



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 213 162**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 15/32**, C07K 14/325  
C12N 15/62, C12Q 1/68  
C12N 15/82, A01N 63/00  
A01H 5/00, C12N 1/21  
G01N 33/00  
// C07K 16/12

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **95935394 .7**

⑧⑥ Fecha de presentación: **27.09.1995**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0792363**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.1997**

⑤④ Título: **Nuevas proteínas y cepas pesticidas.**

③⑩ Prioridad: **28.09.1994 US 314594**  
**05.06.1995 US 463483**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.08.2004**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.08.2004**

⑦③ Titular/es: **Syngenta Participations AG.**  
**Schwarzwaldallee, 215**  
**4058 Basel, CH**

⑦② Inventor/es: **Warren, Gregory, Wayne;**  
**Koziel, Michael, Gene;**  
**Mullins, Martha, Alice;**  
**Nye, Gordon, James;**  
**Carr, Brian;**  
**Desai, Nalini, Manoj;**  
**Kostichka, Kristy;**  
**Duck, Nicholas, Brendan y**  
**Estruch, Juan, Jose**

⑦④ Agente: **Dávila Baz, Ángel**

ES 2 213 162 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevas proteínas y cepas pesticidas.

5 La presente invención se refiere a métodos y a composiciones para controlar plagas de plantas y plagas de otros organismos. Particularmente, se describen nuevas proteínas pesticidas que se pueden aislar a partir de la fase de crecimiento vegetativo de *Bacillus*. Se proporcionan cepas de *Bacillus*, proteínas y genes que codifican las proteínas. Los métodos y composiciones de la invención pueden usarse en una diversidad de sistemas para controlar plagas de plantas y plagas de otros organismos.

10 Las plagas de insectos son un factor importante en la pérdida de cultivos agrícolas importantes desde el punto de vista comercial en todo el mundo. Se han usado ampliamente pesticidas químicos de amplio espectro para controlar o erradicar plagas de importancia agrícola. Sin embargo, existe un interés substancial en el desarrollo de pesticidas alternativos eficaces.

15 Los pesticidas microbianos han jugado un papel importante como alternativas al control químico de las plagas. El producto microbiano usado más ampliamente se basa en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Bt es un *Bacillus* formador de esporas gram positivo que produce una proteína cristalina insecticida (ICP) durante la esporulación.

20 Se conocen numerosas variedades de Bt que producen más de 25 ICP diferentes pero relacionadas. La mayoría de las ICP fabricadas por Bt son tóxicas para las larvas de ciertos insectos de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera*. En general, cuando una ICP se ingiere por un insecto susceptible, el cristal se solubiliza y se transforma en un resto tóxico por las proteasas intestinales del insecto. Ninguna de las ICP activas contra larvas de coleópteros tales como el escarabajo de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) o el gorgojo amarillo de la harina (*Tenebrio molitor*) ha mostrado efectos significativos sobre miembros del género *Diabrotica*, particularmente *Diabrotica virgifera virgifera*, el gusano de las raíces del maíz del oeste (WCRW) o *Diabrotica longicornis barberi*, el gusano de las raíces del maíz del norte.

30 *Bacillus cereus* (Bc) está muy relacionado con Bt. Una característica importante que los diferencia es la ausencia de cristales de parasporas en Bc. Bc es un bacteria ampliamente distribuida que se encuentra comúnmente en el suelo y se ha aislado a partir de una diversidad de alimentos y fármacos. El organismo se ha implicado en el deterioro de los alimentos.

35 Aunque Bt ha sido muy útil para controlar plagas de insectos, existe la necesidad de ampliar el número de agentes que puedan ejercer un control biológico.

Dentro de la presente invención se proporcionan composiciones y métodos para controlar plagas de plantas. En particular, se proporcionan nuevas proteínas pesticidas que se producen durante el crecimiento vegetativo de cepas de *Bacillus*. Las proteínas son útiles como agentes pesticidas.

40 Más específicamente, la presente invención se refiere a una cepa de *Bacillus* substancialmente purificada que produce una proteína pesticida durante el crecimiento vegetativo, donde dicho *Bacillus* no es *B. sphaericus* SSII-1. Se prefieren las cepas de *Bacillus thuringiensis* que tienen los números de acceso NRRL B-21225 y NRRL B-21439.

