320

Arg Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn
325 330 335

Tyr Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu
340 345 350

Ala Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg
355 360 365

Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln
370 375 380

Val Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys
385 390 395 400

Leu Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu
405 410 415

Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys
420 425 430

Leu Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser
435 440 445

Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu
450 455 460

Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr
465 470 475 480

Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser
485 490 495

Phe Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys
500 505 510

Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys
515 520 525

Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val

ES 2 892 627 T3

530

535

540

Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn
 545 550 555 560

Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys
 565 570 575

Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp
 580 585 590

Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly
 595 600 605

Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr
 610 615 620

Glu Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn
 625 630 635 640

Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser
 645 650 655

Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys
 660 665 670

Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp
 675 680 685

Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile
 690 695 700

Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser
 705 710 715 720

Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys
 725 730 735

Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser
 740 745 750

Gln Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser
 755 760 765

Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly
 770 775 780

Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
 785 790 795

<210> 5
<211> 2454
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 892 627 T3

ccgttaggcg ttatcagcga aacattttg tctccaatta atagtttga attagaagtt	1560
gacgagaaaat cgaaaatctt aacttaaca tgtaaatctt atttacgaga atatttatta	1620
gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgccataatgt ttttatcagt	1680
aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac	1740
aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa	1800
ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt	1860
attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatat	1920
actatgtacg aagatacacaa cggtagttct gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat	1980
acttcagaaa ctgatccttc acaaacacat ttagttta aaagtcaaag tggctatgag	2040
gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggtcca	2100
gaattgataa aatttcatgtga ttggattagt ttggacta cttacattag agatgtatgt	2160
cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat	2220
tcaacttata attttagctt ttctttctt ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat	2280
tcccacggag tagtattgtt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatacgt agatattagt	2340
gaaagttta ctaccacatc aaataaagaa ggattttta tagaactaac gggcgatagt	2400
cgtggtggtt ttgggtcggtt ccgtgatTTT tctatgaagg aaaagttga ataa	2454

<210> 6

<211> 817

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de una proteína TIC6757 marcada con histidina.

<400> 6

Met His His His His His His His His Gly Thr Glu Thr Val			
1	5	10	15

Arg Phe Gln Ser Met Lys Gln Asn Asn Asn Phe Ser Val Arg Ala Leu			
20	25	30	

Pro Ser Phe Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly			
35	40	45	

Ile Gln Asp Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Asp Leu			
50	55	60	

Thr Leu Glu Glu Val Leu Lys Asn Gln Glu Leu Leu Tyr Asp Ile Ser			
65	70	75	80

ES 2 892 627 T3

Gly Lys Leu Glu Gly Ile Ser Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln
 85 90 95

Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn
 100 105 110

Glu Gln Asn Asn Val Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile
 115 120 125

Asn Ser Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser
 130 135 140

Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu
 145 150 155 160

Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu
 165 170 175

Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln
 180 185 190

Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr
 195 200 205

Glu Lys Thr Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn
 210 215 220

Asp Thr Leu Glu Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Asp Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His
 245 250 255

Asp Val Leu Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr
 260 265 270

Ala Ala Glu Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu
 275 280 285

Ile Gly Lys Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala
 290 295 300

Lys Ala Phe Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser
 305 310 315 320

Asp Ile Asp Tyr Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys
 325 330 335

ES 2 892 627 T3

Asn Val Phe Arg Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser
340 345 350

Asn Pro Asn Tyr Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val
355 360 365

Ile Leu Glu Ala Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile
370 375 380

Asn Asp Arg Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln
385 390 395 400

Asn Tyr Gln Val Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp
405 410 415

Ile Asp Lys Leu Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr
420 425 430

Lys Ser Leu Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe
435 440 445

Glu Lys Lys Leu Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr
450 455 460

Asp Pro Ser Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser
465 470 475 480

Thr Phe Leu Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp
485 490 495

Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro
500 505 510

Ile Asn Ser Phe Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr
515 520 525

Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu
530 535 540

Ile Asn Lys Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser
545 550 555 560

Asn Ile Val Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp
565 570 575

Val Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu

ES 2 892 627 T3

580	585	590
 Gly Ser Lys Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe 595 600 605		
 Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr 610 615 620		
 Val Lys Gly Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr 625 630 635 640		
 Thr Met Tyr Glu Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile 645 650 655		
 Ala Val Asn Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val 660 665 670		
 Phe Lys Ser Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile 675 680 685		
 Leu Glu Cys Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys 690 695 700		
 Phe Asp Asp Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val 705 710 715 720		
 Leu Thr Ile Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys 725 730 735		
 Leu Asp Ser Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu 740 745 750		
 Trp Ala Lys Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu 755 760 765		
 Lys Val Ser Gln Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr 770 775 780		
 Thr Thr Ser Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser 785 790 795 800		
 Arg Gly Gly Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe 805 810 815		

Glu

<210> 7

<211> 2394
<212> ADN
<213> *Paenibacillus popilliae*

5	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) .. (2394)	
	<223> Secuencia de ADN derivada de la cepa de <i>Paenibacillus popilliae</i> DSC007648 que codifica TIC7472.	
	<400> 7	
	atgaagcaga ataataattt tagtgtaagg gccttaccaa gtttattga tgttttaat	60
	ggaatttatg atttgccac tggcattcaa gatattttt acatgatttt tggaacagat	120
	acaggtgatc taacactaga agaagttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct	180
	ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat	240
	acagaatttag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaatgagc agaacaacgt attaactgat	300
	gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca	360
	aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaaatt agaatatctc	420
	agtaaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt	480
	aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgta taaaatatgt aatgaaaaaa	540
	tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaaagag caaaacaagg tagcgaagac	600
	attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaactagc gaaaagtgt	660
	acaaaaaatg acatggatag tttcgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt	720
	ggcaataatt tatttggtcg ttccgcttta aaaacagctg cagaattgt tactaaagac	780
	gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagttata gtttcttaat tgtactaact	840
	tgtctacaag caaaagcctt tctcacttta acggcatgcc gaaaattatt gggcttatca	900
	gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttctg	960
	gataacatac ttccctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata	1020
	ggtagtgata attatgcataa agttattttt gaagctgaac caggatatgc tttagttgga	1080
	tttgaaatta tcaatgatcg aatcccggta taaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa	1140
	aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaaacta	1200
	ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat tatactaaaa gtctgacatt tcctgatggc	1260
	tatgttatta ctaagattac ctgtaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca	1320
	gcaaattttt atgacccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct	1380
	acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tggatcatg	1440
	ccgttaggcg ttatcagcga aacattttg tctccaatta atagtttga attagaagtt	1500

gacgagaaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaatctt atttacgaga atatttatta 1560
 gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaattgt ttttatcagt 1620
 aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac 1680
 aagaatgcat atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa 1740
 ggtgatgggg aattttcaca atttattgga gataaattaa aaccaaatac agattatatt 1800
 attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggatata 1860
 actatgtacg aagatacataa cggtagttct gaagaatttc aaactatacg tgtaaattat 1920
 acffcagaaa ctgatccccc acaaacacat ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag 1980
 gcttgggggg acaactttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggtcca 2040
 gaattgataa aatttgatga ttggattagt ttggacta cttacattag agatgatgta 2100
 cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat 2160
 tcaacttata atttgagctt ttctttttct ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat 2220
 tccccacggag tagtattgtt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatacgt agatattaaat 2280
 gaaagttta ctaccacatc aaataaagaa ggattttta tagaactaac gggcgatagt 2340
 cgtggtggtt ttgggtcggtt ccgtgatTTT tctatgaagg aaaagttga ataa 2394

<210> 8

<211> 797

<212> PRT

5 <213> *Paenibacillus popilliae*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(797)

10 <223> Secuencia de aminoácidos de TIC7472 derivada de secuencia codificante de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC007648 que codifica TIC7472.

<400> 8

Met	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	Ile
1						5			10					15	

Asp	Val	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Asp	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Gln	Asp	Ile
					20				25				30		

Phe	Asn	Met	Ile	Phe	Gly	Thr	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu
						35		40					45		

Val	Leu	Lys	Asn	Gln	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu
						50		55					60		

Gly	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Leu	Asn
							65	70			75		80		

ES 2 892 627 T3

Thr Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn Asn
85 90 95

Val Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ser Met Leu
100 105 110

His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Val Met Lys
115 120 125

Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu
130 135 140

Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu Ile
145 150 155 160

Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr
165 170 175

Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr Leu
180 185 190

Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu Glu
195 200 205

Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp
210 215 220

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile
225 230 235 240

Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu
245 250 255

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
275 280 285

Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr
290 295 300

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
305 310 315 320

Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn Tyr

ES 2 892 627 T3

325

330

335

Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ala
 340 345 350

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val
 370 375 380

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu
 420 425 430

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
 435 440 445

Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu Gln
 450 455 460

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
 465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
 485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
 500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
 515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
 530 535 540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
 545 550 555 560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
 565 570 575

ES 2 892 627 T3

Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys
580 585 590

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
610 615 620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
625 630 635 640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
645 650 655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
660 665 670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
675 680 685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
690 695 700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
705 710 715 720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Asn Glu Ser Phe Thr Thr Ser Asn
755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
785 790 795

<210> 9

<211> 2418

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una proteína TIC7472 marcada con histidina.

ES 2 892 627 T3

<400> 9

atgaagcaga ataataat	ttttagtgcagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat	60
ggaatttatg atttgccac tggcattcaa gatattttt acatgatttt tggaacagat		120
acaggtgatc taacactaga agaagttt aaaaatcaag agttacttt tgatatttct		180
ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat		240
acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaacgt attaactgat		300
gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttc taaaattaca		360
aatatgttaa gcgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaa at agaatatctc		420
agtaaacaac tacaggagat atcagataaa ctgtatgtt ttaacttaa tgtactcatt		480
aactctacac tcacagaaat cactcctgct tatcaacgtt taaaatatgt aatgaaaaa		540
tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac		600
attattgcta atgatactct tgaaaatttta actgagctt cagaactagc gaaaagtgtt		660
acaaaaaatg acatggatag ttccgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt		720
ggcaataatt tatttggtcg ttccgcttta aaaacagctg cagaattgt tactaaagac		780
gagataaaga cgagtggaaag tgagatagga aaagtttata gtttcttaat tgtactaact		840
tgtctacaag caaaagcctt tctcaatttta acggcatgcc gaaaatttattt gggcttatca		900
gatattgatt atactaatat tctaaatcg catctaaatg atgaaaagaa tgtatttctg		960
gataacatac ttccctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata		1020
ggtagtgata attatgcataa agttatttttta gaagctgaac caggatatgc ttttagttgga		1080
tttgaaattha tcaatgatcg aatcccggta ttaaaagctt ataaagctt gctaaaacaa		1140
aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattttt atttagatat cgataaaacta		1200
ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatata tatactaaaa gtctgacatt tcctgatggc		1260
tatgttatttta ctaagattac ctttggaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca		1320
gcaaaattttt atgacccatc tacaggagat attgattttt atgagaagca agtggatct		1380
actttttttc aagcagatta tatttttata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg		1440
ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttgc tctccaatttta atagtttga attagaagtt		1500
gacgagaaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaatctt atttacgaga atattttata		1560
gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaatgt ttttatcagt		1620
aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctg aaccatgggt agcaaataac		1680
aagaatgcattt atgtcgatag tacaggcggc atagagggat ctaaagctctt atttactcaa		1740
ggtgatgggg aattttcaca atttatttggaa gataaattaa aaccaaatac agatttatattt		1800

ES 2 892 627 T3

attcaatata	ctgtaaaagg	aaaacctgct	atttatttaa	aaaacaaaaa	tactggatat	1860
actatgtacg	aagatacaca	cggttagttct	gaagaatttc	aaactatagc	tgtaaattat	1920
acttcagaaa	ctgatccccc	acaaacacat	ttagtttta	aaagtcaaag	tggctatgag	1980
gcttgggggg	acaacttat	tattctagaa	tgttaaggcat	ttgaaactcc	agaaggtcca	2040
gaattgataa	aatttgatga	ttggattagt	tttggacta	c当地tacattag	agatgatgta	2100
cttactatcg	atccaagtcg	tggaggttat	tttagacaat	ctcttaaatt	agacagctat	2160
tcaacttata	atttgagctt	ttcttttct	ggattatggg	ctaaggttat	tataaaaaat	2220
tccccacggag	tagtattgtt	tgaaaaagta	agtcagcagt	cttcatacgt	agatattaat	2280
gaaagttta	ctaccacatc	aaataaagaa	ggattttta	tagaactaac	gggcgatagt	2340
cgtggtggtt	ttgggtcggt	ccgtgatttt	tctatgaagg	aaaagttga	acaccaccat	2400
cacgctcacc	atcactga					2418

<210> 10

<211> 805

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de una proteína TIC7472 marcada con histidina.

