

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
11 de Diciembre de 2008 (11.12.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/150150 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01H 5/00 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2007/000068
- (22) Fecha de presentación internacional:
8 de Junio de 2007 (08.06.2007)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO [MX/MX]; 9º Piso de la Torre Rectoría, Ciudad Universitaria, Delegación Coyocán, CEP-04510 México D.F. (MX). ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA [US/US]; 888 North Euclid Avenue, P.O. Box 210158, Tucson, AZ 85721-0158 (US).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): PARDO-LÓPEZ, Liliana [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, CEP-62210 Cuernavaca, Morelos (MX).

TABASHNIK, Elliot Bruce [US/US]; 5751 N. Kolb #4203, Tucson AZ 85721 (US). SOBERÓN-CHAVÉZ, Mario [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, CEP-62210 Cuernavaca, Morelos (MX). BRAVO-DE LA PARRA, María Alejandra [MX/MX]; Instituto de Biotecnología-UNAM, Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, CEP-62210 Cuernavaca, Morelos (MX).

(74) Representante común: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO; Subdirección Jurídica de Propiedad Intelectual, Edificio "B", 3er. Piso, Zona Cultural, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, CEP-04510, México, D.F. (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: SUPPRESSION OF RESISTANCE IN INSECTS TO *BACILLUS THURINGIENSIS* CRY TOXINS, USING TOXINS THAT DO NOT REQUIRE THE CADHERIN RECEPTOR

(54) Título: SUPRESIÓN DE RESISTENCIA EN INSECTOS HACIA LAS TOXINAS CRY DE *BACILLUS THURINGIENSIS* UTILIZANDO TOXINAS QUE NO REQUIEREN AL RECEPTOR CADHERINA.

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining DNA constructions coding for Cry toxins with 3 domains (also known as Cry toxins, Bt toxins or δ -endotoxins), which lack helix α -1. Said DNA constructions were modified in order to encode proteins that can kill insects that are resistant to the corresponding non-modified Cry toxins. The invention relates to the DNA constructions of the genes of modified 3-domain Cry toxins and the modified 3-domain Cry proteins, together with methods, molecular vectors and host cells containing said constructions, as well as recombinant methods for producing the modified 3-domain Cry toxins. In addition, the invention relates to formulations containing the modified 3-domain Cry toxins. Resistance of insects to non-modified Cry toxins is due to a reduced binding of the toxin to the receptors in the insect's intestine. More specifically, the invention relates to the expression of the modified 3-domain Cry toxins, the methods for expressing said modified 3-domain Cry toxins, transformed microorganisms and transgenic plants with constructions that express the modified 3-domain Cry toxins and methods for suppressing resistance of pests to non-modified Cry toxins.

(57) Resumen: La presente invención provee un método para obtener construcciones de DNA que codifican para toxinas Cry de 3-dominios (también llamadas toxinas Cry, toxinas Bt, o δ - endotoxinas) que carecen de la hélice α -1. Estas construcciones de DNA fueron modificadas para codificar proteínas capaces de matar insectos que presentan resistencia a las correspondientes toxinas Cry no-modificadas. Las construcciones de DNA de los genes de toxinas cry de 3 -Dominios Modificadas y las proteínas Cry de 3 -Dominios Modificadas se presentan junto con los métodos, los vectores moleculares y las células huésped que contienen estas construcciones, así como los métodos recombinantes para producir las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas. Además, en esta invención se describen formulaciones conteniendo a las Toxinas Cry de 3 -Dominios Modificadas. La resistencia de los insectos a toxinas Cry no-modificadas se debe a una menor unión de la toxina a los receptores que se encuentran en el intestino del insecto. La presente invención provee la expresión de las construcciones de Toxinas Cry de 3 -Dominios Modificadas, los métodos de expresión de estas Toxinas Cry de 3 -Dominios Modificadas, los microorganismos transformados y las plantas transgénicas con construcciones que expresan las Toxinas Cry de 3 -Dominios Modificadas, y los métodos para suprimir la resistencia de insectos plaga hacia toxinas Cry no-modificadas.



WO 2008/150150 A2



(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- *sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))*
- *sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))*

Publicada:

- *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe*

**SUPRESIÓN DE RESISTENCIA EN INSECTOS HACIA LAS TOXINAS CRY DE
BACILLUS THURINGIENSIS UTILIZANDO TOXINAS QUE NO REQUIEREN
AL RECEPTOR CADERINA.**

5 RESUMEN DE LA INVENCION

Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son muy valiosas por su capacidad de controlar insectos plaga de diferentes cultivos, de bosques e insectos que transmiten enfermedades en humanos. El desarrollo de resistencia de las plagas de insectos a las toxinas de Bt es el principal impedimento para continuar con el éxito de este insecticida, el cual es compatible con el medio ambiente. El principal mecanismo de resistencia en los insectos hacia las toxinas Cry involucra la disminución en la unión de las toxinas Cry a los receptores específicos localizados en el intestino de los insectos. (Ferré y Van Rie, 2002).

15

Las proteínas Cry1A son un grupo de toxinas Bt que matan algunos insectos lepidópteros claves. En cepas de las tres principales plagas de algodón [*Heliothis virescens* (Gahan *et al.*, 2001), *Pectinophora gossypiella* (Morin *et al.*, 2003) y *Helicoverpa armigera* (Xu *et al.*, 2005)], la resistencia a las toxinas Cry1A esta ligada con alteraciones en la proteína caderina, la cual actúa como receptor primario para toxinas Cry en el intestino de los insectos susceptibles. Las mutaciones en el gen de caderina producen resistencia “tipo 1” a las toxinas de Bt, este tipo de resistencia es la resistencia que se presenta con mayor frecuencia en diferentes insectos. Este tipo de resistencia presenta altos niveles de resistencia por lo menos a una toxina Cry1A, es de carácter recesivo, reduce la unión de al menos una toxina Cry1A a las membranas del insecto resistente y presenta muy poca resistencia cruzada con la toxina Cry1C (Ferre y Van Rie, 2002). De manera interesante, el gusano dorso de diamante (DBM), *Plutella xylostella*, una plaga mundial que ataca hortalizas como brócoli y coliflor, presenta resistencia a toxinas Cry1A “tipo 1” pero en este caso no esta directamente asociada a mutaciones en el gen de caderina. DBM es el único insecto resistente a las toxinas de Bt que en todo el mundo ha sido seleccionado en campo (Tabashnik, 2004). La unión a caderina facilita el corte proteolítico de la hélice α -1 del dominio I y la formación de un pre-poro oligomérico que es el responsable de la toxicidad de estas proteínas (Gómez *et al.*, 2002).

30

En esta invención se demuestra que las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas producidas de construcciones de genes *cry* de 3-Dominios que carecen del DNA que codifica para la hélice α -1, matan insectos que son resistentes a las toxinas Cry de 3-Dominios silvestres (Toxinas Cry No-Modificadas).

Las bases genéticas de la resistencia de los insectos hacia las Toxinas Cry 3-Dominios No-modificadas esta ligada con mutaciones en el gen de caderina que codifica para el receptor primario de las toxinas Cry1A. En los insectos resistentes, el receptor primario está truncado o ausente, entonces la unión de las toxinas Cry a las membranas de las células del intestino está disminuida o ausente. Por lo tanto, los insectos resistentes no son sensibles a las toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas. Las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas que se presentan en ésta invención suprimen la resistencia al no necesitar la unión de la toxina al receptor caderina. La toxicidad de las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas fue demostrada contra dos cepas de insectos resistentes a toxinas Cry1A silvestres y también se probó contra insectos con una susceptibilidad reducida hacia las toxinas Cry inducida mediante el silenciamiento del transcrito del RNA de caderina. Una cepa de insectos resistentes presenta resistencia tipo 1 por modificación genética en el gen de caderina, mientras que la otra cepa presenta resistencia tipo 1 no ligada a mutaciones en el gen de caderina.

Las proteínas Cry1A Modificadas producidas por las construcciones de genes que carecen de la hélice α -1 inducen la formación *in vitro* del pre-poro oligomérico sin necesitar la unión a receptor caderina, ni de fragmentos de la proteína de caderina conteniendo los sitios de unión de la toxina Cry o del anticuerpo en formato scFv (scFv73) el cual mimetiza a la región de unión a la toxina Cry presente en el receptor caderina (Gómez *et al.*, 2002). En cambio, las proteínas Cry1A No-Modificadas requieren la presencia del anticuerpo scFv73 o de fragmentos de la proteína caderina o de la caderina para producir el pre-poro oligomérico *in vitro*.

La invención descrita aquí pudiera tener aplicaciones muy amplias debido a la similitud que existe en el modo de acción de las proteínas Cry1A con otras toxinas Cry de 3-Dominios, así como la presencia en diversos insectos de un mecanismo común de resistencia hacia las toxinas Cry. Además de las proteínas Cry1A, existen muchas otras

toxinas de Bt que son toxinas Cry con una estructura de 3-Dominios, en donde se incluyen proteínas con baja similitud en la secuencia de aminoácidos (de Maagd *et al.* 2001). Se ha reportado que diferentes toxinas Cry de 3-dominios (Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D, Cry1E, Cry1F, Cry3A, Cry3B, Cry3C, Cry4A, Cry4B y Cry11) forman estructuras oligoméricas semejantes a las observadas con la toxina Cry1Ab y que se insertan en la membrana de las células del intestino larvario blanco, formando poros iónicos. Esto sugiere que la familia de proteínas Cry de 3-Dominios tiene un mecanismo de acción similar (Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004a, Rausell *et al.*, 2004b; Herrero, S. *et al.*, 2004; Muñoz-Garay *et al.*, 2006). Por otra parte, el mecanismo más común de resistencia en los insectos hacia las toxinas Cry1A involucra alteraciones en el receptor primario caderina. Estas alteraciones, impiden la formación de las estructuras de pre-poro oligomérico que normalmente esta mediada por la interacción de la toxina Cry con el receptor caderina. Por lo tanto, predecimos que diferentes insectos resistentes a Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas podrán ser sensibles con la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada correspondiente, a la cual le fue delatado el fragmento que codifica para la hélice α -1. Las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas producidas por las construcciones genéticas descritas aquí pueden ser presentadas a la población de insectos como insecticidas aplicación tópica (por ejemplo como insecticidas tipo spray), como microorganismos transgénicos, o como plantas transgénicas.

20

ANTECEDENTES

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria miembro del grupo de *Bacillus cereus* (Helgason *et al.* 2000). A diferencia de otros miembros del grupo *Bacillus cereus*, Bt produce cristales paraesporales que están constituidos principalmente por proteínas insecticidas llamadas toxinas Cry, toxinas Bt, o δ -endotoxinas.

25

Las toxinas Bt son tóxicas para algunos insectos específicos y son inocuas a humanos, vertebrados y plantas. Además son completamente biodegradables. Por lo tanto, las toxinas Bt son seguras y efectivas en el control de insectos plaga. Las aplicaciones de estas toxinas incluyen: 1) control de plagas desfoliadoras en bosques, 2) control de mosquitos y mosca negra que son vectores de enfermedades en los humanos, 3) control de plagas agrícolas por medio de formulaciones insecticidas conteniendo toxinas Bt o

30

microorganismos que las expresen, y 4) control de plagas agrícolas por medio de plantas transgénicas que producen las toxinas Bt.

- 5 Las proteínas Cry se pueden dividir en varios grupos de acuerdo a su homología. El grupo que contiene el mayor número de variantes de toxinas Cry es el grupo de proteínas Cry de 3-dominios. Los otros grupos de homología de las toxinas Cry incluyen a las toxinas Cry semejantes a toxinas Bin y Mtx producidas por *Bacillus sphaericus* (Crickmore *et al.*, 1998; Crickmore *et al.*, 2002).
- 10 A la fecha se han aislado una gran cantidad de cepas de Bt, encontrando toxinas activas hacia insectos lepidópteros, dípteros o coleópteros (Schnepf *et al.* 1998). Las toxinas Cry matan a los insectos porque forman poros líticos en la membrana de las células del epitelio intestinal de la larva.
- 15 **Estructura de las Toxinas Cry de 3 dominios.** Los miembros de la familia de las toxinas Cry de 3 dominios son proteínas globulares conformadas por tres dominios conectados por conectores sencillos. Las estructuras tridimensionales de las toxinas activadas con proteasas de Cry1Aa (específica para lepidópteros), Cry3A, Cry3B (específicas para coleópteros), Cry4Aa y Cry4Ba (específicas para dípteros) y de la protoxina de Cry2Aa (específica para dípteros y lepidópteros) han sido reportadas (Grouchulski *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1991; Galistki *et al.*, 2001; Morse *et al.*, 2001; Boomserm *et al.*, 2005; Boomserm *et al.*, 2006). La identidad de secuencias es baja entre algunas de estas toxinas. Por ejemplo, entre las toxinas Cry2Aa y Cry3Aa existe un 20% de identidad y las toxinas Cry2Aa y Cry1Aa presentan solo un 17% de identidad en sus
- 20 secuencias. A pesar de la baja identidad de secuencias de estas toxinas, su estructura tridimensional es similar, sugiriendo que comparten mecanismos de acción similares (Figura 1).