45 La invención también se refiere a una proteína específica de insectos que se puede aislar durante la fase de crecimiento vegetativo de *Bacillus* spp, pero preferiblemente una cepa de *Bacillus thuringiensis* y *B. cereus*, y a componentes de la misma, donde dicha proteína no es la toxina mosquitocida de *B. sphaericus* SSII-1. La proteína específica de insectos de la invención preferiblemente es tóxica para insectos coleópteros o lepidópteros y tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa o mayor, preferiblemente de aproximadamente 60 a aproximadamente 100 kDa, y más preferiblemente de aproximadamente 80 kDa.

55 Más particularmente, la proteína específica de insectos de la invención tiene un espectro de actividad insecticida que incluye una actividad contra especies de *Agrotis* y/o *Spodoptera*, pero preferiblemente actividad contra el gusano cortador negro [*Agrotis ipsilon*; BCW] y/o la palomilla del maíz [*Spodoptera frugiperda*] y/o el gusano soldado de la remolacha [*Spodoptera exigua*] y/o el gusano de los brotes del tabaco y/o el gusano del fruto [*Helicoverpa zea*].

La proteína específica de insectos de la invención puede aislarse preferiblemente a partir de una cepa de *Bacillus* spp seleccionada entre los números de acceso NRRL B-21225 y NRRL B-21439.

60 Se prefiere una proteína específica de insectos que tenga una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por la SEC ID N°: 2 y la SEC ID N°: 5, incluyendo cualquier proteína que sea estructural y/o funcionalmente homóloga a la misma.

65 Otra realización preferida de la invención comprende una proteína específica de insectos de la invención donde se han retirado o inactivado las secuencias que representan la señal de secreción.

La presente invención también se refiere a proteínas pesticidas multiméricas, que comprenden más de una cadena polipeptídica y donde al menos una de dichas cadenas polipeptídicas representa una proteína específica de insectos

## ES 2 213 162 T3

de la invención y al menos otra de dichas cadenas polipeptídicas representa una proteína auxiliar de la invención, que activa o potencia la actividad pesticida de dicha proteína específica de insectos.

5 Las proteínas pesticidas multiméricas de acuerdo con la invención preferiblemente tienen un peso molecular de aproximadamente 50 kDa a aproximadamente 200 kDa.

10 La presente invención también se refiere a proteínas de fusión que comprenden varios dominios de proteína que incluyen al menos una proteína específica de insectos de la invención que, cuando se traduce por los ribosomas, produce una proteína de fusión con al menos los atributos combinados de la proteína específica de insectos de la invención y, opcionalmente, de los otros componentes usados en la fusión.

15 Como se usa en la presente solicitud, una homología de secuencias substancial significa una relación estructural estrecha entre secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, las proteínas substancialmente homólogas pueden tener una homología del 40%, preferiblemente del 50% y más preferiblemente del 60% o del 80% o mayor. La homología también incluye una relación en la que están ausentes una o varias subsecuencias de aminoácidos, o están intercaladas subsecuencias con aminoácidos adicionales.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos que se puede aislar durante la fase de crecimiento vegetativo de *Bacillus* spp. y a componentes de la misma, donde dicha proteína no es la toxina mosquitocida de *B. sphaericus* SSII-1. En particular, la presente invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos, donde el espectro de actividad insecticida incluye una actividad contra especies de *Agrotis* y/o *Spodoptera*, pero preferiblemente una actividad contra el gusano cortador negro [*Agrotis ipsilon*; BCW] y/o la palomilla del maíz [*Spodoptera frugiperda*] y/o el gusano soldado de la remolacha [*Spodoptera exigua*] y/o el gusano de los brotes del tabaco y/o el gusano del fruto [*Helicoverpa zea*].

30 Se prefiere una molécula de ADN, donde dicha molécula comprende una secuencia de nucleótidos como la proporcionada en la SEC ID N°:1 o en la SEC ID N°:4, incluyendo cualquier molécula de ADN que sea estructural y/o funcionalmente homóloga a la misma.

35 Otra realización de la invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos que se puede aislar durante la fase de crecimiento vegetativo de *Bacillus* spp., y a componentes de la misma, donde dicha proteína no es la toxina mosquitocida de *B. sphaericus* SSII-1, habiéndose optimizado dicha secuencia de nucleótidos para la expresión en un microorganismo o una planta.

40 Se prefiere una molécula de ADN, donde dicha molécula comprende una secuencia de nucleótidos como la proporcionada en la SEC ID N°:30, incluyendo cualquier molécula de ADN que sea estructural y/o funcionalmente homóloga a la misma.