<400> 10

Met	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	Ile
1						5			10					15	

Asp	Val	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Asp	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Gln	Asp	Ile
					20				25				30		

Phe	Asn	Met	Ile	Phe	Gly	Thr	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu
					35			40				45			

Val	Leu	Lys	Asn	Gln	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu
					50			55			60				

Gly	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Leu	Asn
					65			70			75		80		

Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	Asn	Asn
					85			90			95				

Val	Leu	Thr	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Ser	Met	Leu
					100				105			110			

His	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Asn	Met	Leu	Ser	Asp	Val	Met	Lys
					115			120			125				

5

ES 2 892 627 T3

Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu
130 135 140

Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu Ile
145 150 155 160

Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr
165 170 175

Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr Leu
180 185 190

Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu Glu
195 200 205

Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp
210 215 220

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile
225 230 235 240

Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu
245 250 255

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
275 280 285

Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr
290 295 300

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
305 310 315 320

Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn Tyr
325 330 335

Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ala
340 345 350

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
355 360 365

Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val

ES 2 892 627 T3

370

375

380

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
 385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu
 420 425 430

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
435 440 445

Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu Gln
450 455 460

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
530 535 540

Asn	Trp	Asn	Ile	Glu	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Pro	Trp	Val	Ala	Asn	Asn
545				550					555						560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
565 570 575

Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys
580 585 590

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
610 615 620

ES 2 892 627 T3

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
 625 630 635 640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
 645 650 655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
 660 665 670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
 675 680 685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
 690 695 700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
 705 710 715 720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
 725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
 740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Asn Glu Ser Phe Thr Thr Ser Asn
 755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
 770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu His His His
 785 790 795 800

His Ala His His His
 805

<210> 11

<211> 2394

<212> ADN

5 <213> *Paenibacillus popilliae*

<220>

<221> misc_feature

<222> (1) .. (2394)

<223> Secuencia de ADN derivada de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC008493 que codifica TIC7473.

10 <400> 11

atgaagcaga ataataattt tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat 60

ES 2 892 627 T3

ggaatttatg attttgcac tggcattcaa gatattttt acatgatttt tggaacagat	120
acaggtgatc taacactaga agaagttta aaaaatcaag agttacttta tgatatttct	180
ggtaaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat	240
acagaattag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaattgagc agaacaacgt attaactgat	300
gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca	360
aatatgttaa gcgatgttat gaaacagaat tatgctctga gtcttcaaat agaatatctc	420
agtaaacaac tacaggagat atcagataaa cttgatgtta ttaacttaaa tgtactcatt	480
aactctacac tcacagaaat cactctgct tatcaacgta ttaaatatgt aaatgaaaaa	540
tttgatgaat taactcttgc tacagaaaaa actctaagag caaaacaagg tagcgaagac	600
attattgcta atgatactct tgaaaattta actgagctaa cagaacttagc gaaaagtgt	660
acaaaaaaaaatg acatggatag tttcgagttt tatctccata cattccatga tgtattgatt	720
ggcaataatt tatttggtcg ttccggctta aaaaacagctg cagaattgt tactaaagac	780
gagataaaga cgagtggaag tgagatagga aaagttata gtttcttaat tgtactaact	840
tgtctacaag caaaagcctt tctcaatttta acggcatgcc gaaaattattt gggcttatca	900
gatattgatt atactaatat tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa tgtatttcgt	960
gataacatac ttccctacact gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt aaaaactata	1020
ggtagtgata attatgcaaa agttattttt gaagctgaac caggatatgc tttagttgga	1080
tttggaaatta tcaatgatcg aatcccgta taaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa	1140
aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca gagattgttt atttagatat cgataaaacta	1200
ttttgtccaa aaaattctga aaaaaatata tatactaaaa gtctgacatt tcctgatggc	1260
tatgttatta ctaagattac ctttggaaaaa aagctgaaca acctaagata tgaggcaaca	1320
gcaaaattttt atgacccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca agtggaatct	1380
acttttcttc aagcagatta tatttctata aatgttagtg atgatgatgg tgtttacatg	1440
ccgttaggcg ttatcagcga aacatttttgc tctccaatta atagtttga attagaagtt	1500
gacgagaaaat cgaaaatctt aactttaaca tgtaaatctt atttacgaga atatttatta	1560
gaatctgatt taataaataa agagacaagc ctcattgctc cgcctaatgt ttttacgt	1620
aatatcgtag aaaattggaa catagaagcg gataatctag aaccatgggt agcaaataac	1680
aagaatgcat atgtcgatac tacaggcggc atagagggat ctaaagctct atttactcaa	1740
ggtgatgggg aattttcaca atttatttggaa gataaaattaa aaccaaatac agattatatt	1800
attcaatata ctgtaaaagg aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa tactggat	1860
actatgtacg aagatacataaa cggttagttct gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat	1920
acttcagaaa ctgatccttc acaaacacat ttagtttta aaagtcaaag tggctatgag	1980

ES 2 892 627 T3

gcttgggggg acaacttat tattctagaa tgtaaggcat ttgaaactcc agaaggc
 2040
 gaattgataa aatttgatga ttggattagt ttgggtacta cttacattag agatgatgta
 2100
 cttactatcg atccaagtcg tggaggttat tttagacaat ctcttaaatt agacagctat
 2160
 tcaacttata attttagctt ttctttct ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat
 2220
 tcccacggag tagtattgtt tgaaaaagta agtcagcagt cttcatacgt agatattagt
 2280
 gaaaagttta ctaccacatc aaataaagaa ggattttta tagaactaac gggcgatagt
 2340
 cgtggtggtt ttgggtcggtt ccgtgatttt tctatgaagg aaaagttga ataa
 2394

<210> 12

<211> 797

<212> PRT

5 <213> *Paenibacillus popilliae*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(797)

10 <223> Secuencia de aminoácidos de TIC7473 derivada de la secuencia codificante de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC008493 que codifica TIC7473.