30 Cada toxina de la familia de toxinas Cry de 3-dominios tiene tres dominios estructurales, denominados I, II, y III. El dominio I está formado por ramillete de siete hélices- α en donde la hélice central (hélice α -5) está rodeada por las hélices externas. La hélice α -5 es altamente conservada dentro de la familia de toxinas Cry de 3-dominios. Este dominio se le ha implicado en la formación del poro iónico en la membrana del insecto blanco. El

dominio II consiste en tres laminas- β anti-paralelas empacadas rodeando un centro hidrofóbico formando un prisma de estructuras- β . Al dominio II se le ha denominado el dominio que determina especificidad, es el dominio mas variable (de Maagd *et al.*, 2001). Los residuos aminoácidos involucrados en los contactos entre los dominios I y II (presentes en la hélice α -7 y la lámina β -1) están altamente conservados dentro de la familia de toxinas Cry. El dominio III esta formado por dos hojas de laminas- β antiparalelas. Este dominio también esta involucrado en especificidad e interacción con el receptor (de Maagd *et al.*, 2001). Los contactos entre dominios II y III (que corresponden a láminas β -11 y β -12) así como la región interior del dominio III (que corresponde a láminas β -17 y β -23) también están altamente conservados dentro de la familia de toxinas Cry de 3-dominios.

Mecanismo de acción. Para matar a los insectos, las toxinas Cry de 3-dominios pasan de ser cristales paraesporales compuestos de protoxinas a canales iónicos formados por estructuras oligoméricas insertadas en la membrana que causan salida de iones y la lisis celular. El cristal paraesporal es ingerido por la larva susceptible, este cristal se solubiliza dentro del intestino de la larva. Como se muestra en la figura 1, las protoxinas solubilizadas son cortadas por las proteasas del intestino dando como producto fragmentos proteicos de 60-70 kDa (de Maagd *et al.*, 2001). Esta activación inicial de la toxina involucra el procesamiento proteolítico del extremo N-terminal (25-30 aminoácidos para toxinas Cry1, 58 residuos para toxinas Cry3 y 49 para la Cry2Aa) y para el caso de las protoxinas Cry largas de 130 kDa (Cry1, Cry4, Cry5, Cry7-Cry14, Cry16-21, Cry24-Cry32, Cry39-44, Cry47-48 y Cry50) también se procesa en su extremo C-terminal aproximadamente la mitad de la proteína.

25

Después del corte proteolítico inicial, la toxina se une a receptores específicos en membrana de microvellosidad apical (cabeza de cepillo) de las células columnares presentes en el epitelio intestinal (Schnepf *et al.*, 1998; de Maagd *et al.*, 2001). La interacción con el receptor primario induce un segundo corte proteolítico de la toxina en donde se elimina la hélice α -1. Después del segundo corte, la molécula de toxina esta completamente activada y puede asociarse con otras moléculas similares para formar una estructura oligomérica. El oligómero de la toxina presenta una alta afinidad por el segundo receptor (aminopeptidasa o fosfatasa alcalina). La interacción con el segundo

30

receptor facilita la inserción en los microdominios de membrana (Schnepf *et al.*, 1998; Aronson y Shai, 2001; Bravo *et al* 2004; Pardo *et al* 2006). La inserción de la toxina conduce a la formación de poros líticos en la membrana de microvellosidad apical, y finalmente a la muerte de las células (Schnepf *et al.*, 1998; Aronson y Shai, 2001).

5

En insectos lepidópteros se han descrito por lo menos cuatro diferentes proteínas capaces de unir a las toxinas Cry1A: el receptor primario esta caracterizado como una proteína semejante a las caderinas (CADR); los receptores secundarios son dos proteínas ancladas a la membrana por un puente de glicosilfosfatidil-inositol (GPI), aminopeptidasa-N (APN) y fosfatasa alcalina (FAL). Finalmente un glicoconjugado de 270 kDa también se ha reportado como posible receptor primario (Vadlamudi *et al.*, 1995; Knight *et al.*, 1994; Jurat-Fuentes *et al.*, 2004; Valaitis *et al.*, 2001).

En esta invención utilizaremos la abreviación CADR para referirnos a las proteínas tipo caderina –que funcionan como receptor primario para una o más toxinas de Bt. Debido a que aun no se ha establecido una nomenclatura sistemática para estas proteínas los nombres de las diferentes CADRs presentes en diferentes insectos varían, por ejemplo, Bt-R₁ para la caderina de *Manduca sexta* (Vadlamudi *et al.*, 1995) y BtR para *P. gossypiella* (Morin *et al.*, 2003). Las CADRs son proteínas transmembranales con un dominio citoplásmico y con un ectodominio extracelular que contiene varios motivos repetidos que caracterizan a las caderinas, 12 motivos repetidos en el caso de Bt-R₁ (Vadlamudi *et al.*, 1995). Estos ectodominios contienen sitios de unión a calcio, secuencias de interacción con integrinas y secuencias de unión a caderinas.

El proceso secuencial en la interacción de la toxina con los diferentes receptores ha sido descrita en detalle para la toxina Cry1A en *Manduca sexta*. En este insecto, la toxina se une primero al receptor primario Bt-R₁. Después de que la toxina oligomeriza, se une a los receptores secundarios anclados por GPI a la membrana, APN o FAL (Bravo *et al.*, 2004; Jurat-Fuentes *et al.*, 2006).

30

La unión de la toxina Cry1Ab al receptor Bt-R₁ en *M. sexta* promueve un corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal de la toxina (eliminando la hélice α -1). Este corte facilita la formación de un pre-poro con estructura oligomérica que incrementa

su afinidad con el receptor secundario y que es importante para la inserción de la toxina en la membrana y para la toxicidad (Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004a). La incubación de la protoxina Cry1Ab con las proteasas presentes en el intestino de *M. sexta* en presencia del anticuerpo de cadena sencilla scFv73, quien mimetiza al sitio de unión presente en el receptor Bt-R₁, también produce preparaciones de toxina 5 conteniendo el oligómero de 250 kDa, el cual carece de la hélice α -1 del dominio I (Gómez *et al.*, 2002, 2003). Este oligómero de 250 kDa también se forma cuando la protoxina de Cry1Ab se incuba con las proteasas del intestino de *M. sexta* en presencia de péptidos que contienen la secuencia de receptor Bt-R₁ para la unión específica de la 10 toxina (regiones repetidas de CADR 7 y 11) (Gómez *et al.*, 2002, 2003).

Las estructuras oligoméricas de Cry1Ab y Cry1Ac aumentan su afinidad de unión al receptor secundario APN unas 100 a 200-veces, mostrando constantes de disociación aparentes de 0.75-1 nM (Gómez *et al.*, 2003, Pardo *et al.*, 2006). El oligómero de 250 15 kDa, en contraste con el monómero de 60 kDa, es competente en la inserción en membrana (Rausell *et al.*, 2004a). Análisis de formación de poro en bicapas lipídicas planas formadas con lípidos sintéticos demostraron las diferencias en la formación de poro de los oligómeros y los monómeros de Cry1Ab. En primer lugar, la formación de poro ocurre a una concentración mucho menor con el oligómero que con el monómero. 20 En segundo lugar, los canales iónicos inducidos por el oligómero son más estables y presentan una alta probabilidad de apertura a diferencia de los inducidos por el monómeros (Rausell *et al.*, 2004a).

La formación de oligómeros de toxinas Cry ha sido demostrado para las toxinas Cry1Aa, 25 Cry1Ab, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa, Cry1Ca, Cry3A, Cry3B, Cry3C y Cry4B (Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004a, Rausell *et al.*, 2004b; Herrero, S. *et al.*, 2004; Muñoz-Garay *et al.*, 2006; Tigue, *et al.* 2001; Likitvivanavong, *et al.* 2006). También la toxina Cry11Aa oligomeriza en presencia de sus receptores (Pérez, personal 30 comunicación). En todos estos casos, la actividad de formación de poro fue mucho mayor en las muestras de toxina que contenían estructuras oligoméricas a diferencia de las que solo contenían estructuras monoméricas de la toxina. Estos datos apoyan la hipótesis de que la formación de oligómero de toxinas Cry incrementa la toxicidad de estas proteínas.

Los receptores APN y FAL se han implicado en el proceso de inserción de las toxinas Cry1A en la membrana. La eliminación de APN y FAL por medio de un corte del GPI con tratamiento de fosfolipasa C específica de fosfatidil-inositol (esta enzima remueve a las proteínas ancladas con GPI) abate significativamente los niveles de oligómero de Cry1Ab insertado en microdominios de membrana y reduce drásticamente la actividad de formación de poro de la toxina (Bravo *et al.*, 2004). Además, la incorporación de APN en bicapas planas sintéticas incrementa la actividad de formación de poro de la toxina Cry1Aa (Schwartz *et al.*, 1997).

Basados en los datos descritos arriba, se ha propuesto un modelo del mecanismo de acción de las toxinas Cry1A el cual involucra la interacción secuencial de las toxinas Cry1A primero con receptor Bt-R₁ y luego con las moléculas de APN-FAL. La interacción del monómero de Cry1A con el receptor caderina facilita la formación de una estructura de pre-poro oligomérico el cual presenta un incremento en la afinidad en la unión con el segundo receptor APN o FAL. El pre-poro de la toxina se une entonces a APN o FAL. Finalmente, el pre-poro de la toxina es insertado en microdominios de membrana (ó balsas lipídicas) induciendo la formación de poro y la lisis celular (Bravo *et al.*, 2004).

Resistencia en Insectos a las Toxinas Cry. El mecanismo principal de resistencia a las toxinas Cry involucra una reducción en la unión de la toxina a los receptores presentes en el intestino del insecto (Ferré y Van Rie, 2002). Mutaciones en genes que codifican para CADR_s están fuertemente ligadas con resistencia a toxinas Cry1A en al menos tres insectos plaga de mayor importancia: *H. virescens* (Gahan *et al.*, 2001), *Pectinophora gossypiella* (pink bollworm) (Morin *et al.*, 2003) y *Helicoverpa armigera* (Xu *et al.*, 2005). En el caso del gusano dorso de diamante (DBM) *Plutella xylostella*, una plaga mundial de hortalizas como brócoli y coliflor, la resistencia “tipo 1” no esta ligada a mutaciones directamente en el gene de caderina. Sin embargo, es posible que la mutación en esta línea de insectos resistentes pudiera afectar indirectamente la expresión de la proteína caderina (Baxter *et al.* 2005)

La creación de cultivos transgénicos que producen toxinas Cry para matar a los principales insectos plaga es un parte aguas en relación con la reducción en el uso

insecticidas químicos y en incrementar el uso de alternativas compatibles y amigables con el ambiente para el control de insectos. Las toxinas Cry son producidas continuamente en las plantas transgénicas, lo que les permite controlar a insectos barrenadores que están protegidos de los insecticidas químicos asperjados en la superficie. La producción de toxinas Cry se ha mejorado mediante la ingeniería genética de los genes *cry* para tener un uso de codones compatible con el de las plantas, eliminando las posibles secuencias de procesamiento del RNA y recortando la región C-terminal de la protoxina (Schuler *et al.*, 1998).

Las plantas transgénicas resistentes a insectos, se han utilizado a gran escala desde 1996. El maíz-Bt y el algodón-Bt se han crecido en 26 millones de ha 2005 (James 2005). Este uso tan amplio de los cultivos-Bt provoca una intensa presión de selección de resistencia a toxinas de Bt en las poblaciones de insectos plaga (Tabashnik 1994, Gould 1998). Si el insecto plaga desarrolla resistencia, la utilidad de toxinas Bt se termina. En respuesta a este reto, se han desarrollado e implementado estrategias de manejo de resistencia para prolongar la efectividad de los cultivos-Bt.

La principal estrategia para prevenir la resistencia a cultivos-Bt es la utilización de refugios (Gould 1998). Los refugios son áreas de cultivos no-transgénicos crecidos en la vecindad de los cultivos-Bt. El objetivo de la estrategia de refugios es retrasar la resistencia manteniendo poblaciones de insectos susceptibles que puedan aparearse con insectos resistentes. En la mayoría de los casos estudiados, la resistencia a las toxinas Cry se confiere por mutaciones recesivas (Ferré y Van Rie, 2002; Conner *et al.*, 2003; Tabashnik *et al.*, 2003). Con la resistencia recesiva, el entrecruzamiento entre insectos homocigotos resistentes que puedan emerger de los cultivos-Bt con insectos homocigotos susceptibles del área de refugio producirá descendencia heterocigota la cual es susceptible a la toxina Cry expresada por los cultivos-Bt. Aun cuando esta estrategia parece ser útil para retrasar la resistencia, no se han llevado a cabo las pruebas de campo rigurosa a gran-escala (Tabashnik *et al.*, 2005). En cualquier caso, con la estrategia de refugio se espera retrasar la resistencia, no prevenirla.

La resistencia a cultivos-Bt en el campo no ha sido reportada aun, sin embargo la selección en laboratorio ha generado cepas resistentes a Bt en muchos insectos plaga

(Tabashnik, 1994; Ferré y Van Rie, 2002; Tabashnik, *et al.*, 2003). Más aún, la resistencia a las toxinas Bt en aspersiones tipo spray se ha desarrollado en poblaciones en campo del gusano dorso de diamante, *Plutella xylostella* (L.), y en poblaciones de invernadero del enrollador de coliflor, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Tabashnik, 1994; Ferré y Van Rie, 2002; Janmaat y Meyers, 2003; Tabashnik *et al.*, 2003). Con un uso extensivo de las toxinas Bt a nivel mundial y con el rápido incremento en su utilización, la resistencia en los insectos plaga a las toxinas Cry que actualmente se usan es una amenaza cada vez mas importante para la salud humana, para la producción de alimentos y para el medio ambiente. Por lo tanto, las Toxinas Cry Modificadas que maten a insectos resistentes son deseables y absolutamente necesarias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FIGURAS

Figura 1. - Mecanismo de acción de las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas

Figura 2. - Mecanismo de acción de las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas

Figura 3. – Diseño de primers para reacción de PCR de las toxinas Cry largas (130 kDa) y cortas (70 kDa)

Figura 4. – Estrategia de PCR para la producción de los genes *cry1Ab* y *cry1Ac* careciendo del extremo N-terminal de la proteína hasta el final de la hélice α -1.