45 La invención también se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida multimérica, que comprende más de una cadena polipeptídica y donde al menos una de dichas cadenas polipeptídicas representa una proteína específica de insectos de la invención y al menos otra de dichas cadenas polipeptídicas representa una proteína auxiliar de acuerdo con la invención, que activa o potencia la actividad pesticida de dicha proteína específica de insectos.

50 Otra realización de la invención se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende varios dominios proteicos incluyendo al menos una proteína específica de insectos de la invención producida por fusiones genéticas en fase que, cuando se traduce por los ribosomas, produce una proteína de fusión con al menos los atributos combinados de la proteína específica de insectos de la invención y, opcionalmente, de los otros componentes usados en la fusión.

55 La invención también se refiere a una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión que comprende una proteína específica de insectos de la invención fusionada con una secuencia de señal, preferiblemente una secuencia en señal de secreción o una secuencia de dirección que dirige el producto del transgen a un orgánulo o a un compartimento celular específico, siendo dicha secuencia señal de origen heterólogo con respecto al ADN receptor.

60 La presente invención también incluye una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de acuerdo con la invención que se ha optimizado para la expresión en un microorganismo o planta.

65 La invención también se refiere a una molécula de ADN optimizada, donde las secuencias que codifican la señal de secreción se han retirado de su extremo 5'. Como se usa en la presente solicitud, una homología de secuencia substancial significa una relación estructural estrecha entre secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, las moléculas de ADN substancialmente homólogas pueden tener una homología del 60%, preferiblemente del 80% y más preferiblemente del 90 ó 95%, o mayor. La homología también incluye una relación donde están ausentes una o varias subsecuencias de nucleótidos o aminoácidos, o están intercaladas subsecuencias con nucleótidos o aminoácidos adicionales.

## ES 2 213 162 T3

La presente invención también comprende moléculas de ADN que hibridan con una molécula de ADN de acuerdo con la invención como se ha definido anteriormente en este documento, pero preferiblemente con una sonda oligonucleotídica que se puede obtener a partir de dicha molécula de ADN que comprende una porción contigua de la secuencia codificante para dicha proteína específica de insectos de al menos 10 nucleótidos de longitud, en condiciones moderadamente rigurosas y teniendo dichas moléculas una actividad específica de insectos y codificándose también las proteínas específicas de insectos por dichas moléculas de ADN.

Se prefieren moléculas de ADN en las que la hibridación se produce a 65°C en un tampón que comprende SDS al 7% y fosfato sódico 0,5 M.

Se prefiere especialmente una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención que se puede obtener por un proceso que comprende:

- (a) obtener una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos;
- (b) hibridar dicha molécula de ADN con una sonda oligonucleotídica de acuerdo con la reivindicación 107 obtenida a partir de una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos como la proporcionada en la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, o SEC ID N°: 4; y
- (c) aislar dicho ADN hibridado.

La invención también se refiere a una proteína específica de insectos, donde dicha proteína se codifica por una molécula de ADN de acuerdo con la invención.

La invención también incluye un cassette de expresión que comprende una molécula de ADN de acuerdo con la invención, unida operativamente a secuencias de expresión que incluyen las señales reguladoras de la transcripción y la traducción necesarias para la expresión de las construcciones de ADN asociadas en un organismo hospedador, preferiblemente un microorganismo o una planta, y opcionalmente secuencias reguladoras adicionales.

La invención también se refiere a una molécula de vector que comprende un cassette de expresión de acuerdo con la invención.

El cassette de expresión y/o la molécula de vector de acuerdo con la invención preferiblemente forman parte del genoma de la planta.

Otra realización de la invención se refiere a un organismo hospedador, preferiblemente un organismo hospedador seleccionado entre el grupo compuesto por células vegetales y de insectos, bacterias, levaduras, baculovirus, protozoos, nematodos y algas, que comprende una molécula de ADN de acuerdo con la invención, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN o una molécula de vector que comprende dicho cassette de expresión, preferiblemente incorporados de forma estable en el genoma del organismo hospedador.

La invención también se refiere a una planta transgénica, pero preferiblemente una planta de maíz, incluyendo partes así como la progenie y las semillas de la misma, que comprende una molécula de ADN de acuerdo con la invención, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN o una molécula de vector que comprende dicho cassette de expresión, preferiblemente incorporado de forma estable en el genoma de la planta.

Se prefiere una planta transgénica, incluyendo partes así como la progenie y las semillas de la misma, que se ha transformado de forma estable con una molécula de ADN de acuerdo con la invención, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN o una molécula de vector que comprende dicho cassette de expresión.