<400> 12

Met	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	Ile
1						5			10					15	

Asp	Val	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Asp	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Gln	Asp	Ile
					20			25					30		

Phe	Asn	Met	Ile	Phe	Gly	Thr	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu
					35			40					45		

Val	Leu	Lys	Asn	Gln	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu
					50			55					60		

Gly	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Leu	Asn
					65			70			75		80		

Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	Asn	Asn
					85			90				95			

Val	Leu	Thr	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Ser	Met	Leu
								100					105		110

His	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Asn	Met	Leu	Ser	Asp	Val	Met	Lys
					115			120					125		

Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 892 627 T3

130

135

140

Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu Ile
 145 150 155 160

Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr
 165 170 175

Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr Leu
 180 185 190

Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu Glu
 195 200 205

Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp
 210 215 220

Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu Ile
 225 230 235 240

Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu
 245 250 255

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
 260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
 275 280 285

Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr
 290 295 300

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
 305 310 315 320

Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn Tyr
 325 330 335

Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ala
 340 345 350

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
 355 360 365

Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val
 370 375 380

ES 2 892 627 T3

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
405 410 415

Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu
420 425 430

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
435 440 445

Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu Gln
450 455 460

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
530 535 540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
545 550 555 560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
565 570 575

Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys
580 585 590

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
610 615 620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
625 630 635 640

ES 2 892 627 T3

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
 645 650 655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
 660 665 670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
 675 680 685

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
 690 695 700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
 705 710 715 720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
 725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
 740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Ser Asn
 755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
 770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
 785 790 795

<210> 13

<211> 2418

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia de ácido nucleico recombinante que codifica una proteína TIC7473 marcada con histidina.

<400> 13

atgaaggcaga ataaataattt tagtgtaagg gccttaccaa gttttattga tgtttttaat	60
ggaatttatg atttgccac tggcattcaa gatattttta acatgatttt tggaacagat	120
acaggtgatc taacactaga agaagttta aaaaatcaag agttacttta tgatattct	180
ggtaaacttg aggggattag tggagaccta agtgagatta ttgcgcaggg aaatttgaat	240
acagaatttag ctaaggaatt gctaaaaatc gctaatgagc agaacaacgt attaactgat	300
gttaataaca aactcaatgc gataaattcg atgctccaca tctatcttcc taaaattaca	360

ES 2 892 627 T3

aatatgttaa gcgatgttat	420
gaaacagaat tatgctctga	
gtcttcaaata agaatatctc	
agtaaacaac tacaggagat atcagataaa	480
cttgatgtta ttaacttaaa	
tgtactcatt aactctacac	
tcacagaaat cactcctgct	540
tatcaacgta ttaaatatgt	
aatgaaaaaa tttgatgaat taactcttgc	
tacagaaaaa actctaagag caaaaacaagg	600
tagcgaagac attattgcta atgatactct	
tgaaaattta actgagctaa cagaactagc	660
gaaaagtgtaa acatggatag tttcgagttt	
tatctccata cattccatga	720
tgtattgattt ggcataatt tatttggtcg	
ttcggcttta aaaacagctg cagaatttgat	780
tactaaagac gagataaaga cgagtgaaag	
tgagatagga aaagttata gtttcttaat	840
tgtactaact tgtctacaag caaaagcctt	
tctcacttta acggcatgcc gaaaatttattt	900
ggcatttca gatattgatt atactaatat	
tctaaatcag catctaaatg atgaaaagaa	960
tgtatccgt gataacatac ttccctacact	
gtccaataaa ttttctaacc ctaattatgt	1020
aaaaactata ggtagtgata attatgc	
aaatgttttta gaagctgaac caggatatgc	1080
tttgcatttta tcaatgatcg aatcccgta	
ttaaaagcgt ataaagctaa gctaaaacaa	1140
aattatcaag ttgatcatca gtcgttatca	
gagattgtttt atttagatat cgataaaacta	1200
ttttgtccaa aaaattctga acaaaaatat	
tatactaaaa gtctgacatt tcctgatggc	1260
tatgttattt ctaagattac ctgtttttttt	
aacccatc tacaggagat attgatttaa atgagaagca	1320
agtggaatct acttttcttc aagcagatta	
tatttctata aatgttagtg atgatgatgg	1380
tgtttacatgc cctttaggcg ttatcagcga	
aacattttt tctccaatta atagtttga	1440
attagaagtt gacgagaaat cgaaaatctt	
aactttaaca tgtaaatctt atttacgaga	1500
atatttattta gaatctgatt taataaataa	
agagacaagc ctcattgctc cgctaatgt	1560
ttttatcagt aatatcgtag aaaattggaa	
catagaagcg gataatctag aaccatgggt	1620
agcaaataaac aagaatgcattt atgtcgatag	
tgaggcgc atagagggat ctaaagctct	1680
atttactcaa ggtgatgggg aattttcaca	
atttatttga gataaattaa aaccaaatac	1740
agattatattt attcaatata ctgtaaaagg	
aaaacctgct atttatttaa aaaacaaaaa	1800
tactggatatttactt aatgttttgcg	
aaatgtacg aagatacataa cggtagttct	1860
gaagaatttc aaactatagc tgtaaattat	
acttcagaaa ctgatccttc acaaacacat	1920
ttagttttta aaagtcaaag tggctatgag	
gcttgggggg acaactttat tattctagaa	1980
tgttaaggcat ttgaaactcc agaagggtcca	
gaattgataa aatttgatga ttggattagt	2040
tttggtacta cttacattag agatgatgta	
cttactatcg atccaagtcg tggaggttat	
tttagacaat ctcttaaattt agacagctat	2100
tcaacttata atttgagctt ttcttttctt	
ggattatggg ctaaggttat tataaaaaat	2160
tcccacggag tagtattgtt tgaaaaagta	
agtcagcagt cttcatacgt agatattagt	2220
	2280