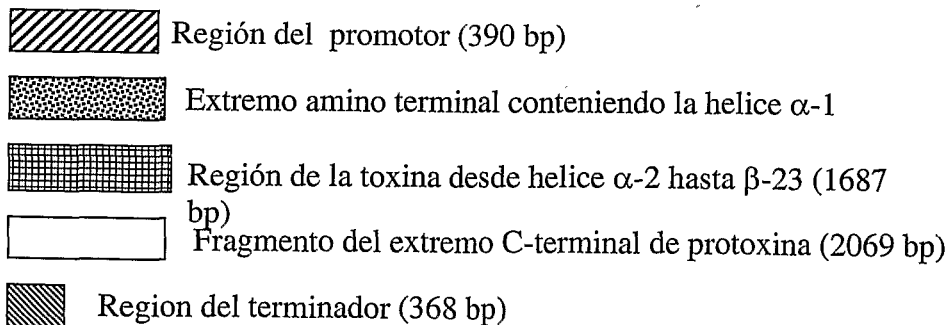


Figura 5. – Electroforesis en geles de archilamida SDS-PAGE de Toxinas Cry1Ab y Cry1Ac mutantes Modificadas careciendo de la hélice α -1 mostrando la producción de una proteína de protoxina de 130 kDa.

Figura 6.- Detección por medio de inmunodetección tipo Western blot de las estructuras oligoméricas (250 kDa) de la toxina Cry1Ab No-modificada obtenida después de incubar la protoxina Cry1Ab con jugo gástrico del intestino de *Manduca sexta* en presencia de fragmentos proteicos de CADR (conteniendo las repeticiones 7-12, 11-12 o 12) o en la presencia del anticuerpo scFv73 o sin ningún fragmento de CADR o anticuerpo (control).

Figura 7. - Detección por medio de inmunodetección tipo Western blot de las estructuras oligoméricas (250 kDa) obtenidas únicamente por tratamiento con tripsina de las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas, Cry1AbMod y Cry1AcMod.

Figura 8. – Electroforesis en geles de agarosa mostrando el RNA de doble cadena (dsRNA) del fragmento del gene de Bt-R₁ y del gene control obtenido después de la transcripción *in vitro* con T7 polimerasa.

Figura 9. - Detección por medio de inmunodetección tipo Western blot de los homogenados de intestino larvario (10 µg) revelados con anticuerpo anti Bt-R1 o con anticuerpo contra las proteínas totales de la microvellosidad apical del intestino (anti-BBMV). Los controles (líneas 1 y 2) son dos larvas independientes que fueron inyectadas con agua y cultivadas en dieta artificial sin toxina. Las muestras del intestino de 7 larvas independientes (líneas 3 a 9) que fueron inyectadas con 1 µg dsRNA Bt-R1 y cultivadas en dieta artificial con 20 ng Cry1Ab/cm².

Figura 10. – Larvas de *Manduca sexta* inyectadas con 1µg Bt-R1 dsRNA e incubadas en cajas de Petri por tres días en dieta artificial con: A) 20 ng Cry1Ab/cm²; B) 5 ng Cry1AbMod/cm²; C) agua (control).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30 Definiciones.

El termino “Toxina(s) Cry de 3-Dominios” se refiere a un (algunos) miembro(s) de un subgrupo de la familia de proteínas insecticidas de cristal también llamadas toxinas Cry,

toxinas Bt, o δ -endotoxinas, que son proteínas globulares formadas por tres dominios estructurales distintos (I, II y III) conectados por uniones simples. Aun cuando la identidad de secuencia entre algunas de estas toxinas es baja, su topología estructural es similar, sugiriendo que comparten un mecanismo de acción similar (Figura 1). Entre estas toxinas de 3-dominios, la presente invención está particularmente dirigida al grupo muy conocido de toxinas Cry cortas (Cry3, Cry2 y Cry11) y toxinas Cry largas (Cry1, Cry4, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry 16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry28, Cry29, Cry30, Cry31, Cry32, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry47, Cry48 y Cry50), las cuales comparten mecanismo de acción. Para matar a los insectos, estas toxinas se deben a unir a un receptor primario antes de formar una estructura oligomérica que se inserta en la membrana para crear poros.

El término "Toxina(s) Cry de 3-Dominios No-modificada(s)" significa toxina Cry de 3-dominios silvestre que no ha sido modificada. Estas toxinas no-modificadas requieren unirse al primer receptor y ser enzimáticamente procesadas, eliminando la hélice $\alpha-1$ para estar completamente activadas y ser tóxicas hacia las larvas susceptibles (Figura 1).

El término "Toxina(s) Cry de 3-Dominios Modificada(s)" se refiere a las toxinas Cry de 3-dominios que fueron modificadas para carecer de la hélice $\alpha-1$. Estas toxinas no requieren unirse al primer receptor ni que su hélice $\alpha-1$ sea procesada enzimáticamente para ser activas (Figure 2).

Los términos "Cry1AbMod" y "Cry1AcMod" significan dos Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas particulares que carecen de hélice $\alpha-1$, y que corresponden a las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas, Cry1Ab y Cry1Ac, respectivamente.

El término "Insectos Resistentes Elegibles" se refiere a los insectos resistentes a Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas cuya resistencia está ligada con mutaciones que afectan la expresión del gen del receptor primario (denominado caderina para toxinas Cry1A), ya sea que las mutaciones estén presentes directamente en el gen del receptor primario o bien en otros genes que afecten la expresión de dicho receptor primario. Ya

que cuando el receptor primario es modificado, truncado, o no se expresa, la unión de las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas a la membrana apical de las células del intestino se reduce o se elimina y la toxina no se puede activar completamente, no forma el oligómero, no se inserta en la membrana y no mata a los insectos. Por lo tanto, estos insectos son resistentes a las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas. Estos insectos resistentes son el blanco de las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas de la presente invención, en donde las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas suprimen la resistencia de los insectos ya que son capaces de formar el oligómero, de insertarse en la membrana y finalmente de matar a estos insectos resistentes.

Como se dijo arriba, existe un problema que puede ser un asunto de mayor importancia pronto en agricultura, en bosques y salud pública. Este problema es la aparición de resistencia a las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas en insectos plaga que continuamente estén expuestos a estas toxinas, ya sea que éstas toxinas estén asperjadas o sean producidas por las plantas transgénicas. Diferentes estrategias han emergido para retrasar este problema, pero no se espera que estas estrategias lo prevengan o que lo resuelvan una vez que ocurra.

Los inventores de esta invención concibieron y llevaron a la práctica una manera de suprimir la resistencia en los insectos a las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas por los Insectos Resistentes Elegibles con las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas las cuales sobrepasan dos pasos en el mecanismo de acción de las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas (Figura 2): 1) la unión de la toxina al receptor primario y 2) el corte proteolítico adicional en el extremo N-terminal de la toxina que permite el corte de la hélice α -1. Estos pasos son requeridos para facilitar la formación de un pre-poro con estructura oligomérica por las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas, el pre-poro oligomérico es importante para la inserción en membrana y para la toxicidad (Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004a).

Esta invención se base en el conocimiento del mecanismo de acción de ciertos miembros de la familia de toxinas Cry de 3-dominios (ilustrado en Figura 1), el cual se espera que sea común para los otros miembros de la familia de toxinas Cry de 3-Dominios (Bravo *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2002; Rausell *et al.*, 2004a, Rausell *et al.*, 2004b; Herrero, S. *et*

al., 2004; Muñoz-Garay *et al.*, 2006). Esta invención esta también basada en el conocimiento de que defectos en el receptor primario constituye el mecanismo mas común e importante por el cual los insectos se vuelven resistentes a las toxinas Cry (Gahan *et al.*, 2001, Ferré y Van Rie, 2002; Morin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005).

5

En el primer alcance, la presente invención se relaciona con un método para obtener construcciones de DNA que codifiquen para Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas que carezcan de la hélice α -1. Como se menciona anteriormente, el corte enzimático *in vivo* de esta porción de la toxina facilita la formación de un pre-poro oligomérico en las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas (Figura 1). A diferencia de las Toxinas Cry de 3-Dominios No-modificadas, las llamadas las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas no requieren para su toxicidad ni de la unión al receptor primario (CADR para toxinas Cry1A) ni del corte enzimático de la hélice α -1 asociada con la unión al receptor primario (Figura 2). Estas construcciones de DNA son útiles para producir las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas que sobrepasan el paso de unión al receptor primario y el corte enzimático de la hélice α -1. Las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas son útiles ya sea producidas por plantas transgénicas o expresadas en otros sistemas como microorganismos o aplicados de otra manera como podrían ser insecticidas tipo spray.

20

El método para obtener las construcciones de DNA que codifican para Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas que carecen de hélice α -1 consiste de los siguientes pasos:

- a) Seleccionar el gen blanco de la toxina Cry de 3-Dominios que se desea modificar.
- 25 b) Identificar la región del promotor, la región que codifica para el fragmento de proteína, y la región codificante de la hélice α -1.
- c) Amplificar el gen excluyendo la región que codifica para el extremo amino-terminal y la hélice α -1.

30

La amplificación del gene que carece de hélice α -1 se puede llevar a cabo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando un templado adecuado de DNA que contenga el gen de la Toxina Cry de 3-Dominios No-modificada que se haya seleccionado. Esto se hace en dos o mas pasos de amplificación, dependiendo en el

tamaño del gen y en los fragmentos que se desea manejar. El primer paso de amplificación (PCR1) amplifica solo la región del promotor, el segundo PCR (PCR2) y los subsiguientes pasos de amplificación (PCR3) amplifican la región codificadora empezando en la hélice α -2 hasta la β -23 y si esta presente también se amplifica la región que correspondela extremo carboxiterminal de la proteína.

Para el PCR1, se diseñan oligonucleótidos primeros de la reacción de amplificación que incluyen el codón de inicio (ATG) y el sitio interno de restricción *Nco*1. Para el PCR2 y las siguientes amplificaciones, los oligonucleótidos deben ser diseñados para obtener el numero de fragmentos de DNA deseados para incluir le región codificante de la proteína incluyendo desde la hélice α -2 hasta la lamina β -23. El extremo carboxiterminal de la proteína, si esta presente en la Toxina Cry de 3-dominios seleccionada, también debe ser amplificado incluyendo la región del terminador de la proteína.

Preferentemente, los oligonucleótidos deben incluir sitios de restricción en sus extremos 5' que no estén presentes en el gen seleccionado. El sitio interno *Nco*1 puede ser usado para unir al producto del PCR1 con el del PCR2. Los sitios de restricción serán seleccionados de tal manera que el extremo 3' del producto de la reacción del PCR-1 pueda ser ligado solo al extremo 5' del producto de la reacción del PCR-2, y el extremos 3' del producto del PCR-2 puede ser ligado solo al extremo 5' del producto del PCR-3 y así sucesivamente. (Figura 3). De preferencia, los sitios específicos de restricción que se incluyen en el extremo 5' del producto del PCR1 conteniendo la región del promotor y en el extremo 3' del PCR que contiene el terminador deben servir para ligar estos fragmentos de DNA a un vector plasmídico adecuado.

La aplicación de este método se ilustra en el ejemplo 1 para las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac. Sin embargo, puede ser aplicado para cualquier otra Toxina Cry de 3-Dominios No-Modificada para obtener la correspondiente Toxina Cry de 3-Dominios Modificada carente de la hélice α -1. La página web de Neil Crickmore (Crickmore, N., Zeigler, D.R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J, Bravo, A. y Dean, D.H. "*Bacillus thuringiensis* toxina nomenclature" 2005, http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/) enlista la mayoría de las toxinas Cry y Toxinas Cry de 3-Dominios conocidas, incluyendo los números de acceso

NCBI de su DNA codificante. Cualquiera de esas Toxinas Cry de 3-Dominios puede ser seleccionada para aplicarle el método de la presente invención para obtener la respectiva construcción de DNA de la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada. La expresión de estas construcciones de DNA puede lograr fácilmente, como se muestra en el ejemplo 2.

5

Preferentemente, el vector plasmídico será un vector con doble origen de replicación que pueda replicarse en células de *Escherichia coli* y de *Bacillus thuringiensis*. Los vectores de expresión pueden contener un marcador de selección, el cual es un gen codificante de una proteína necesaria para la sobrevivencia o para el crecimiento de la célula huésped transformada con el vector. Típicamente, los genes de marcador de selección codifican para proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras sustancias (por ejemplo, ampicilina, neomicina, o metotrexato). Los genes de marcadores de selección pueden también ser genes que complemente deficiencias auxotróficas o que proporcionen nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo. La elección del gen del marcador de selección adecuado dependerá de la célula huésped; en el estado de la técnica se conocen marcadores de selección adecuados para diferentes huéspedes.

10

15

La mezcla de ligación puede ser transformada en células de *E. coli*, y el plásmido transformante puede ser entonces purificado y transformado en células de *B. thuringiensis* para la expresión de Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas y la producción de bioinsecticidas. Alternativamente, el gen de Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas puede ser expresado en sistemas heterólogos tales como otros microorganismos utilizando vectores adecuados (incluyendo bacterias, virus, algas y hongos) u otros organismos incluyendo células de insecto y plantas transgénicas. Para plantas transgénicas, el vector debe ser adecuado para la transformación y expresión en plantas (tales como maíz, algodón y soya o otras), de tal forma que las plantas ingenieradas producirán las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas. Las plantas transformadas de esta manera pueden ser protegidas del ataque de insectos blanco que sean resistentes a las Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas. Los usos preferidos para la aplicación en bioinsecticidas en spray de las Toxinas Cry de 3-Dominios modificadas incluyen, sin limitar, la protección de vegetales y de bosques. Las plagas que preferentemente se pretende controlar de esta manera incluyen, pero no se limitan a, insectos lepidópteros.