También se prefiere una planta transgénica, incluyendo partes así como la progenie y las semillas de la misma, que expresa una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención.

La invención también se refiere a una planta transgénica, preferiblemente una planta de maíz, de acuerdo con la invención como se ha definido anteriormente en este documento, que expresa además un segundo principio de control de insectos distinto, pero preferiblemente una  $\delta$ -endotoxina de *Bt*. Dicha planta preferiblemente es una planta híbrida.

Se entenderá que las partes de plantas transgénicas dentro del alcance de la invención comprenden, por ejemplo, células vegetales, protoplastos, tejidos, callos, embriones así como flores, tallos, frutos, hojas, raíces procedentes de plantas transgénicas o su progenie, previamente transformadas con una molécula de ADN de acuerdo con la invención y que constan, por lo tanto, al menos en parte de células transgénicas.

La invención también se refiere a un material de propagación de plantas procedente de una planta de acuerdo con la invención, que se trata con un recubrimiento protector de semillas.

La invención también incluye un microorganismo transformado con una molécula de ADN de acuerdo con la invención, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN o una molécula de vector que comprende

## ES 2 213 162 T3

dicho cassette de expresión, donde dicho microorganismo preferiblemente es un microorganismo que se multiplica en plantas y más preferiblemente una bacteria que coloniza las raíces.

5 Otra realización de la invención se refiere a una proteína específica de insectos encapsulada que comprende un microorganismo que comprende una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención.

10 La invención también se refiere a una composición entomocida que comprende un organismo hospedador de la invención, pero preferiblemente una cepa de *Bacillus* purificada, en una cantidad insecticidamente eficaz junto con un vehículo adecuado.

15 La invención también comprende una composición entomocida que comprende una molécula de proteína aislada de acuerdo con la invención, sola o en combinación con un organismo hospedador de la invención y/o una proteína específica de insectos encapsulada de acuerdo con la invención, en una cantidad insecticidamente eficaz, junto con un vehículo adecuado.

20 Otra realización de la invención se refiere a un método para obtener una proteína específica de insectos purificada de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método aplicar una solución que comprende dicha proteína específica de insectos en una columna de NAD y eluir la proteína unida.

También se incluye un método para identificar la actividad contra insectos de una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método:

- 25 desarrollar una cepa de *Bacillus* en un cultivo;
- obtener el sobrenadante a partir de dicho cultivo;
- dejar que las larvas de insectos se alimenten de una dieta con dicho sobrenadante; y
- 30 determinar la mortalidad.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para aislar una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método:

- 35 desarrollar una cepa de *Bacillus* en un cultivo;
- obtener sobrenadante a partir de dicho cultivo; y
- aislar dicha proteína específica de insectos a partir de dicho sobrenadante.

40 La invención también incluye un método para aislar una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos que presenta la actividad insecticida de las proteínas de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método:

- 45 obtener una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos;
- hibridar dicha molécula de ADN con ADN obtenido a partir de una especie de *Bacillus*; y aislar dicho ADN hibridado.

50 La invención también se refiere a un método para aumentar la gama de insectos diana por medio del uso de una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención en combinación con al menos una segunda proteína insecticida que es diferente de la proteína específica de insectos de acuerdo con la invención, pero preferiblemente con una proteína insecticida seleccionada entre el grupo compuesto por  $\delta$ -endotoxinas de *Bt*, inhibidores de proteasa, lectinas,  $\alpha$ -amilasas y peroxidasas.

55 Se prefiere un método para aumentar la gama de insectos diana dentro de una planta por medio de la expresión dentro de dicha planta de una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención en combinación con al menos una segunda proteína insecticida que es diferente de la proteína específica de insectos de acuerdo con la invención, pero preferiblemente con una proteína insecticida seleccionada entre el grupo compuesto por  $\delta$ -endotoxinas de *Bt*, inhibidores de proteasa, lectinas,  $\alpha$ -amilasas y peroxidasas.

60 También se incluye un método para proteger a las plantas contra las lesiones producidas por una plaga de insectos, pero preferiblemente por especies de *Spodoptera* y/o *Agrotis*, y más preferiblemente por una plaga de insectos seleccionada entre el grupo compuesto por el gusano cortador negro [*Agrotis ipsilon*; BCW], la palomilla del maíz [*Spodoptera frugiperda*], el gusano soldado de la remolacha [*Spodoptera exigua*], el gusano de los brotes del tabaco y el gusano del fruto [*Helicoverpa zea*], que comprende aplicar a la planta o al área de crecimiento de dicha planta una composición entomocida o una proteína de toxina de acuerdo con la invención.