ES 2 892 627 T3

gaaagttta ctaccacatc aaataaaagaa ggattttta tagaactaac gggcgatagt 2340
 cgtggtggtt ttgggtcggtt ccgtgatttt tctatgaagg aaaagtttga acaccacca 2400
 cacgctcacc atcactga 2418

5 <210> 14
 <211> 805
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de una proteína TIC7473 marcada con histidina.

<400> 14

Met	Lys	Gln	Asn	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Arg	Ala	Leu	Pro	Ser	Phe	Ile
1															15

Asp	Val	Phe	Asn	Gly	Ile	Tyr	Asp	Phe	Ala	Thr	Gly	Ile	Gln	Asp	Ile
															30
20															

Phe	Asn	Met	Ile	Phe	Gly	Thr	Asp	Thr	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu
35															45

Val	Leu	Lys	Asn	Gln	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ser	Gly	Lys	Leu	Glu
50															60

Gly	Ile	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	Glu	Ile	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Leu	Asn
65															80

Thr	Glu	Leu	Ala	Lys	Glu	Leu	Leu	Lys	Ile	Ala	Asn	Glu	Gln	Asn	Asn
85															95

Val	Leu	Thr	Asp	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Ser	Met	Leu
100															110

His	Ile	Tyr	Leu	Pro	Lys	Ile	Thr	Asn	Met	Leu	Ser	Asp	Val	Met	Lys
115															125

Gln	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Gln	Ile	Glu	Tyr	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu
130															140

Gln	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Leu	Asn	Val	Leu	Ile
145															160

Asn	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Gln	Arg	Ile	Lys	Tyr
165															175

Val	Asn	Glu	Lys	Phe	Asp	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Glu	Lys	Thr	Leu
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 892 627 T3

180

185

190

Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu Glu
195 200 205

Met	Asp	Ser	Phe	Glu	Phe	Tyr	Leu	His	Thr	Phe	His	Asp	Val	Leu	Ile
225					230					235					240

Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu Leu
245 250 255

Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys Val
260 265 270

Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu
275 280 285

Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp Tyr
290 295 300

Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe Arg
305 310 315 320

Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn Tyr
 325 330 335

Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu Ala
340 345 350

Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg Ile
355 360 365

Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val
 370 375 380

Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys Leu
385 390 395 400

Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu Thr
 405 410 415

Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys Leu
 420 425 430

ES 2 892 627 T3

Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser Thr
435 440 445

Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu Gln
450 455 460

Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr Met
465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser Phe
485 490 495

Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys Lys
500 505 510

Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys Glu
515 520 525

Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu
530 535 540

Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn Asn
545 550 555 560

Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys Ala
565 570 575

Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys
580 585 590

Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys
595 600 605

Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr Glu
610 615 620

Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn Tyr
625 630 635 640

Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser Gln
645 650 655

Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys Lys
660 665 670

Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp Trp
675 680 685

ES 2 892 627 T3

Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile Asp
 690 695 700

Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser Tyr
 705 710 715 720

Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys Val
 725 730 735

Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser Gln
 740 745 750

Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Ser Asn
 755 760 765

Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly Phe
 770 775 780

Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu His His His
 785 790 795 800

His Ala His His His
 805

<210> 15

<211> 2397

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN sintética diseñada para expresión en plantas que codifica TIC7472PL con un resto de alinina adicional insertado en la posición 2 con respecto a la secuencia de aminoácidos bacteriana de TIC7472 derivada de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC007648 que codifica TIC7472.

10 <400> 15

atggcttaagc agaacaacaa cttcagcggt cgggcgctcc cgtccttcat cgacgtcttc	60
aacggcatct acgacttcgc cacggcatc caggacatct tcaacatgtat ctttgggacg	120
gataccggcg acctcacccct cgaagaagtc cttaagaacc aggaactcct gtacgacatc	180
agcgggaagc tggagggcat ctcaggcgac ctgtcgagaa tcatcgccca gggcaacctc	240
aacacggagc tcgccaagga actgcttaag atcgccaacg agcagaacaa cgttctgacc	300
gacgtcaaca acaaagctcaa cgcgatcaac tccatgctcc acatctacct gccgaagatc	360
accaacatgc tgagcgacgt catgaagcag aactacgcgc tgtcgtccca gatcgagtat	420
tttagcaagc agctccagga aatctcgac aagctcgacg tgataaacct gaacgtcctc	480
atcaactcca cgctgaccga gatcacaccc gcctaccaggc gcatcaagta cgtcaacgag	540