20

25

30

Para demostrar como funciona este método, se obtuvieron fragmentos proteicos de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac que carecen de la hélice α -1, por medio del método de la presente invención como se ilustra en el Ejemplo 1.

5

Las construcciones de DNA que codifican para Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas que carecen de la hélice α -1 obtenidos por el método arriba descrito también quedan incluidas en alcance de la presente invención.

10 En el Ejemplo 2 se ilustran vectores que contienen las construcciones arriba mencionadas que codifican Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas, carentes de la hélice α -1, los cuales están incluidos en el alcance de la presente invención. Es bien conocido para aquellos expertos en la técnica que la elección de vectores dependerá de las células huésped que particularmente se usan. La células huésped genéticamente ingenieradas que
15 contengan los vectores antes mencionados también quedan incluidos, algunas células huésped preferidas incluyen bacterias, particularmente bacterias Gram positivas como las del género *Bacillus*, o bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y *Escherichia*, y células de plantas tales como maíz, soya, papa, algodón y otras plantas.

20 Los métodos recombinantes para producir las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas de la presente invención serán incluidos en el alcance de la presente invención. En general, estos métodos comprenden los pasos de cultivar las células huésped genéticamente ingenieradas conteniendo un vector que alberga las construcciones de DNA de Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas. Bajo condiciones de crecimiento
25 adecuadas, las células huésped genéticamente ingenieradas producen las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas. Estos métodos también incluyen la opción de recuperar las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas del cultivo celular, ya sea con esporas, o como proteínas purificadas, o contenidos dentro del organismo huésped.

30 Estos métodos están ilustrados en el Ejemplo 2 para dos Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas (Cry1AbMod y Cry1AcMod).

En otro alcance, se describen las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas codificadas. Las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas no requieren la unión al receptor primario, para la formación de la estructura de pre-poro oligomérico. Así, dado que Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas carecen de la hélice α -1 son tóxicas para Insectos Resistentes Elegibles, al mismo tiempo siguen siendo tóxicas para insectos sensibles a las Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas.

Como se mencionó anteriormente, después de la solubilización en el intestino medio, los siguientes tres pasos en el modo de acción son: 1) Corte enzimático inicial por las proteasas del intestino medio, causando la remoción de un péptido N-terminal y de la región C-terminal (si es que está presente en la toxina); 2) unión al receptor primario, y 3) segundo corte enzimático causando la remoción de la hélice α -1. Estos tres pasos producen una proteína capaz de formar la estructura oligomérica denominada pre-poro (Fig.1).

Un receptor primario (CADR) defectuoso es el mecanismo más importante y común de la resistencia en insectos a las Toxinas Cry (Gahan *et al.*, 2001, Ferré y Van Rie, 2002; Morin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005). Las alteraciones en el receptor primario reducen o eliminan la unión de Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas, previniendo aparentemente el corte enzimático de la hélice α -1 e inhibiendo la formación de la estructura oligomérica pre-poro necesaria para la toxicidad. Las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas carecen de la hélice α -1. De este modo, para matar insectos, estas toxinas no requieren unirse al receptor primario, ni tampoco del corte asociado con esta unión que resulta en la pérdida de la hélice α -1. Como no requieren la unión al receptor primario, los defectos en el receptor primario que bloquearían la unión, no bloquean su toxicidad. En otras palabras las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas suprimen la resistencia de insectos por que no requieren la interacción con el receptor primario.

Para ilustrar estas Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas, se obtuvieron construcciones de DNA que codifican para Toxinas Cry1Ab y Cry1Ac Modificadas (carentes de la hélice α -1) como se muestra en el Ejemplo 1, y las toxinas Modificadas fueron expresadas como se muestra en el ejemplo 2.

Para demostrar que las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas pueden formar estructuras oligoméricas de pre-poro, las protoxinas de dos Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas, Cry1AbMod y Cry1AcMod, fueron tratadas sólo con la proteasa tripsina produciendo así los oligómeros de 250 kDa. En contraste, el mismo tratamiento con tripsina de las protoxinas de las dos correspondientes Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas, Cry1Ab y Cry1Ac, sólo produjo la estructura de monómero de 60 kDa, como se muestra en el ejemplo 3.

La toxicidad de las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas fue determinada alimentando en bioensayos a larvas de insectos susceptibles y resistentes con dietas conteniendo diferentes concentraciones de la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada. La toxicidad de Cry1AbMod y Cry1AcMod se comparó con la de las contrapartes no modificadas Cry1Ab y Cry1Ac contra larvas de primer estadio larvario del gusano rosado (*Pectinophora gossypiella*) susceptible (silvestre) y gusano rosado resistente a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac. La toxicidad de Cry1AcMod también fue comparada con la de su contraparte, Cry1Ac No-Modificada, contra larvas del primer instar de las cepas susceptible y resistente a Cry1Ac del gusano dorso de diamante. Las toxinas No Modificadas Cry1Ab y Cry1Ac fueron altamente tóxicas para las larvas susceptibles, pero no así para las larvas resistentes (Tablas 1 y 2). En contraste, las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas Cry1AbMod y Cry1AcMod mataron tanto a las larvas susceptibles como a las resistentes (Tablas 1 y 2). Estos resultados muestran que las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas usadas como ejemplo (Cry1AbMod y Cry1AcMod) suprimen el alto nivel de resistencia a toxinas Cry1A No-Modificadas en los Insectos Resistentes Elegibles, que están asociadas a mutaciones que afectan la expresión del receptor primario (CADR en el caso de Cry1A), ya sean mutaciones directas en el gen de dicho receptor primario (como en el caso del pink bollworm) o en genes que afecten indirectamente la expresión del receptor primario (como en el caso del gusano dorso de diamante).

Para ensayar la toxicidad de Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas de la presente invención contra otro insecto blanco, *Manduca sexta*, para el cual aún no han sido aisladas o cultivadas poblaciones de insectos resistentes, se obtuvieron larvas de *M. sexta* con el receptor CADR silenciado y se ensayaron para determinar su resistencia a la

Toxina Cry1Ab No-modificada, según se describe en el ejemplo 5. Con estas larvas de *M. sexta* (con el receptor CADR silenciado) se ensayó la toxicidad de la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada Cry1AbMod, como se muestra en el ejemplo 6. Los resultados demuestran una vez más que las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas matan insectos que son resistentes a las correspondientes Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas.

En otro alcance, la presente invención se relaciona al método para suprimir la resistencia de los Insectos Resistentes Elegibles, la cual se basa en matar dichos insectos al permitirles comer alimentos que contienen una cantidad suficiente de Toxina Cry de 3-Dominios Modificada de la presente invención. La dosis letal depende de muchos factores incluyendo: la mezcla de excipiente utilizada; la técnica y condiciones de aplicación; si la formulación es un aerosol, una película, o partículas discretas; el grosor de la película o el tamaño de las partículas y otras por el estilo. La resolución de estos factores y otras consideraciones apropiadas para determinar la dosis letal de Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas están dentro de las habilidades de aquellos basados en la técnica.

Para alimentar los Insectos Resistentes Elegibles con Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas, dichas toxinas deben estar disponibles en la dieta de las poblaciones de insectos. Esto se puede hacer por aplicación de formulaciones que contengan las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas. Esto puede también hacerse generando plantas transgénicas que contengan las construcciones de DNA que codifican las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas ligadas de manera operable a vectores de expresión adecuados para plantas, de tal forma que dicha planta transgénica produzca las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas.

Las formulaciones y los organismos transgénicos pueden ser utilizados para cultivos agrícolas, bosques y para control de vectores de enfermedades. Por ejemplo, existen algunos árboles modificados genéticamente para producir toxinas Bt, también se ha modificado genéticamente algas para producir toxinas Bt para controlar mosquitos.

Para matar a los Insectos Resistentes Elegibles, se pueden aplicar periódicamente formulaciones que contengan las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas donde la plaga

de insectos se alimenta. Por ejemplo, se puede aplicar a plantas (hojas, tallos, raíces u otras partes de la planta) para matar los Insectos Resistentes Elegibles plagas de cosechas o bosques, y en cuerpos de agua para matar a los Insectos Resistentes Elegibles vectores de enfermedades humanas que viven en el agua durante su etapa larvaria (por ejemplo, mosquitos y moscas negras). Esto se puede hacer en ciclos alternando las aplicaciones de formulaciones que contengan Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas (sin las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas) con aplicaciones de formulaciones que contengan Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas. Las Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas pueden ser aplicadas hasta que se calcule u observe la aparición de Insectos Resistentes Elegibles, entonces las formulaciones que contienen a las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas pueden ser entonces aplicadas para matar los insectos resistentes.

Otro alcance de la presente invención se relaciona a nuevas formulaciones o composiciones que contengan una o más Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas para suprimir la resistencia de los Insectos Resistentes Elegibles. En las formulaciones, las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas pueden estar contenidas en organismos huésped o asociadas con esporas, o en una preparación homogénea de proteínas puras o en una mezcla de esporas con los organismos transformados cultivados. Las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas pueden también estar contenidas en un microorganismo no-esporulante como *Escherichia coli* o un microorganismo esporulante tal como *Bacillus megaterium* o *B. thuringiensis*, asociado con esporas de la cepa utilizada para expresarlas o como cristales aislados (y opcionalmente proteína Cry pura) junto con una mezcla de excipientes. La cantidad de la mezcla de excipiente a utilizar dependerá de la potencia deseada de la formulación. En la elección de la mezcla de excipientes componentes de la formulación, se debe considerar el propósito final pretendido de la formulación. Por ejemplo, mezclas de excipientes agrónomicamente aceptables debieran ser utilizadas para formulaciones que serán aplicadas a cultivos y mezclas de excipientes ecológicamente aceptables debieran ser seleccionadas para formulaciones que serán aplicadas a bosques (para controlar los Insectos Resistentes Elegibles de plagas forestales) y a cuerpos de agua (para controlar a los Insectos Resistentes Elegibles de insectos vectores).

La mezcla de excipientes puede comprender acarreadores, agentes surfactantes, protectores UV y otros componentes, y pueden tomar la forma de polvos humectables, concentrados líquidos, gránulos u otras formulaciones. Estas formulaciones y los procedimientos de aplicación son bien conocidos en la técnica.

5

El término "excipiente" como se está utilizando aquí significa un material sólido o líquido inerte, el cual puede ser inorgánico u orgánico y de origen sintético o natural, con el cual es mezclado o formulado el compuesto activo para facilitar su aplicación a las plantas, semillas, suelos, agua u otros objetos a ser tratados, o su almacenamiento, transporte y/o manejo. Cualquiera de los materiales comúnmente empleados en la formulación de bio-pesticidas –por ejemplo son adecuados los adyuvantes aceptables en horticultura, agricultura y ecología–.

10

Algunos excipientes sólidos adecuados son arcillas y silicatos naturales y sintéticas, por ejemplo, sílica natural tal como tierras de diatomeas; silicatos de magnesio, por ejemplo, talco; silicatos de magnesio aluminio, por ejemplo, atapulgitas y vermiculitas; silicatos de aluminio, por ejemplo, caolinitas, montmorilonitas y micas; carbonato de calcio; sulfato de calcio; óxidos hidratados de silicón sintéticos y silicatos sintéticos de calcio o aluminio; elementos tales como, por ejemplo, carbono y azufre; resinas naturales y sintéticas tales como, por ejemplo, resinas de cumarone, cloruro de polivinilo y polímeros y copolímeros de estireno; bitumen; ceras tales como, por ejemplo, cera de abeja, cera parafina, y ceras minerales clorinadas; fertilizantes sólidos, por ejemplo, superfosfatos; y materiales fibrosos naturales molidos, tales como olotes molidos.

15

20

Ejemplos de excipientes líquidos adecuados son agua, alcoholes tales como alcohol isopropílico y glicoles; cetonas tales como acetona, metil etil cetona, metil isobutil cetona y ciclohexanona; éteres tales como cellosolves; hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y xileno; fracciones de petróleo tales como queroseno, aceites minerales ligeros; hidrocarburos clorinados tales como tetracloro carbono, percloroetileno y triclorometano. Otros compuestos adecuados son compuestos licuados, que normalmente son vapores o gases. Mezclas de diferentes líquidos son comúnmente adecuados.

30

Se puede adicionar un agente surfactante, puede ser un agente emulsificante, un agente

dispersante o un agente humectante: puede ser no-iónico o iónico. Cualquiera de los agentes surfactantes usualmente aplicados en la formulación de herbicidas o insecticidas puede ser utilizado. Algunos ejemplos de agentes surfactantes adecuados son las sales de sodio y calcio de ácidos poliacrílicos y sulfónicos; los productos de condensación de ácidos grasos o de aminas alifáticas o amidas que contengan al menos 12 átomos de carbono en la molécula con oxido de etileno y/o oxido propileno; ésteres de glicerol y ácidos grasos, sorbitan, sacarosa o pentaeditol; condensados de éstos con oxido de etileno y/o oxido propileno; productos de condensación de alcoholes grasos o alquilfenoles, por ejemplo, *p*-octilfenol o *p*-octilcresol, con oxido de etileno y/o oxido propileno; sulfatos o sulfonatos de estos productos de condensación, sales de álcalis o metales alcalinoterreos, preferentemente sales de sodio de ésteres de ácido sulfúrico o sulfónico que contengan al menos 10 átomos de carbono en la molécula, por ejemplo, lauril sulfato de sodio, alquil secundarios sulfato de sodio, sales de sodio de aceite de castor sulfonado, y alquil-aril sulfonatos de sodio tales como dodecilbenzeno sulfonato de sodio; y polímeros de óxido de etileno y copolímeros de oxido de etileno o propileno.