## ES 2 213 162 T3

La invención también se refiere a un método para proteger a las plantas contra las lesiones producidas por una plaga de insectos, pero preferiblemente por especies de *Spodoptera* y/o *Agrotis*, y más preferiblemente por una plaga de insectos seleccionada entre el grupo compuesto por el gusano cortador negro [*Agrotis ipsilon*; BCW], la palomilla del maíz [*Spodoptera frugiperda*], el gusano soldado de la remolacha [*Spodoptera exigua*], el gusano de los brotes del tabaco y el gusano del fruto [*Helicoverpa zea*], que comprende plantar una planta transgénica que expresa una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención dentro de un área donde puede existir dicha plaga de insectos.

La invención también incluye un método para producir un organismo hospedador que comprende, integrada de forma estable en su genoma, una molécula de ADN de acuerdo con la invención que preferiblemente expresa una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención, que comprende transformar dicho organismo hospedador con una molécula de ADN de acuerdo con la invención, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN o una molécula de vector que comprende dicho cassette de expresión.

Otra realización de la invención se refiere a un método para producir una planta transgénica o una célula vegetal que comprende, integrada de forma estable en el genoma de la planta, una molécula de ADN de acuerdo con la invención que preferiblemente expresa una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención, que comprende transformar dicha planta y célula vegetal, respectivamente, con una molécula de ADN de acuerdo con la invención, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN o una molécula de vector que comprende dicho cassette de expresión.

La invención también se refiere a un método para producir una composición entomocida que comprende mezclar una cepa de *Bacillus* aislada y/o un organismo hospedador y/o una molécula de proteína aislada y/o una proteína encapsulada de acuerdo con la invención, en una cantidad insecticidamente eficaz con un vehículo adecuado.

La invención también incluye un método para producir la progenie transgénica de una planta parental transgénica que comprende, incorporada de forma estable en el genoma de la planta, una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos de acuerdo con la invención, que comprende transformar dicha planta parental con una molécula de ADN de acuerdo con la invención, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN o una molécula de vector que comprende dicho cassette de expresión y transferir el rasgo pesticida a la progenie de dicha planta parental transgénica por medio de técnicas de cultivo de plantas conocidas.

La invención también incluye una sonda oligonucleotídica capaz de hibridar específicamente con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína específica de insectos que se puede aislar durante la fase de crecimiento vegetativo de *Bacillus* spp. y componentes de la misma, donde dicha proteína no es la toxina mosquitocida de *B. sphaericus* SSII-1, donde dicha sonda comprende una porción contigua de la secuencia codificante para dicha proteína específica de insectos de al menos 10 nucleótidos de longitud y el uso de dicha sonda oligonucleotídica para seleccionar cualquier cepa de *Bacillus* u otros organismos para determinar si la proteína específica de insectos está presente naturalmente o si un organismo transformado particular incluye dicho gen.

La presente invención reconoce que se producen proteínas pesticidas durante el crecimiento vegetativo de cepas de *Bacillus*, denominadas más adelante VIP.

Las presentes VIP no son abundantes después de la esporulación y se expresan particularmente durante el crecimiento en fase logarítmica antes de la fase estacionaria. Para los fines de la presente invención, el crecimiento vegetativo se define como el periodo de tiempo transcurrido antes del inicio de la esporulación. Los genes que codifican tales VIP pueden aislarse, clonarse y utilizarse para transformar diversos vehículos de liberación para uso en programas de tratamiento de plagas.

Para los fines de la presente invención, las plagas incluyen, pero sin limitación, insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros, garrapatas, protozoos patógenos, trematodos hepáticos que parasitan animales, y similares. Las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados entre los órdenes Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc., particularmente Coleoptera y Lepidoptera.

Las tablas 1-10 proporcionan una lista de plagas asociadas con plantas de cultivo importantes y plagas de importancia en seres humanos y animales. Tales plagas se incluyen dentro del alcance la presente invención.