ES 2 892 627 T3

aagttcgacg agctgacgct ggcgaccgag aagaccctgc	600
ggcgaagca aggcaaggag	
gacattattg cgaacgacac gcttgagaat ctcacggage	660
tgactgagct ggcaagtc	
gtgaccaaga acgacatgga ctcgttcgag ttctacctac	720
acaccttca tgacgtcctg	
atcgggaaca acctttcgg ggcagcgcg ctcaagaccg	780
ctggagact tatcacgaag	
gacgagatca agaccccg	840
ctcggagatc gggaaagggtgt acagttcct gatcgttgt	
acgtgcctcc aggccaaggc gttcctcacg ctcaactgcct	900
ggcgaagct cttggccctc	
tcaagacatcg actacacgaa catcctcaac cagcacctca	960
acgacgagaa gaacgtcttc	
cgcgacaaca tccttccgac gcttcgaat aagttcagca	1020
acccgaacta cgtgaagacc	
atcggcagcg ataactacgc	1080
gaaggtgata ctggaggcgg agcccgcta cgccctggc	
ggcttcgaga tcattaacga ccgtatcccc	1140
gtcctcaagg cgtacaaggc caagctcaag	
cagaactacc aagtggacca ccagtcctc tccgagatcg	1200
tgtacctgga catcgacaag	
ctgttctgcc cgaagaacag cgagcagaag tactacacca	1260
agtcgtgac cttccggac	
gggtacgtca tcacaaagat cacttcgag aagaagctga	1320
acaacctgcg ctacgaggcg	
acggcgaact tctacgaccc gagcaccggt gacatcgacc	1380
tgaacgagaa gcaagtggag	
tccacgttcc tccaggcgg	1440
ctacatctct atcaacgtga	
gcgacgacga cggcgtgtac	
atgcgcgtgg gcgtcatctc	1500
cgagacotc ctctctccca tcaactcggt	
cgagcttgaa	
gtggacgaga aatcgaagat	1560
cctgacgctg acctgcaaga	
gctacactgcg cgagtacotg	
ctggagtccg acctcatcaa	1620
caaggagacc agcctgatcg	
cgccgcctaa tgtgttcatc	
agcaacatcg tggagaactg	1680
gaacatcgag gccgacaatt	
tggaaccttg ggtcgccaac	
aacaagaacg cctacgtgga	1740
cagcacgggc ggcatcgagg	
gctccaaggc cctgtttacc	
cagggagacg gcgagttcag	1800
tcaacttcatc ggcgacaagc	
tcaagcccaa cacggactac	
atcatccagt acaccgtcaa	1860
aggaaaggct	
gcgtatcacc tcaagaacaa	
gaacaccgga	
tacacgatgt acgaggacac	1920
caacggctcc tcggaggagt	
tccagaccat cgccgtgaac	
tacacccctcg agacggaccc	1980
gtcccagacg cacctcggt	
tcaagtccttca gtcaagg	
gtcaggctac	
gaagcgtgg gtgacaactt	2040
tatcatcttg gagtgcagg	
cgttcgagac	
gccccgaggc	
ccggaactca tcaagttcga	2100
cgactggatc	
tcattcggca ccacgtacat	
ccggacgac	
gtcctcacca tcgacccgtc	2160
tcggcgggc	
tacttcggcc	
agtcctcaa	
gtcgactcg	
tacagcacgt acaacctgtc	2220
cttcttttc	
agcgggctgt	
ggccaaagggt	
catcatcaag	
aactcgcatg	2280
gcgtcgctt	
tttcgagaag	
gtgtccagc	
agagttctta	
cgtggacatc	
aacgagagct	2340
tcacgacgac	
gtccaacaag	
gagggattct	
tcatcgagct	
gaccggcgac	
agtgcggag	2397
gttcgggag	
tttcgggac	
ttctccatga	
aggagaagtt	
cgagtag	

ES 2 892 627 T3

<210> 16
<211> 798
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos de TIC7472PL codificada por una secuencia de ADN sintética en la que se ha insertado un resto de alanina adicional en la posición 2 con respecto a la secuencia de aminoácidos bacteriana de TIC7472.

<400> 16

Met Ala Lys Gln Asn Asn Asn Phe Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Asp Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp
20 25 30

Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Asp Leu Thr Leu Glu
35 40 45

Glu Val Leu Lys Asn Gln Glu Leu Leu Tyr Asp Ile Ser Gly Lys Leu
50 55 60

Glu Gly Ile Ser Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu
65 70 75 80

Asn Thr Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn
85 90 95

Asn Val Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ser Met
100 105 110

Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Val Met
115 120 125

Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln
130 135 140

Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu
145 150 155 160

Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys
165 170 175

Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr
180 185 190

Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu
195 200 205

ES 2 892 627 T3

Glu Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn
210 215 220

Asp Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu
225 230 235 240

Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu
245 250 255

Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys
260 265 270

Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe
275 280 285

Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp
290 295 300

Tyr Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe
305 310 315 320

Arg Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn
325 330 335

Tyr Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu
340 345 350

Ala Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg
355 360 365

Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln
370 375 380

Val Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys
385 390 395 400

Leu Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu
405 410 415

Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys
420 425 430

Leu Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser
435 440 445

Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu

ES 2 892 627 T3

450

455

460

Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr
 465 470 475 480

Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser
485 490 495

Phe Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys
 500 505 510

Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys
515 520 525

Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val
530 535 540

Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn
545 550 555 560

Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys
565 570 575

Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp
580 585 590

Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly
595 600 605

Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Thr Met Tyr
610 615 620

Glu Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn
 625 630 635 640

Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser
645 650 655

Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys
 660 665 670

Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp
 675 680 685

Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile
690 695 700

ES 2 892 627 T3

Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser
 705 710 715 720

Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys
 725 730 735

Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser
 740 745 750

Gln Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Asn Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser
 755 760 765

Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly
 770 775 780

Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
 785 790 795

<210> 17

<211> 2397

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ADN sintética diseñada para expresión en plantas que codifica TIC7473PL con un resto de alinina adicional insertado en la posición 2 con respecto a la secuencia de aminoácidos bacteriana de TIC7473 derivada de la cepa de *Paenibacillus popilliae* DSC008493 que codifica TIC7473.

10 <400> 17

atggcttaagc agaacaacaa cttcagtgtc cgccgcctgc ctccttcat tgacgtcttc	60
aacggcatct acgacttcgc taccggcatc caggacatct tcaacatgtat ctttggAACG	120
gataccggcg acctgacgct ggaggagggtg ctcaagaacc aggagctgct ctacgacatc	180
tccgggaagc tggagggcat ctccggcgac ctgtcgagata tcattcgccca gggcaacctc	240
aacacggagt tagccaaaga gctgctcaag atcgccaacg agcagaacaa cgtcctgacc	300
gacgtgaaca acaagctcaa cgccatcaac tccatgctcc acatctacct cccgaagatc	360
accaacatgc tctccgacgt catgaagcag aactacgccc tcagcctcca gatcgagtac	420
ctctccaaagc agtacagga gatttccgac aagctggacg tcattcaacctt gaacgtcctc	480
atcaattcga cgctcacccg gatcactccg gcttaccaggc gcatcaagta cgtgaacgag	540
aagttcgacg agctgacgct ggccgactgag aagaccctcc ggcggaaaca gggcagcggag	600
gacatcatcg ctaacgacac gctggagaac ctgacggAAC tcacggagct gccaagtcc	660
gtgaccaaga acgacatgga cagcttcgag ttctacctgc atacgttcca cgacgtgctc	720
atcggcaaca acctgttcgg ccgctccgccc ctcaagacgg ccggccgagct gattacaaag	780
gacgagatca agacgagcgg ctggagatc ggcaagggtgt acagttcctt gatcgctctg	840