Algunos ejemplos de protectores UV son referidos en la patente norteamericana No. 5,141,744, donde se describen macrogeles estables (por al menos seis meses) que contienen protectores UV (como Octal-dimetil PABA) que son usados con pesticidas incluyendo toxinas Bt los cuales ofrecen ventajas para proteger contra la inactivación por la luz solar. La patente norteamericana No. 4,094,969 divulga otra manera de estabilizar formulaciones pesticidas que contengan toxinas Bt que rápidamente se degradan con la exposición de la luz solar mediante la adición de copolímeros sulfonatados.

Las composiciones de la presente invención pueden ser preparadas como polvos humectables polvos, gránulos, soluciones, concentrados emulsificables, emulsiones, concentrados en suspensión y aerosoles. Los polvos humectables usualmente están compuestos para contener de un 25 a un 75% en peso del compuesto activo y usualmente contienen, además del acarreador sólido, de 3 a 10% en peso de un agente dispersante, 12 a 15% de un agente surfactante y, cuando es necesario, hasta 0 a 10% en peso de estabilizadores y otros aditivos tales como penetradores o adhesivos. Los polvos son usualmente formulados como un polvo concentrado que tiene una composición similar a la de los polvos humectables pero sin los agentes dispersantes o surfactantes, y son

diluidos en el campo con acarreadores sólidos adicionales para dar una composición que usualmente contiene de 0.5 a 10% en peso del compuesto activo. Los gránulos son usualmente preparados para tener un tamaño entre 10 y 100 BS mesh (1,676-0.152 mm), y pueden ser manufacturados por técnicas de aglomeración o impregnación.

5 Generalmente, los gránulos contendrán de 0.5 a 25% en peso del compuesto activo, 0 a 1% en peso de aditivos tales como estabilizantes, modificadores de liberación lenta y agentes aglutinantes. Los concentrados emulsificables usualmente contienen, además del solvente y, cuando es necesario, el cosolvente, de 10 a 50% peso por volumen del compuesto activo, 2 a 20% en peso por volumen de emulsificantes y 0 a 20% en peso por

10 volumen de aditivos apropiados tales como estabilizantes, penetrantes e inhibidores de corrosión. Los concentrados en suspensión están compuestos para obtener un producto estable, no sedimentable y fluido y usualmente contienen de 0 a 75% en peso del compuesto activo, de 0.5 a 5% en peso de agentes dispersantes, de 1 a 5% de agentes surfactantes, de 0.1 a 10% en peso de agentes suspensores, tales como antiespumantes,

15 inhibidores de corrosión, estabilizadores, particularmente para la proteína, penetrantes y adhesivos, y como acarreador, agua o un líquido orgánico en el cual el compuesto activo es sustancialmente insoluble; ciertos sólidos orgánicos o sales inorgánicas pueden ser disueltos en el acarreador para ayudar a prevenir la sedimentación o como agentes anticongelantes para agua.

20

Las formulaciones granulares dispersables en agua están en la forma de gránulos secos y duros que están esencialmente libres de polvo y son resistentes al desgaste o al manejo, minimizando de este modo la formación de polvo. Al contacto con agua, los gránulos se desintegran rápidamente para formar suspensiones de partículas del material activo. Tales

25 formulaciones contienen 90% o más en peso del material activo, 3 a 7% en peso de surfactantes molidos, los cuales actúan como humectantes dispersantes, agentes suspensores y aglutinantes, y 1 a 3% en peso de un acarreador, el cual actúa como un agente suspensor.

30

Las dispersiones acuosas y emulsiones, por ejemplo, formulaciones obtenidas al diluir un polvo humectable o un concentrado conforme a la invención con agua, también caen dentro del alcance de la presente invención. Dichas emulsiones pueden ser del tipo agua

en aceite o del tipo aceite en agua, o pueden tener una consistencia espesa tipo mayonesa.

Es evidente de lo arriba mencionado que esta invención contempla formulaciones que contienen tan poco como 0.0001% en peso hasta tanto como 95% en peso de una Toxina Cry de 3-Dominios Modificadas de la presente invención como el agente activo. Ya que los productos comerciales son preferentemente formulados como concentrados, el usuario final normalmente emplea formulaciones diluidas de concentración sustancialmente menores.

La composiciones de la presente invención pueden también contener otros ingredientes activos, por ejemplo, otros compuestos que posean propiedades pesticidas, especialmente insecticida (particularmente otras toxinas Cry y Cyt), acaricida o fungicida, según sea conveniente para el propósito destinado.

Las formulaciones que contienen a las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas son preparadas de modos conocidos, por ejemplo por mezclado homogéneo y/o molido de los ingredientes activos con la mezcla acarreadora.

Las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas de la presente invención también pueden ser administradas a la plaga de insecto blanco en plantas transgénicas que expresan estas Toxinas Modificadas. Hay varios cultivos transgénicos Bt comercialmente disponibles, incluyendo maíz y algodón. Los métodos para construir estas y otras plantas transgénicas para expresar genes de toxinas Cry Bt son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Brevemente hay varios métodos para transformar células y tejidos vegetales: El método de la "Pistola de genes", también conocido como bombardeo de micro proyectiles o biobalística (ver patentes norteamericanas No. 4,945,050 a Cornell y 5,141.131 a DowElanco, ahora Dow AgroSciences, LLC); el método de electroporación (ver WO 87/06614 a Boyce Thompson Institute y WO92/09696 y WO93/21335, ambas a Plant Genetic Systems) especialmente útiles en la transformación de especies monocotiledones como maíz y arroz; y el método mediado por *Agrobacterium* (Vaecck *et al* 1987) que ha sido exitosamente practicado en dicotiledoneas (plantas de hoja grande como soya y jitomates) por muchos años, y recientemente ha sido efectiva en algunas

monocotiledóneas (pastos y otros relacionados) (ver: Patentes norteamericanas Nos. 5,177,010 a University of Toledo; No. 5,104,310 a Texas A&M; Solicitudes de Patente Europea 0131624B1, 120516, 159418B1 y 176,112 a Schilperoot; Patentes Norteamericanas Nos. 5,149,645, 5,469,976, 5,464,763, 4,940,838 y 4,693,976 a Schilperoot; Solicitudes Europeas de Patentes Nos. 116718, 290799, 320500 a Max Planck Institute; Solicitudes de Patente Europeas 0267159 y 0292435 y Patente norteamericana No 5,231,019 a Ciba Geigy, ahora Novartis).

En general, el método de *Agrobacterium* es considerado preferible al de la pistola de genes, debido a la alta frecuencia de inserción del DNA externo en sitio-único, haciéndolo mas fácil de monitorear. Si se utiliza *Agrobacterium* para la transformación de plantas, el DNA a ser insertado en el genoma de la planta debe ser clonado en plásmidos especiales, ya sea en un vector intermediario o en un vector binario. Este método de transformación puede ser utilizado fácilmente por expertos en la técnica para transformar plantas con las construcciones que contengan los genes de las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas de la presente invención, para generar plantas transgénicas que maten o eviten la aparición de Insectos Resistentes Elegibles en el campo.

Los siguientes ejemplos ilustran como la invención fue concebida y llevada a la práctica y muestran como puede ser utilizada. Estos ejemplos no deben ser utilizados para limitarla. La descripción que se proporciona en los siguientes ejemplos se relaciona a métodos de biología molecular preferidos usando estrategias disponibles de protocolos publicados para la construcción de vectores y otras moléculas de ADN. Todas las técnicas de clonación molecular y DNA recombinante necesarias pueden ser llevadas a cabo por métodos estándar (Sambrook *et al.*, 1995).

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Uso del método de la presente invención para obtener ejemplos de construcciones de DNA que codifican para Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas que carecen de la hélice α -1.

Para ilustrar el método de la presente invención, se seleccionaron dos Toxinas Cry de 3-Dominios: Cry1Ab y Cry1Ac. Para cada una de ellas se identificó la región del promotor, la región codificante de la proteína completa y de la hélice α -1 como sigue:

Gene de la toxina	Región del Promotor	Región codificante proteína completa	Región N-terminal y codificante de hélice α -1	Región codificante de la toxina (desde hélice α -2 hasta lamina β -23)
<i>cry1Ab</i>	1- 390 pb	390- 4272 pb	390 – 538 pb	538 – 2225 pb
<i>cry1Ac</i>	11- 401 pb	401- 4251 pb	401 – 549 pb	549 –2236 pb

5 pb, pares de bases

Para excluir la región codificante de la hélice α -1, se amplificaron construcciones genéticas para las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas denominadas Cry1AbMod y Cry1AcMod, como sigue:

10

En estos casos, se llevaron a cabo 3 pasos de PCR como se muestra en la Figura 4. Se utilizó como templado el DNA total de *Bacillus thuringiensis* cepa Bt407 que contiene el plásmido pHT315 Cry1Ab y el de la cepa BtHD73 (las cuales contienen los genes *cry1Ab* y *cry1Ac*, respectivamente; según lo reportado en el Gene Bank, números de acceso X98793 y M11068, respectivamente). Para el PCR1 el oligonucleótido directo, incluyó el sitio de restricción *Hind* III en el extremo 5' (el cual será utilizado para la inserción en un vector adecuado) seguido por los primeros 18 pb de la región del promotor y el oligonucleótido reverso contiene el codón ATG y el sitio de restricción *Nco* I en el extremo 5' (para ser ligado con el fragmento PCR2).

20

Los oligonucleótidos para el PCR2 se diseñaron para incluir un sitio de restricción *Nco* I en extremo 5' del oligonucleótido directo seguido por los primeros 20 pb de la hélice α -2. El oligonucleótido reverso incluyó los últimos 20 pb de la hélice α -23 seguidos por el sitio de restricción *Bam*HI (para ser ligado con el fragmento PCR3).

El oligonucleótido directo para el PCR3 se diseñó para incluir el sitio de restricción *Bam*HI en el extremo 5' seguidos por los primeros 19 pb de el extremo C-terminal de la proteína. El oligonucleótido reverso incluyó los últimos 21 pb de la región terminador y el sitio de restricción *Sma*I en el extremo 5' (para ser usado para la clonación en un vector adecuado).

Los tres fragmentos PCR fueron purificados y ligados independientemente en el vector pBCKS, previamente digerido con las enzimas de restricción correspondientes para cada producto de PCR. Finalmente, cada plásmido pBCKS fue purificado y cortado con las enzimas de restricción correspondientes para liberar los fragmentos PCR (PCR1 *Hind*III-*Nco*I; PCR2 *Nco*I-*Bam*HI y PCR3 *Bam*HI-*Sma*I). Estos fragmentos de PCR fueron purificados y ligados en el vector de doble origen de replicación pHT-315 (Lereclus *et al.*, 1989), previamente digerido con las enzimas de restricción *Hind*III y *Sma*I. Los plásmidos resultantes contenían las versiones modificadas de los genes *cry*1*Ab* y *cry*1*Ac*, que carecen de la región codificante de la hélice α -1. Estos genes fueron denominados *Cry*1*AbMod* y *Cry*1*AcMod*.

EJEMPLO 2. Obtención de vectores y células huésped que contienen construcciones de DNA que codifican para Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas y su uso en métodos recombinantes para producir Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas.

Se obtuvieron vectores que comprenden las construcciones genéticas *Cry*1*AbMod* y *Cry*1*AcMod*, clonando las construcciones genéticas en el vector de doble origen de replicación pHT-315 (Lereclus *et al.*, 1989). Las células huésped genéticamente modificadas que contienen las construcciones se obtuvieron por transformación de la cepa acristalífera Bt407 *cry*⁻ (serotipo H1, Lereclus *et al.*, 1989), con los vectores arriba mencionados.

Para producir las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas y las No-Modificadas (silvestres) de este ejemplo, las cepas transformantes y silvestres fueron cultivadas por 3 días en una incubadora agitada a 29°C y 200 rpm en un medio nutritivo de esporulación (Lereclus *et al.*, 1995) suplementado con 10 μ g de eritromicina por ml. Los cristales de

las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas y No-Modificadas fueron recuperados y purificados por gradientes de sacarosa (Thomas and Ellar, 1983) y solubilizados en 10 mM de buffer carbonatos pH 10.5. Se separaron las muestras de proteína en geles de acrilamida 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Tanto las células genéticamente modificadas como las no modificadas produjeron proteínas de aproximadamente 130 kDa de peso molecular aparente (Fig. 5).

EJEMPLO 3. Formación de oligómeros de las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas usadas como ejemplo (Cry1AbMod y Cry1AcMod).

La formación *in vitro* de oligómeros es facilitada al activar las protoxinas Cry1A con proteasas en la presencia de fragmentos de proteína Bt-R₁ que contienen las regiones de unión a la toxina o bien en presencia de un anticuerpo scFv73 que mimetiza estas regiones de unión a la toxina del receptor CADR (Gómez *et al.*, 2003). La protoxina Cry1Ab produce un oligómero de 250 kDa cuando es incubado con fragmentos de CADR que contienen las repeticiones 7-12, 11-12 ó 12 del CADR (Fig. 6).

Cuando las protoxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod son tratadas con la proteasa tripsina en ausencia de receptor CADR, producen un oligómero de 250 kDa, mientras que bajo estas condiciones las protoxinas silvestres Cry1Ab y Cry1Ac no lo forman produciendo sólo un monómero de 60 kDa, (Fig.7). Estos resultados indican que las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas producen el pre-poro oligomérico de 250 kDa cuando son proteolíticamente activados en ausencia del receptor primario.

EJEMPLO 4. Toxicidad de las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1AbMod y Cry1AcMod en cepas susceptibles y resistentes de *Pectinophora gossypiella* (gusano rosado) y de *Plutella xylostella* (gusano dorso de diamante).