# ES 2 213 162 T3

TABLA 1

*Lepidópteros (mariposas y polillas)*

5	Maíz
	<i>Ostrinia nubilalis</i> , perforador europeo del maíz
	<i>Agrotis ipsilon</i> , gusano cortador negro
	<i>Helicoverpa zea</i> , gusano del fruto
10	<i>Spodoptera frugiperda</i> , palomilla del maíz
	<i>Diatraea grandiosella</i> , barrenador del maíz del suroeste
	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , gusano saltarín
	<i>Diatraea saccharalis</i> , barrenador del tallo
15	Sorgo
	<i>Chilo partellus</i> , barrenador manchado del tallo
	<i>Spodoptera frugiperda</i> , palomilla del maíz
	<i>Helicoverpa zea</i> , gusano del fruto
20	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , gusano saltarín
	<i>Feltia subterranea</i> , cortador pequeño
25	Trigo
	<i>Pseudaletia unipunctata</i> , gusano soldado
	<i>Spodoptera frugiperda</i> , palomilla del maíz
	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , gusano saltarín
	<i>Agrotis orthogonia</i> , gusano cortador pálido del oeste
30	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , gusano saltarín
35	Girasol
	<i>Suleima helianthana</i> , polilla de los brotes del girasol
	<i>Homoesosoma electellum</i> , polilla del girasol
40	Algodón
	<i>Heliothis virescens</i> , bellotero
	<i>Helicoverpa zea</i> , mazorquero
	<i>Spodoptera exigua</i> , gusano soldado de la remolacha
	<i>Pectinophora gossypiella</i> , gusano rosado de la india
45	Arroz
	<i>Diatraea saccharalis</i> , barrenador del tallo
	<i>Spodoptera frugiperda</i> , palomilla del maíz
	<i>Helicoverpa zea</i> , mazorquero
50	Soja
	<i>Pseudoplusia includens</i> , falso mediador
	<i>Anticarsia gemmatalis</i> , oruga de las leguminosas
	<i>Plathypena scabra</i> , gusano verde del trébol
55	<i>Ostrinia nubilalis</i> , perforador europeo del maíz
	<i>Agrotis ipsilon</i> , gusano cortador negro
	Lepidópteros (Gusano soldado de la remolacha)
60	Soja
	<i>Spodoptera exigua</i> , gusano soldado de la remolacha
	<i>Heliothis virescens</i> , bellotero
	<i>Helicoverpa zea</i> , mazorquero
65	Cebada
	<i>Ostrinia nubilalis</i> , perforador europeo del maíz
	<i>Agrotis ipsilon</i> , gusano cortador negro

## ES 2 213 162 T3

TABLA 2

*Coleópteros (escarabajos)*

5	Maíz
	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> , gusano de las raíces del maíz del oeste
	<i>Diabrotica longicornis barberi</i> , gusano de las raíces del maíz del norte
	<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> , gusano de las raíces del maíz del sur
10	<i>Melanotus spp.</i> , gusano alambre
	<i>Cyclocephala borealis</i> , cascarudo enmascarado del norte (gusano blanco)
	<i>Cyclocephala immaculata</i> , cascarudo enmascarado del sur (gusano blanco)
	<i>Popillia japonica</i> , escarabajo japonés
15	<i>Chaetocnema pulicaria</i> , escarabajo pulga del maíz
	<i>Sphenophorus maidis</i> , picudo del maíz
	Sorgo
20	<i>Phyllophaga crinita</i> , escarabajo de mayo (gallina ciega)
	<i>Eleodes</i> , <i>Conoderus</i> , and <i>Aeolus spp.</i> , gusanos alambre
	<i>Oulema melanopus</i> , escarabajo de la hoja de cereales
	<i>Chaetocnema pulicaria</i> , escarabajo pulga del maíz
25	<i>Sphenophorus maidis</i> , picudo del maíz
	Trigo
	<i>Oulema melanopus</i> , escarabajo de la hoja de cereales
	<i>Hypera punctata</i> , picudo de la hoja del trébol
30	<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> , gusano de las raíces del maíz del sur
	Girasol
35	<i>Zygogramma exclamationis</i> , escarabajo del girasol
	<i>Bothyrus gibbosus</i> , escarabajo de la zanahoria
	Algodón
40	<i>Anthonomus grandis</i> , picudo del algodnero
	Arroz
	<i>Colaspis brunnea</i> , colaspis de la uva
	<i>Lissorhoptus oryzophilus</i> , picudo acuático del arroz
45	<i>Sitophilus oryzae</i> , picudo del arroz
	Soja
50	<i>Epilachna varivestis</i> , conchuela del fríjol

TABLA 3

*Homópteros (moscas blancas, áfidos, etc.)*

55	Maíz
	<i>Rhopalosiphum maidis</i> , pulgón del cogollo
	<i>Anuraphis maidiradicis</i> , pulgón radicular del maíz
60	Sorgo
	<i>Rhopalosiphum maidis</i> , pulgón del cogollo
	<i>Sipha flava</i> , pulgón amarillo de la caña de azúcar
65	Trigo
	Pulgón del trigo ruso
	<i>Schizaphis graminum</i> , pulgón verde
	<i>Macrosiphum avenae</i> , pulgón de la espiga