acctgtctcc	aggctaaggc	gttcctgacg	ctaaccgcct	gccggaagct	cctgggcctc	900
agcgacatcg	actacaccaa	cattctgaac	cagcacctga	acgacgagaa	gaacgtctc	960
cgcgacaaca	tcctgcccac	actgtcgaac	aagttctcaa	acccgaacta	cgtgaagacc	1020
atcgggagcg	acaactacgc	caaggtgatc	ctggaggccg	agccgggcta	cgcgctggtg	1080
ggcttcgaga	tcatcaacga	ccgcatcccg	gtcctcaagg	cgtacaaggc	gaagctcaag	1140
cagaactacc	aagtggacca	ccagagccta	tccgagatcg	tgtacctgga	catcgacaaa	1200
ctgttctgcc	cgaagaactc	cgagcagaag	tactacacca	agtcgctcac	cttcccggac	1260
ggctacgtca	tcaccaagat	cacgttcgag	aagaagctca	acaacctgcg	ttacgaggcg	1320
accgccaact	tctacgaccc	gtccacccgc	gacatcgacc	ttaacgagaa	gcaagtgcgag	1380
agcaccttcc	tccaggccga	ctacatctcc	atcaacgtct	cggacgacga	cgccgtgtac	1440
atgccgctgg	gcgtcatctc	cgagaccttc	ctgagcccg	tcaacagctt	c gagctggag	1500
gtggacgaga	agtccaagat	cctgacccta	acgtgcaaga	gctacctcg	ggagtacctc	1560
ctggagtcgg	acctcatcaa	caaggagacg	agcctgatcg	cgcctccaaa	cgtcttcatc	1620
agcaacattg	tggagaactg	gaacatcgag	goggacaacc	tagaaccctg	ggtggcgaac	1680
aacaagaacg	cctacgtgga	cagcacccgc	ggcatcgagg	gcagcaaagc	actgttcaact	1740
cagggtgacg	gcgagttctc	gcagttcatc	ggcgacaagc	tcaagccaaa	caccgactac	1800
atcatccagt	acacggtcaa	ggcaagccct	gctatctacc	tcaagaacaa	gaacaccggc	1860
tacacgatgt	acgaggacac	gaacgggtcc	agcgaggagt	tccagaccat	cgccgtgaac	1920
tacaccagcg	agacccgaccc	gtccccagacc	cacctcggt	tcaagtgcga	gagcgggtac	1980
gaggcttggg	gagataactt	cattatctg	gagtgcagg	cgttagagac	gccggaaggc	2040
ccggagctca	tcaagttcga	cgactggatc	tcgttcggg	ccacotacat	ccgcgacgac	2100
gtgctcacca	tgcacccgag	ccgtggccgc	tacttccgccc	agtccttggaa	actcgactcg	2160
tactcgacgt	acaacctctc	gttcagcttc	tcgggcctct	gggctaagg	catcatcaag	2220
aactcccacg	gcgttgtcct	gttcgagaag	gtgtcgacgc	agagttcgta	cgtggacatc	2280
tcggagtcct	tcaccaccac	cagcaacaag	gagggcttct	ttatcgagct	cacgggcgac	2340
tcgcgcggcg	gttcggctc	gttcgggac	tttagtatga	aggagaagtt	cgagtag	2397

<210> 18

<211> 798

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de TIC7473PL codificada por una secuencia de ADN sintética en la que se ha insertado un resto de alanina adicional en la posición 2 con respecto a la secuencia de aminoácidos bacteriana de TIC7473.

ES 2 892 627 T3

Met Ala Lys Gln Asn Asn Asn Phe Ser Val Arg Ala Leu Pro Ser Phe
1 5 10 15

Ile Asp Val Phe Asn Gly Ile Tyr Asp Phe Ala Thr Gly Ile Gln Asp
20 25 30

Ile Phe Asn Met Ile Phe Gly Thr Asp Thr Gly Asp Leu Thr Leu Glu
35 40 45

Glu Val Leu Lys Asn Gln Glu Leu Leu Tyr Asp Ile Ser Gly Lys Leu
50 55 60

Glu Gly Ile Ser Gly Asp Leu Ser Glu Ile Ile Ala Gln Gly Asn Leu
65 70 75 80

Asn Thr Glu Leu Ala Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn
85 90 95

Asn Val Leu Thr Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Ser Met
100 105 110

Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Asn Met Leu Ser Asp Val Met
115 120 125

Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys Gln
130 135 140

Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu
145 150 155 160

Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys
165 170 175

Tyr Val Asn Glu Lys Phe Asp Glu Leu Thr Leu Ala Thr Glu Lys Thr
180 185 190

Leu Arg Ala Lys Gln Gly Ser Glu Asp Ile Ile Ala Asn Asp Thr Leu
195 200 205

Glu Asn Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn
210 215 220

Asp Met Asp Ser Phe Glu Phe Tyr Leu His Thr Phe His Asp Val Leu
225 230 235 240

ES 2 892 627 T3

Ile Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ala Glu
245 250 255

Leu Ile Thr Lys Asp Glu Ile Lys Thr Ser Gly Ser Glu Ile Gly Lys
260 265 270

Val Tyr Ser Phe Leu Ile Val Leu Thr Cys Leu Gln Ala Lys Ala Phe
275 280 285

Leu Thr Leu Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ser Asp Ile Asp
290 295 300