El tipo más común de resistencia a toxinas Bt, llamado "modo 1" esta ligado con mutaciones en el gen CADR en varios insectos lepidópteros (Gahan *et al.*, 2001; Morin *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2005). Sin embargo, en el caso del gusano dorso de diamante la resistencia tipo 1 que presenta este insecto no esta ligada a mutaciones en el gen de caderina (Baxter *et al* 2005) La cepa resistente AZP-R del gusano rosado fue obtenida

por medio de la selección de sobrevivientes a la exposición a la toxina Cry1Ac en 10 campos de algodón (Tabashnik *et al.*, 2000). La selección repetida incrementó la resistencia de la cepa AZP-R a la toxina Cry1Ac hasta 3,100 veces con relación a la cepa susceptible APHIS-S del mismo gusano (Tabashnik *et al.*, 2002a). En la cepa AZP-R del gusano rosado, la resistencia a la toxina Cry1Ac es heredada en forma recesiva y está ligada con 3 alelos mutantes (*r1*, *r2* y *r3*) del gen CADR (BtR) (Morin *et al.*, 2003). Individuos con cualquier combinación de 2 alelos *r* mutantes son resistentes a la toxina Cry1Ac y a plantas de algodón transgénicas que producen esta toxina (Morin *et al.*, 2003). La cepa AZP-R también presenta una resistencia cruzada a la toxina Cry1Ab y una reducción en la unión de la toxina Cry1Ab a la microvellosidad apical de las células del intestino larvario (Tabashnik *et al.*, 2002b, González-Cabrera *et al.*, 2003). El gusano dorso de diamante es la única plaga de insecto que ha desarrollado resistencia a la toxina Cry1Ac aplicada en forma de spray en campo (Tabashnik 2004)

En este experimento, llevamos a cabo bioensayos que confirmaron que las Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas usadas como ejemplo: Cry1Ab y Cry1Ac fueron altamente tóxicas para las larvas susceptibles pero no para las larvas resistentes de los dos insectos analizados, el gusano rosado y el gusano dorso de diamante (Tablas 1 y 2). A una concentración de 100 µg de toxina por ml de dieta, la sobrevivencia del gusano rosado resistente fue alta con las Cry1Ab y Cry1Ac no modificadas (94% y 100% respectivamente). Por el contrario, las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas usadas como ejemplo (Cry1AbMod y Cry1AcMod) mataron tanto a las larvas susceptibles como a las resistentes. A una concentración de 30 µg de toxina por ml de dieta, la sobrevivencia del gusano rosado resistente fue de 0% con ambas Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas, Cry1AbMod y Cry1AcMod (Tabla 2). Estos resultados muestran que las toxinas de 3-Dominios Modificadas de la presente invención suprimen el alto nivel de resistencia a la correspondiente Toxina Cry de 3-Dominios No-Modificada de este ejemplo utilizado los Insectos Resistentes Elegibles, es decir larvas del gusano rosado con resistencia asociada a mutaciones en el receptor primario. La tabla 2 muestra que a semejanza del gusano rosado, la proteína Cry1AcMod mata al gusano dorso de diamante rPxAc resistente, a diferencia de la proteína Cry1Ac que no es toxica para la cepa rPxAc de DBM. El rango de resistencia para esta cepa hacia la toxina Cry1Ac es de más de 30,000 veces ya que la dosis LC₅₀ para la toxina Cry1Ac es de 0.3 ng/pozo para la cepa

DBM susceptible y de >10,000 ng/pozo para la cepa resistente. En el caso de la toxina Cry1AcMod, el rango de resistencia se redujo a 5 veces, ya que la dosis LC₅₀ para Cry1AcMod es 20 ng/pozo para la cepa susceptible y de 100 ng/pozo para la cepa resistente rPxAc de DBM.

5

TABLA 1. Las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod matan al gusano rosado que es resistente a las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac. Nótese que una concentración de 100µg de toxina por ml de dieta, la sobrevivencia del gusano rosado fue alta con las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac (94% y 100%, respectivamente). En cambio, a 30 µg de toxina por ml de dieta, la sobrevivencia del gusano rosado resistente fue de 0% con las toxinas Cry1AbMod y Cry1AcMod. Por lo tanto, las toxinas modificadas Cry1AbMod y Cry1AcMod suprimen la resistencia del gusano rosado a las toxinas no modificadas Cry1Ab y Cry1Ac. A 10µg de toxina por ml de dieta, tanto las toxinas modificadas como no modificadas matan más del 87% de las larvas susceptibles del gusano rosado.

10

15

Toxinas	<u>Concentración.</u> (µg toxina por ml dieta)	<u>Sobrevivencia (%)*</u>	
		Susceptible (APHIS-S)	Resistente (AZP-R)

Toxinas No-Modificadas

20	<u>Cry1Ab</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>90</u>
		<u>10</u>	<u>0</u>	<u>100</u>
		<u>100</u>	<u>ND**</u>	<u>80</u>
	<u>Cry1Ac</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>94</u>
		<u>10</u>	<u>0</u>	<u>98</u>
		<u>100</u>	<u>ND</u>	<u>80</u>

25

Toxinas Modificadas

	<u>Cry1AbMod</u>	<u>1</u>	<u>17</u>	<u>46</u>
		<u>10</u>	<u>1.8</u>	<u>6.5</u>
		<u>30</u>	<u>0</u>	<u>0</u>
30	<u>Cry1AcMod</u>	<u>1</u>	<u>88</u>	<u>88</u>
		<u>10</u>	<u>12</u>	<u>7.5</u>
		<u>30</u>	<u>ND</u>	<u>0</u>

* Los valores de sobrevivencia fueron ajustados con la mortalidad del control en una dieta sin tratamiento. La sobrevivencia ajustada fue calculada dividiendo la sobrevivencia en la dieta con tratamiento entre la sobrevivencia en la dieta sin tratamiento. Tamaño de muestra = 40 a 80 larvas por cepa por tratamiento.

** ND = no determinado

Tabla 2. La proteína Cry1AcMod mata al gusano dorso de diamante resistente a la toxina Cry1Ac. Note que a 20 microgramos (μg) de toxina por ml de dieta, el numero de sobrevivientes de la cepa resistente del gusano dorso de diamante fue muy alto cuando fueron tratados con la toxina Cry1Ac (90.6%). En cambio, a 20 μg de toxina por ml de dieta, la sobrevivencia de la cepa resistente del gusano dorso de diamante fue 0% cuando fue tratado con la toxina Cry1AcMod. Por lo tanto, la toxina modificada Cry1AcMod sobrepasa la resistencia del gusano dorso de diamante a la toxina No-Modificada Cry1Ac. A 20 μg de toxina por ml dieta, Las toxinas Modificadas y No-Modificadas Cry1Ac matan al 100% de los insectos susceptibles del gusano dorso de diamante.

Toxinas	Concentracion. (μg toxina por ml dieta)	Sobrevivencia (%)*	
		Susceptible (PxGen88)	Resistente (rPxAc)
<i>Toxina Cry No-Modificada</i>			
Cry1Ac	0.2	0	97
	2	0	100
	20	0	90.6
<i>Toxina Cry Modificada</i>			
Cry1AcMod	0.2	65.6	90.6
	2	0	53
	20	0	0

*Los valores de sobrevivencia fueron ajustados con la mortalidad del control en una dieta sin tratamiento. La sobrevivencia ajustada fue calculada dividiendo la sobrevivencia en la dieta con tratamiento entre la sobrevivencia en la dieta sin tratamiento. Tamaño de muestra = 32 larvas por cepa por tratamiento.

EJEMPLO 5. El silenciamiento del receptor CADR en larvas de *Manduca sexta* disminuye la susceptibilidad a la toxina Cry1Ab.

5 Para determinar si los resultados con el gusano rosado se extienden a otros insectos lepidópteros, se crearon larvas de *Manduca sexta* con susceptibilidad disminuida a la toxina Cry1Ab, mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi) para bloquear la producción del receptor CADR (Bt-R₁). Con RNAi, el RNA de doble cadena (dsRNA) de un gen particular interfiere con la traducción de dicho gen inhibiendo por lo tanto la
10 producción de la proteína codificada por ese gen (Sijen *et al.*, 2001). Para producir el dsRNA del gen codificante Bt-R₁ de *M. sexta*, se amplificó por rtPCR un fragmento de 442 pb del gen (del residuo 8 al 155) a partir de cDNA producido de muestras de RNAm obtenido de larvas de 5° instar utilizando los siguientes oligonucleótidos como primeros de la reacción de rtPCR GCTCTAGAGCTGCCTTCCTGCTGGTGTTTA y
15 GGAATTCCTCCACGCGCACATTG AACAT. El fragmento de 442 pb fue digerido con las enzimas de restricción *Xba*I y *Eco*RI y clonado en el plásmido pLITMUS 28i (HiScribe™) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, este vector tiene dos promotores T7 que flanquean un sitio de multiclonación. Esto permitió la amplificación de los fragmentos clonados y la transcripción *in vitro* de ambas cadenas de
20 DNA del inserto, generando el dsRNA. La Figura 8 muestra el dsRNA obtenido por transcripción *in vitro* del fragmento del gen *Bt-R₁* amplificado usando la polimerasa T7.

Para probar si la proteína Bt-R₁ se podía silenciar, se inyectaron larvas de primer instar larvario de *M. sexta* en el hemolinfa ya sea con 1µg de dsRNA de Bt-R₁ en 100 nl de
25 agua o con sólo 100 nl de agua (control). Después de 12 horas en dieta artificial sin toxina, la sobrevivencia fue del 74% para 35 larvas inyectadas con el dsRNA de Bt-R₁ y del 75% para 35 larvas control. De las larvas que sobrevivieron por 12 horas con una dieta sin tratamiento, 24 de cada uno de los grupos de larvas inyectadas con dsRNA o control, fueron transferidas a una dieta tratada con 20 ng de la protoxina Cry1Ab por cm².
30 Después de 3 días en la dieta tratada con toxinas, todas las larvas control murieron mientras que todas las larvas inyectadas con el dsRNA de Bt-R₁ sobrevivieron (Tabla 3). Mediante un ensayo de inmunodetección tipo Western blot usando un anticuerpo específico anti-Bt-R₁ se mostró que la inyección del dsRNS redujo significativamente o

eliminó por completo la proteína Bt-R₁ en el intestino medio de las larvas (Figura 9). Los resultados de bioensayo y de inmunodetección de Bt-R₁ indican que el RNAi disminuyó la producción de la proteína Bt-R₁ y la susceptibilidad a la toxina Cry1Ab en las larvas de *Manduca sexta*.

5

TABLA 3. Larvas de *M. sexta* inyectadas con dsRNA de Bt-R₁ no son susceptibles a la toxina Cry1Ab. Larvas de *M. sexta* fueron inyectadas con 100 nl de agua o con 1 µg de dsRNA de Bt-R₁ en 100 nl de agua y expuestas a una dieta artificial conteniendo 20 ng de toxina Cry1Ab por cm².

10

Tratamiento	No. de larvas expuestas a 20 ng Cry1Ab/cm ²	Sobrevivencia (%)
H ₂ O	24	0
dsRNA Bt-R ₁	24	100

15

EJEMPLO 6. Toxicidad de las toxinas Cry1Ab y Cry1AbMod a larvas de *M. sexta* que tienen silenciado el receptor Bt-R₁

20

Para determinar si la toxina Cry1AbMod es tóxica para las larvas con susceptibilidad disminuida a la Toxina Cry1Ab silvestre causada por silenciamiento con RNAi de Bt-R₁, se inyectaron larvas de primer instar de *M. sexta* con un 1 µg de dsRNA de Bt-R₁ como se describió en el Ejemplo 5. Las larvas inyectadas fueron alimentadas ya sea con dietas suplementadas ya sea con 20 ng de protoxina Cry1Ab silvestre o con 5 ng de protoxina Cry1AbMod, por cm². Las larvas silenciadas en el Bt-R₁, por RNAi no fueron susceptibles a la toxina Cry1Ab silvestre pero si a la toxina modificada Cry1AbMod (Fig. 10)

25

Estos resultados muestran que una de las toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas usada como ejemplo, la Cry1AbMod, suprime el efecto de susceptibilidad disminuida causado por el bloqueo de la expresión de Bt-R₁ por RNAi en larvas de *M. sexta*

30

REFERENCIAS.

Todas las referencias son incorporadas por referencia.

- 5 Aronson A. I. and Shai Y. (2001) Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 1-8.
- Baxter, S. W., Zhao, J. -Z., Gahan, L. J., Shelton, A. M., Tabashnik, B. E., Heckel, D. G. 2005. Novel genetic basis of field-evolved resistance to Bt toxins in *Plutella xylostella*. *Insect Mol. Biol.* 14, 327-334
- 10 Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D. J., Li, J. 2005. Crystal Structure of the Mosquito-larvicidal Toxin Cry4Ba and Its Biological Implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363-382
- Boonserm, P., Mo, M., Angsuthanasombat, Ch., Lescar, J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-angstrom resolution. *J. Bacteriol.* 188, 3391-3401.
- 15 Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Zhuang, M., Gill, S. S., Soberón, M. (2004) Oligomerization triggers differential binding of a pore-forming toxin to a different receptor leading to efficient interaction with membrane microdomains. *Biochem. Biophys. Acta.* 1667, 38-46.
- Crickmore N. Zeigler D. R Feitelson J. Schnepf E. Van Rie J. Lereclus D. Baum J. and
20 Dean D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 807-813.
- Crickmore N. Zeigler D.R. Schnepf E. Van Rie J. Lereclus D. Baum J Bravo A. and Dean D.H. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2002) http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html
- 25 Conner A. J. Glare T. R. and Nap J. -P. (2003) The release of genetically Modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk assessment. *The Plant Journal.* 33, 19-46.
- de Maagd R. A. Bravo A. and Crickmore N. (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genet.* 17, 193-199.