## ES 2 213 162 T3

5	Algodón <i>Aphis gossypii</i> , pulgón del algodouero <i>Pseudatomoscelis seriatus</i> , pulga saltona del algodouero <i>Trialeurodes abutilonea</i> , mosca blanca bandeada
10	Arroz <i>Nephotettix nigropictus</i> , pulga de la hoja del arroz
15	Soja <i>Myzus persicae</i> , pulgón verde del durazduero <i>Empoasca fabae</i> , cotorrita
20	Cebada <i>Schizaphis graminum</i> , pulgón verde de los cereales
25	Colza <i>Brevicoryne brassicae</i> , pulgón de la col
TABLA 4 <i>Hemípteros (chinchas)</i>	
30	Maíz <i>Blissus leucopterus leucopterus</i> , chinche de la raíz del arroz
35	Sorgo <i>Blissus leucopterus leucopterus</i> , chinche de la raíz del sorgo
40	Algodón <i>Lygus lineolaris</i> , chinche lygus
45	Arroz <i>Blissus leucopterus leucopterus</i> , chinche de la raíz del arroz <i>Acrosternum hilare</i> , chinche verde hedionda
50	Soja <i>Acrosternum hilare</i> , chinche verde hedionda
55	Cebada <i>Blissus leucopterus leucopterus</i> , chinche de la raíz de la cebada <i>Acrosternum hilare</i> , chinche verde hedionda <i>Euschistus servus</i> , chinche hedionda marrón
TABLA 5 <i>Ortópteros (saltamontes, grillos y cucarachas)</i>	
60	Maíz <i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes de patas rojas <i>Melanoplus sanguinipes</i> , saltamontes migratorio
65	Trigo <i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes de patas rojas <i>Melanoplus differentialis</i> , saltamontes diferencial <i>Melanoplus sanguinipes</i> , saltamontes migratorio
70	Algodón <i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes de patas rojas <i>Melanoplus differentialis</i> , saltamontes diferencial

## ES 2 213 162 T3

Soja

*Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas

*Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial

5

Estructural/Doméstico

*Periplaneta americana*, cucaracha americana

*Blattella germanica*, cucaracha alemana

*Blatta orientalis*, cucaracha oriental

10

### TABLA 6

*Dípteros (moscas y mosquitos)*

15

Maíz

*Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz

*Agromyza parvicornis*, minadora del maíz

20

Sorgo

*Contarinia sorghicola*, mosca del sorgo

25

Trigo

*Mayetiola destructor*, mosca de Hess

*Sitodiplosis mosellana*, mosquito rojo del trigo

*Meromyza americana*, gusano del tallo del trigo

*Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo

30

Girasol

*Neolasioptera murfeldiana*, mosquito de la semilla del girasol

35

Soja

*Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz

40

Cebada

*Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz

*Mayetiola destructor*, mosca de Hess

45

Insectos que atacan a los seres humanos y a animales y que transmiten enfermedades

*Aedes aegypti*, mosquito de la fiebre amarilla

*Aedes albopictus*, mosquito diurno de la selva

*Phlebotomus papatasi*, mosca de arena

*Musca domestica*, mosca doméstica

*Tabanus atratus*, mosca doméstica negra

50

*Cochliomyia hominivorax*, gusano barrenador del ganado

### TABLA 7

*Tisanópteros (trips)*

55

Maíz

*Anaphothrips obscurus*, trips del maíz

60

Trigo

*Frankliniella fusca*, trips del tabaco

65

Algodón

*Thrips tabaci*, trips de la cebolla

*Frankliniella fusca*, trips del tabaco

## ES 2 213 162 T3

Soja  
*Sericothrips variabilis*, trips de la soja  
*Thrips tabaci*, trips de la cebolla

5

### TABLA 8

*Himenópteros (moscas serrucho, hormigas y avispas)*

10

Maíz  
*Solenopsis milesta*, hormiga ladrona

Trigo  
*Cephus cinctus*, mosca sierra del tallo del trigo

15

### TABLA 9

*Otros órdenes y especies representativas*

20

*Dermápteros (tijeretas)*  
*Forficula auricularia*, tijereta europea

25

*Isópteros (termitas)*  
*Reticulitermes flavipes*, termita subterránea oriental

30

*Malófagos (piojos mordedores)*  
*Cuclotogaster heterographa*, piojo de la cabeza  
*Bovicola bovis*, piojo de la vaca