Tyr Thr Asn Ile Leu Asn Gln His Leu Asn Asp Glu Lys Asn Val Phe
305 310 315 320

Arg Asp Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Lys Phe Ser Asn Pro Asn
325 330 335

Tyr Val Lys Thr Ile Gly Ser Asp Asn Tyr Ala Lys Val Ile Leu Glu
340 345 350

Ala Glu Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Ile Ile Asn Asp Arg
355 360 365

Ile Pro Val Leu Lys Ala Tyr Lys Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln
370 375 380

Val Asp His Gln Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Leu Asp Ile Asp Lys
385 390 395 400

Leu Phe Cys Pro Lys Asn Ser Glu Gln Lys Tyr Tyr Thr Lys Ser Leu
405 410 415

Thr Phe Pro Asp Gly Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Glu Lys Lys
420 425 430

Leu Asn Asn Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Pro Ser
435 440 445

Thr Gly Asp Ile Asp Leu Asn Glu Lys Gln Val Glu Ser Thr Phe Leu
450 455 460

Gln Ala Asp Tyr Ile Ser Ile Asn Val Ser Asp Asp Asp Gly Val Tyr
465 470 475 480

Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Ser Pro Ile Asn Ser
485 490 495

ES 2 892 627 T3

Phe Glu Leu Glu Val Asp Glu Lys Ser Lys Ile Leu Thr Leu Thr Cys
500 505 510

Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Tyr Leu Leu Glu Ser Asp Leu Ile Asn Lys
515 520 525

Glu Thr Ser Leu Ile Ala Pro Pro Asn Val Phe Ile Ser Asn Ile Val
530 535 540

Glu Asn Trp Asn Ile Glu Ala Asp Asn Leu Glu Pro Trp Val Ala Asn
545 550 555 560

Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp Ser Thr Gly Gly Ile Glu Gly Ser Lys
565 570 575

Ala Leu Phe Thr Gln Gly Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp
580 585 590

Lys Leu Lys Pro Asn Thr Asp Tyr Ile Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly
595 600 605

Lys Pro Ala Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asn Thr Gly Tyr Thr Met Tyr
610 615 620

Glu Asp Thr Asn Gly Ser Ser Glu Glu Phe Gln Thr Ile Ala Val Asn
625 630 635 640

Tyr Thr Ser Glu Thr Asp Pro Ser Gln Thr His Leu Val Phe Lys Ser
645 650 655

Gln Ser Gly Tyr Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Cys
660 665 670

Lys Ala Phe Glu Thr Pro Glu Gly Pro Glu Leu Ile Lys Phe Asp Asp
675 680 685

Trp Ile Ser Phe Gly Thr Thr Tyr Ile Arg Asp Asp Val Leu Thr Ile
690 695 700

Asp Pro Ser Arg Gly Gly Tyr Phe Arg Gln Ser Leu Lys Leu Asp Ser
705 710 715 720

Tyr Ser Thr Tyr Asn Leu Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Trp Ala Lys
725 730 735

Val Ile Ile Lys Asn Ser His Gly Val Val Leu Phe Glu Lys Val Ser

ES 2 892 627 T3

740

745

750

Gln Gln Ser Ser Tyr Val Asp Ile Ser Glu Ser Phe Thr Thr Thr Ser
755 760 765

Asn Lys Glu Gly Phe Phe Ile Glu Leu Thr Gly Asp Ser Arg Gly Gly
770 775 780

Phe Gly Ser Phe Arg Asp Phe Ser Met Lys Glu Lys Phe Glu
785 790 795

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un promotor heterólogo unido operativamente a un segmento de polinucleótido que codifica una proteína pesticida, en la que dicha proteína pesticida comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18, y en la que dicha proteína pesticida es activa contra insectos lepidópteros.
- 5 2. Una planta, o parte de esta, que comprende la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1.
3. Una semilla de la planta de la reivindicación 2, donde dicha semilla comprende dicha molécula de ácido nucleico recombinante.
- 10 4. Una composición inhibidora de insectos que comprende una proteína pesticida codificada por la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1.
- 5 5. La composición inhibidora de insectos de la reivindicación 4, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica al menos otro agente pesticida distinto de dicha proteína pesticida.
- 15 6. Un procedimiento para controlar una plaga de especies de lepidópteros o infestación por plagas, comprendiendo dicho procedimiento:
- a. poner en contacto la plaga con una cantidad eficaz como insecticida de una proteína pesticida que se establece en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18; o
 - b. poner en contacto la plaga con una cantidad eficaz como insecticida de una o más proteínas pesticidas que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 18.
- 20 7. Una célula vegetal que expresa la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha célula vegetal produce una cantidad eficaz como pesticida de la proteína pesticida o fragmento pesticida codificado por dicha molécula de ácido nucleico.
- 25 8. Una célula hospedadora que expresa la molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, en la que dicha célula vegetal se selecciona del grupo que consiste en una célula bacteriana y una célula vegetal.
9. La célula vegetal de la reivindicación 8, en la que dicha célula vegetal es una célula vegetal dicotiledónea o monocotiledónea.
- 30 10. La célula vegetal de la reivindicación 8, en la que dicha célula vegetal es de un género de bacterias seleccionado del grupo que consiste en *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Pantoea* y *Erwinia*.
11. La célula huésped de la reivindicación 10, en la que dicha especie de *Bacillus* es *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, dicha especie de *Brevibacillus* es *Brevibacillus laterosporus*, y dicha especie de *Escherichia* es *Escherichia coli*.
- 35 12. La molécula de ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1, en la que dicho insecto lepidóptero se selecciona del grupo que consiste en: oruga del frijol terciopelo, taladro de la caña de azúcar, gusano barrenador del tallo inferior del maíz, gusano elotero, oruga del tabaco, lagarta verde, gusano soldado africano, gusano meridional, cogollero de maíz, gardama, oruga del viejo mundo, gusano defoliador, gusano rosado, gusano cortador grasiendo, barrenador del maíz del suroeste, gusano medidor de la hoja del algodonero, palomilla dorso de diamante, gusano de cápsula moteado, gusano gris del tabaco, gusano trozador occidental del frijol y taladro del maíz.