- Ferré J. and Van Rie J. (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* 47, 501-533.
- Gahan L. J. Gould F. and Heckel D. G. (2001) Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science.* 293, 857-860.
- 5 Galitsky N. Cody V. Wojtczak A. Debashis G. Luft J. R. Pangborn W. and English L. (2001) Structure of insecticidal bacterial δ -endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta. Cryst. D57*, 1101-1109.
- Gómez I. Oltean D. I. Sanchez J. Gill S. S. Bravo A. and Soberón M. (2001) Mapping the epitope in Cadherin-like receptors involved in *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin
10 interaction using phage display. *J. Biol. Chem.* 276, 28906-28912.
- Gómez I. Sánchez J. Miranda R. Bravo A. and Soberón M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix α -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513, 242-246.
- Gómez I. Dean D. H. Bravo A. and Soberón M. (2003). Molecular basis for *Bacillus*
15 *thuringiensis* Cry1Ab toxin specificity: Two structural determinants in the *Manduca sexta* Bt-R₁ receptor interact with loops α -8 and 2 in domain II of Cy1Ab toxin. *Biochemistry.* 42, 10482-10489.
- González-Cabrera, J. , B. Escribe, B. E. Tabashnik and J. Ferré. 2003. Binding of
20 *Bacillus thuringiensis* toxins in resistant and susceptible strains of pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 929-935.
- Grochulski P. Masson L. Borisova S. Pusztai-Carey M. Schwartz J. L. Brousseau R. and Cygler M. (1995) *Bacillus thuringiensis* Cry1A(a) insecticidal toxin: Crystal structure and channel formation *J. Mol. Biol.* 254, 447-464.
- Gould, F. (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest
25 genetics and ecology. *Ann. Rev. Entomol.* 43, 701-726.
- Helgason E. Okstad O. A. Caugant D. A. Johansen H. A. Fouet A. Mock M. Hegna I and Kolsto A. B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*- one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2627-2630.

- Herrero, S., Gonzalez-Cabrera, J., Ferre, J., Bakker, P. L., de Maagd, R. A. (2004) Mutations in the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca toxin demonstrate the role of domains II and III in specificity towards *Spodoptera exigua* larvae. *Biochem. J.* 384, 507-513.
- James, C. 2005. Global status of biotech/GM Crops in 2005. 2005. ISAAA Briefs No. 5 34. Ithaca, NY, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Janmaat, A. F., and J. H. Myers. (2003) Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage looppers, *Trichoplusia ni*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 270, 2263-2270.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M. J. (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline 10 phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.* 271, 3127-3135.
- Jurat-Fuentes, J.L., Adang, M. J. (2006) Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 92, 166-172
- Knight P. Crickmore N. and Ellar D. J. (1994) The receptor for *Bacillus thuringiensis* 15 CryIA(c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.* 11, 429-436.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- Lereclus D. Arantes O. Chaufaux J. and Lecadet M.-M. (1989) Transformation and 20 expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 211-218
- Lereclus D., Agaisse H., Gominet M., Chafaux J. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant *Biotechnology* 13, 67-71.
- Li J. Carroll J. and Ellar D. J. (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from 25 *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353, 815-821.
- Morin S. Biggs R. W. Shriver L. Eilers-Kirk C. Higginson D. Holley D. Gahan, Heckel D. G. Carriere Y. Dennehy T. J. Brown J. K. and Tabashnik B. E. (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 100, 5004-5009. 30

- Morse R. J. Yamamoto T. and Stroud. R. M. (2001) Structure of Cry2Aa suggests an unexpected receptor binding epitope. *Structure* 9, 409-417.
- Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Darszon, A., de Maagd, R., Bakker, P., Soberón, M., and Bravo, A. (2006) Permeability changes of *Manduca sexta* Midgut Brush Border
5 Membranes Induced by Oligomeric Structures of Different Cry Toxins. *J. Membr. Biol.*
In the press
- Pardo-López, L., Gómez, I., Rausell, C., Sánchez, J., Soberón, M. and Bravo, A. 2006
Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis*
induced by *N*-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 45:
10 10329-10336
- Rausell, C., Muñoz-Garay, C., Miranda-CassoLuengo, R., Gómez, I., Rudiño-Piñera,
E., Soberón, M., Bravo, A. (2004a). Tryptophan spectroscopy studies and black lipid
bilayer analysis indicate that the oligomeric structure of Cry1Ab toxin from *Bacillus*
thuringiensis is the membrane-insertion intermediate. *Biochem.* 43, 166-174.
- 15 Rausell C., García-Robles, I., Sánchez J., Muñoz-Garay C., Martínez-Ramírez, A.C.,
Real, M.D., Bravo A. (2004b) Role of toxin activation on binding and pore formation
activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa*
decehlineata [Say]. *Biochem. Biophys Acta* 1660, 99-105
- Schnepf E. Crickmore N. Van Rie J. Lereclus D. Baum J. R. Feitelson J. Zeigler D. and
20 Dean, D. H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol.*
Mol. Biol. Rev. 62, 705-806.
- Schuler T. H. Poppy G. M. Kerry B. R. and Denholm I. (1998) Insect-resistant transgenic
plants. *Trends Biotechnol.* 16, 168-175.
- Schwartz J. L. Lu Y. J. Sohnlein P. Brousseau R. Laprade R. Masson L. and Adang M. J.
25 (1997) Ion channels formed in planar lipid bilayers by *Bacillus thuringiensis* toxins in the
presence of *Manduca sexta* midgut receptors. *FEBS Lett.* 412, 270-276.
- Sijen T. Fleenor J. Simmer F. Thijssen K. L. Parrish S. Timmons L. Plasterk R. H. and
Fire A. (2001) On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing.
Cell. 107, 465-476.

- Tabashnik B. E. Finson N. Johnson M. W. Heckel D. G. (1994) Cross-Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin CryIF in the Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). Appl Environ Microbiol. 60(12):4627-4629
- 5 Tabashnik B. E. Patin A. L. Dennehy T. J. Liu Y. B. Carriere Y. Sims M. A. and Antilla L. (2000) Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 12980-12984
- Tabashnik, B. E., Y. B. Liu, T. J. Dennehy, M. A. Sims, M. S. Sisterson, R. W. Biggs and Y. Carrière. 2002a. Inheritance of resistance to Bt toxin Cry1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Econ. Entomol.* 95: 1018-1026.
- 10 Tabashnik, B. E., T. J. Dennehy, M. A. Sims, K. Larkin, G. P. Head, W. J. Moar and Y. Carrière. 2002b. Control of resistant pink bollworm by transgenic cotton with *Bacillus thuringiensis* toxin Cry2Ab. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3790-3794.
- Tabashnik, B. E., Carriere, Y., Dennehy, T. J., Morin, S., Sisterson, M. S., Roush, R. T., Shelton, A. M., and Zhao, J-Z (2003) Insect resistance to transgenic Bt Crops: Lessons from the Laboratory and field. *J. Econom. Entomol.* **96**, 1031-1038.
- 15 Tabashnik, B. E., Dennehy, T. J., and Carriere, Y. (2005) Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **102**, 15389-15393.
- Thomas, W. E., and Ellar, D. J. (1983) *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal δ -endotoxin: effect in insect and mammalian cells *in vitro*, *J. Cell Sci.* **60**, 181-197
- 20 Vadlamudi, R. K. ,Weber, E., Ji, I., Ji, T. H. and Bulla, L. A. Jr. (1995) Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* **270**, 5490-5494.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M. and Leemans J. 1987 Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328, 33-37.
- 25 Valaitis A.P. Jenkins J.L. Lee M.K. Dean D.H. and Garner K. J. (2001) Isolation and partial characterization of Gypsy moth BTR-270 an anionic brush border membrane glycoconjugate that binds *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins with high affinity. *Arch. Ins. Biochem. Physiol.* **46**, 186-200.

Xu, X., Yu, L., and Wu, Y. (2005) Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 948-954.

REIVINDICACIONES

Lo que se reclama es:

- 5 1. Un Método para obtener construcciones de DNA que codifiquen Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas que carecen de la hélice α -1, donde las Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas codificadas son capaces de matar a los Insectos Resistentes Elegibles, suprimiendo su resistencia. Este método consiste en los siguientes pasos:
- 10 a) Seleccionar como blanco un gen codificante de una Toxina Cry de 3-Dominios.
- b) Identificar la región del promotor, las regiones modificantes del fragmento de proteína de la respectiva toxina no modificada desde hélice α -2 hasta lamina β -23, la región codificante de la hélice α -1 y la región C-terminal de la protoxina si es que está presente en la Toxina Cry de 3-Dominios seleccionada.
- 15 c) Amplificar la construcción genética excluyendo la región codificante de la hélice α -1.
2. El método de la reivindicación 1, caracterizado por que el paso de amplificación se lleva a cabo por amplificaciones sucesivas que consisten de los siguientes pasos :
- 20 a) Un primer paso de amplificación para amplificar solo la región del promotor.
- b) Uno o más pasos de amplificación para amplificar la región codificante comenzando en la hélice α -2 hasta la lamina β -23, y la región carboxi-terminal de la protoxina, si está presente.
- c) Ligación de los productos de PCR obtenidos en los pasos a) y b).
- 25 3. El método de la reivindicación 1, caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios es seleccionada del grupo que consiste de todas las Toxinas Cry de 3-Dominios de las subfamilias: Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry28, Cry29, Cry30, Cry31, Cry32, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry47, Cry48 y Cry50.
- 30

4. El método de la reivindicación 3 caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios es seleccionada del grupo que consiste de todas las Toxinas Cry de 3-Dominios de la subfamilia Cry1.
5. El método de la reivindicación 4 caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios es seleccionada del grupo que consiste de todas las Toxinas Cry de 3-Dominios de la subfamilia Cry1A.
6. El método de la reivindicación 5 caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios es seleccionada del grupo que consiste de todas las Toxinas Cry de 3-Dominios de la subfamilia Cry1Ab y Cry1Ac.
7. Un fragmento de DNA aislado que comprende una región codificante para una Toxina Cry de 3-Dominios Modificada, caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada codificada carece de la hélice α -1 y consecuentemente es capaz de matar a los Insectos Resistentes Elegibles, suprimiendo su resistencia a Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas.
8. El fragmento de DNA aislado de la reivindicación 7, caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada es seleccionada del grupo que consiste de todas las toxinas Cry de 3 Dominios de las subfamilias Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry28, Cry29, Cry30, Cry31, Cry32, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry47, Cry48 y Cry50, modificadas para carecer de la hélice α -1.
9. El fragmento de DNA aislado de la reivindicación 8 caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada es seleccionada del grupo que consiste de todas las toxinas Cry de 3-Dominios de la subfamilia Cry1, modificadas para carecer de la hélice α -1.
10. El fragmento de DNA aislado de la reivindicación 9 caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada es seleccionada del grupo que consiste de todas las

toxinas Cry de 3-Dominios de la subfamilia Cry1A, modificadas para carecer de la hélice α -1.

- 5 11. El fragmento de DNA aislado de la reivindicación 10 caracterizado por que la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada es seleccionada del grupo que consiste de todas las toxinas Cry de 3-Dominios de las subfamilias Cry1Ab y Cry1Ac, modificadas para carecer de la hélice α -1.
- 10 12. Un vector molecular caracterizado por que comprende el fragmento de DNA aislado, de la reivindicación 7.
- 15 13. El vector molecular de la reivindicación 12, caracterizado por que el vector es un vector con doble origen de replicación que puede replicarse en células de *Bacillus thuringiensis* y de *Escherichia coli*.
14. El vector molecular de la reivindicación 12, caracterizado por que vector es adecuado para la transformación de y expresión en células vegetales.
- 20 15. Una célula huésped modificada genéticamente seleccionada del grupo que consiste de células bacterianas o células vegetales, caracterizado por que dicha célula huésped comprende el fragmento de DNA aislado de la reivindicación 7.
- 25 16. Una Toxina Cry de 3-Dominios Modificada que carece de la hélice α -1, caracterizada por que es capaz de matar Insectos Resistentes Elegibles, suprimiendo su resistencia a Toxinas Cry de 3-Dominios No-Modificadas.
- 30 17. La Toxina Cry de 3-Dominios Modificada de la reivindicación 16, caracterizada por que es seleccionada del grupo que consiste de todas las toxinas Cry de 3 Dominios de las subfamilias Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry7, Cry8, Cry9, Cry10, Cry11, Cry12, Cry13, Cry14, Cry16, Cry17, Cry18, Cry19, Cry20, Cry21, Cry24, Cry25, Cry26, Cry27, Cry28, Cry29, Cry30, Cry31, Cry32, Cry39, Cry40, Cry41, Cry42, Cry43, Cry44, Cry47, Cry48 y Cry50, modificadas para carecer de la hélice α -1.

18. La Toxina Cry de 3-Dominios Modificada de la reivindicación 17, caracterizada por que es seleccionada del grupo que consiste de todas las toxinas Cry de 3 Dominios de la subfamilia Cry1, modificadas para carecer de la hélice α -1.
- 5 19. La Toxina Cry de 3-Dominios Modificada de la reivindicación 18, caracterizada por que es seleccionada del grupo que consiste de todas las toxinas Cry de 3-Dominios de la subfamilia Cry1A, modificadas para carecer de la hélice α -1.
- 10 20. La Toxina Cry de 3-Dominios Modificada de la reivindicación 19, caracterizada por que es seleccionada del grupo que consiste de todas las toxinas Cry de 3-Dominios de las subfamilias Cry1Ab y Cry1Ac, modificadas para carecer de la hélice α -1.
21. Un método para obtener una Toxina Cry de 3-Dominios Modificada que carece de la hélice α -1, caracterizado por que comprende los pasos de:
- 15
- a) cultivar células huésped genéticamente modificadas que comprenden una construcción de DNA que codifica para una Toxina Cry de 3-Dominios Modificada que carece de la hélice α -1, bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada, y
 - 20 opcionalmente
 - b) aislar la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada, y opcionalmente
 - c) purificar la Toxina Cry de 3-Dominios Modificada.
22. Una composición que mata a los Insectos Resistentes Elegibles para suprimir su
- 25 resistencia, caracterizada por que contiene una o más Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas en una cantidad suficiente para controlar las plagas blanco y una mezcla de excipiente agrónomicamente o ecológicamente aceptable.
23. La composición de la reivindicación 22, caracterizada por que Toxina Cry de 3-
- 30 Dominios Modificada está presente en una cantidad de 0.0001% a 95% en peso.
24. Una planta transgénica que comprende el fragmento de DNA de la reivindicación 7.

25. Un método para suprimir la resistencia de los Insectos Resistente Elegibles, caracterizado por que comprende el paso de alimentar dichos Insectos Resistentes Elegibles con dosis letales de Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas,

5 26. El método de la reivindicación 25, caracterizado por que dichas Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas son alimentadas como parte de una composición.

27. El método de la reivindicación 25, caracterizado por que dichas Toxinas Cry de 3-Dominios Modificadas están presentes en una planta transgénica.

Fig. 1

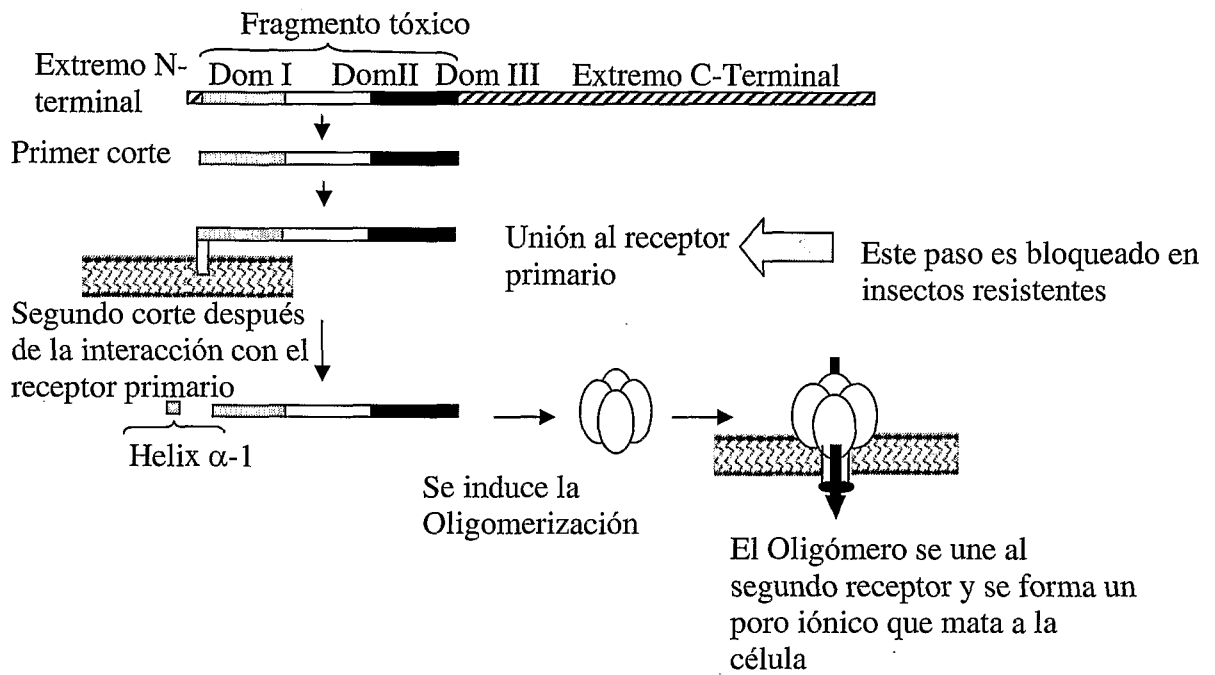


Fig. 2

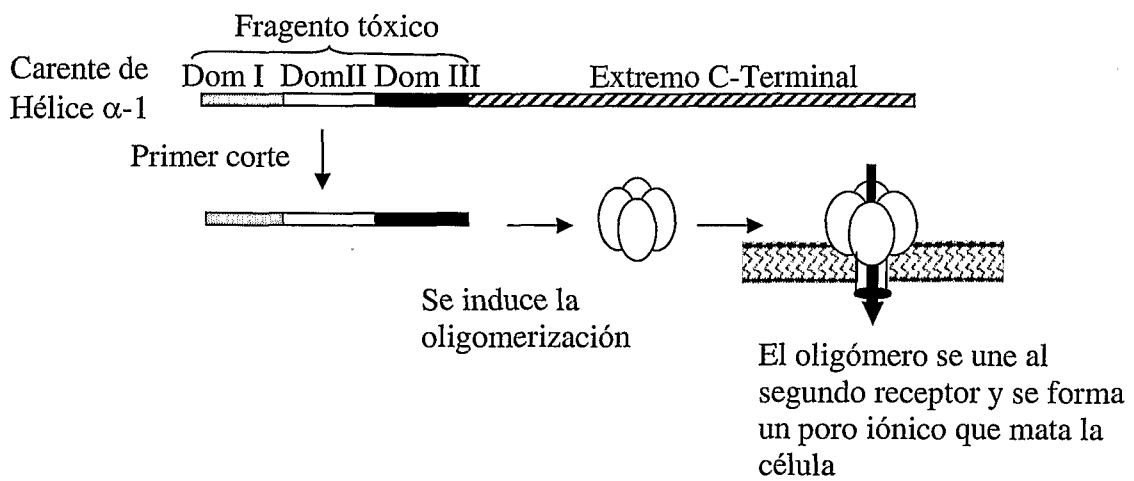


Fig.3

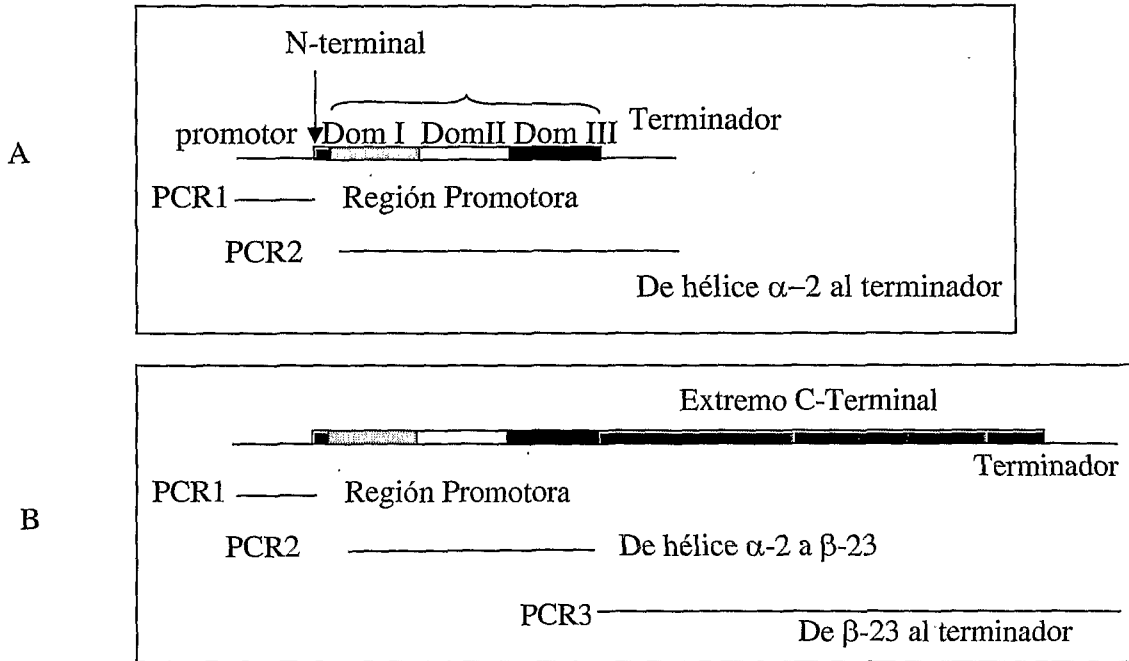


Fig. 4

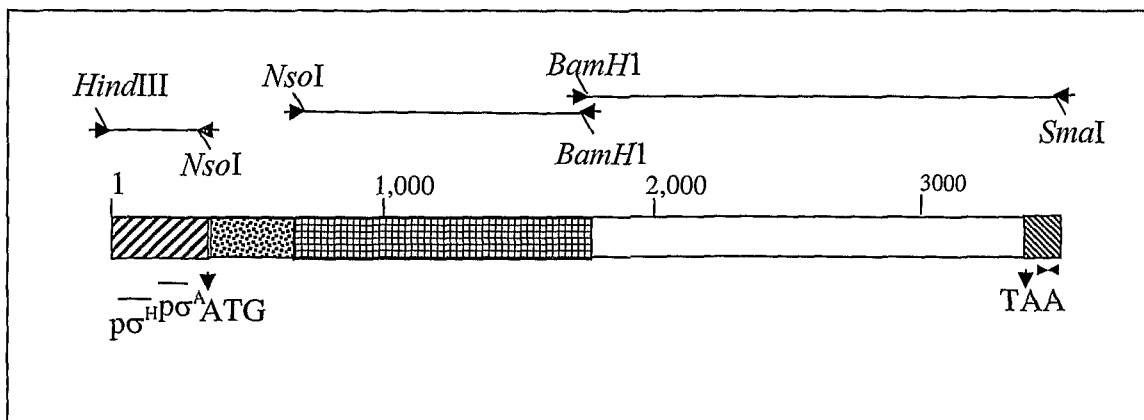
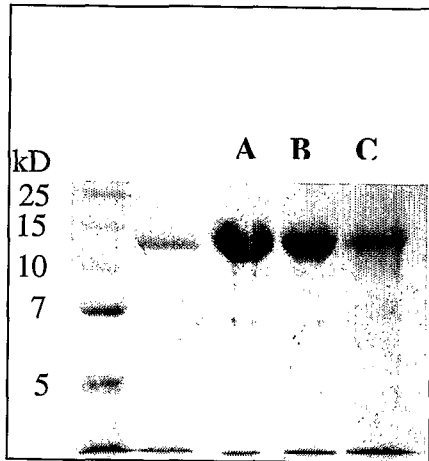
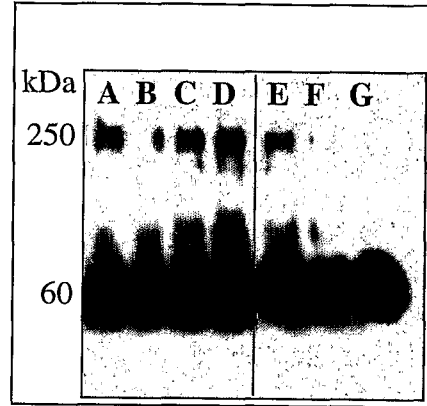


Fig. 5



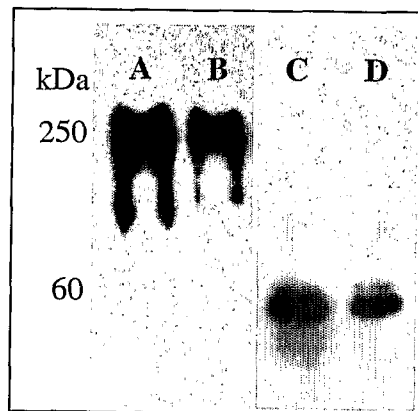
A = Cry1Ac-mod
 B = Cry1Ab-mod
 C = Cry1Ab

Fig.6



A = CADR11-12
 B = CADR 7-11
 C = CADR 7-12
 D = CADR12
 E = scFv73 (1:4)
 F = scFv73 (1:1)
 G = control

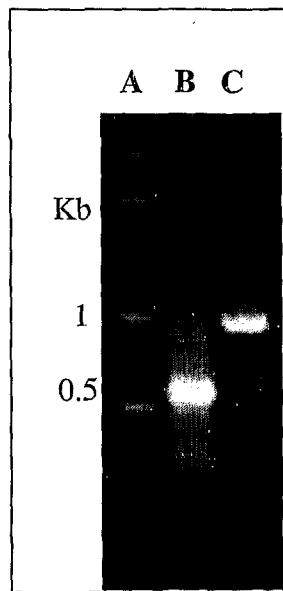
Fig. 7



A = Cry1Ab-mod
 B = Cry1Ac-mod
 C = Cry1Ab
 D = Cry1Ac

4/5

Fig. 8



A = Marcadores
 B = Bt-R1
 C = 28 i Mal

Fig. 9

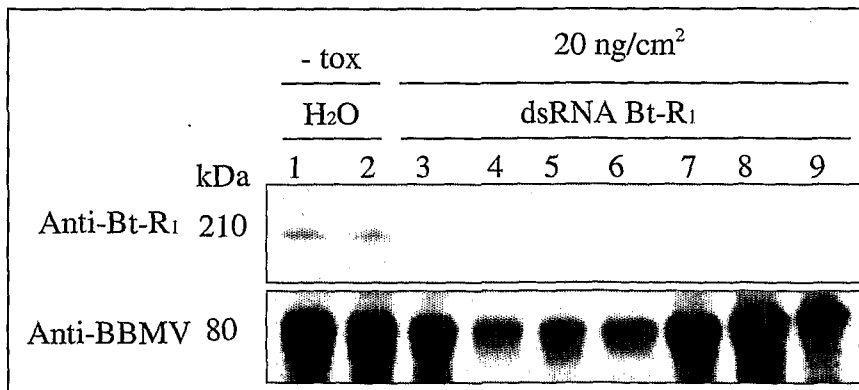


Fig. 10