35

*Anopluros (piojos chupadores)*  
*Sinonáfteros (Pulgas)*  
*Pediculus humanus*, piojos del cuerpo  
*Ctenocephalides felis*, pulga del gato

### TABLA 10

40

*Ácaros (ácaros y garrapatas)*

Maíz  
*Tetranychus urticae*, arañita bimaculada

45

Sorgo  
*Tetranychus cinnabarinus*, araña roja  
*Tetranychus urticae*, arañita bimaculada

50

Trigo  
*Aceria tulipae*, acaro eriófido

55

Algodón  
*Tetranychus cinnabarinus*, araña roja  
*Tetranychus urticae*, arañita bimaculada

60

Soja  
*Tetranychus turkestanii*, araña de la fresa  
*Tetranychus urticae*, arañita bimaculada

65

Cebada  
*Petrobia latens*, acaro de los ajos

## ES 2 213 162 T3

Ácaros importantes para humanos y animales  
*Demacentor variabilis*, garrapata americana de perros  
*Argas persicus*, garrapata de las aves  
5 *Dermatophagoides farinae*, ácaros americanos del polvo  
*Dermatophagoides pteronyssinus*, ácaros europeos del polvo

Ahora que se ha reconocido que pueden aislarse proteínas pesticidas a partir de la fase de crecimiento vegetativo de *Bacillus*, pueden aislarse otras cepas por técnicas convencionales y ensayarse con respecto a la actividad contra plagas particulares de plantas y de otros organismos. Generalmente, pueden aislarse cepas de *Bacillus* a partir de cualquier muestra del entorno, incluyendo el substrato, planta, insecto, polvo del silo de cereales, y otro material de muestra, etc., por métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Travers *et al.* (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53:1263-1266; Saleh *et al.* (1969) Can J. Microbiol. 15:1101-1104; DeLucca *et al.* (1981) Can. J. Microbiol. 27:865-870; y Norris, *et al.* (1981) "The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*." En Starr *et al.* (eds.), The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, Vol. II, Springer-Verlog Berlin Heidelberg. Después del aislamiento, puede ensayarse la actividad pesticida de las cepas durante el crecimiento vegetativo. De esta manera, pueden identificarse nuevas proteínas y cepas pesticidas.

Los microorganismos de *Bacillus* que encuentran uso en la invención incluyen *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis*, así como las especies de *Bacillus* indicadas en la tabla 11.

TABLA 11

### Lista de especies de *Bacillus*

25	Grupo Morfológico 1	
		<i>B. megaterium</i>
		<i>B. cereus</i> *
30		<i>B. cereus var. mycoides</i>
		<i>B. thuringiensis</i> *
		<i>B. licheniformis</i>
		<i>B. subtilis</i> *
35		<i>B. pumilus</i>
		<i>B. firmus</i> *
		<i>B. coagulans</i>
	Grupo Morfológico 2	
40		<i>B. polymyxa</i>
		<i>B. macerans</i>
		<i>B. circulans</i>
		<i>B. stearothermophilus</i>
45		<i>B. alvei</i> *
		<i>B. laterosporus</i> *
		<i>B. brevis</i>
		<i>B. pulvifaciens</i>
50		<i>B. popilliae</i> *
		<i>B. lentimorbus</i> *
		<i>B. larvae</i> *
	Grupo Morfológico 3	
55		<i>B. sphaericus</i> *
		<i>B. pasteurii</i>
	Cepas no asignadas	
	Subgrupo A	
60		<i>B. apiarius</i> *
		<i>B. filicolonicus</i>
		<i>B. thiaminolyticus</i>
		<i>B. alcalophilus</i>
	Subgrupo B	
65		<i>B. cirroflagellosus</i>
		<i>B. chitinosporus</i>
		<i>B. lentus</i>

## ES 2 213 162 T3

### Subgrupo C

*B. badius*  
*B. aneurinolyticus*  
*B. macroides*  
*B. freundenreichii*

### Subgrupo D

*B. pantothenicus*  
*B. epiphytus*

### Subgrupo E1

*B. aminovorans*  
*B. globisporus*  
*B. insolitus*  
*B. psychrophilus*

### Subgrupo E2

*B. psychrosaccharolyticus*  
*B. macquariensis*

\*=Las cepas de *Bacillus* que se han considerado previamente asociadas con el agrupamiento de insectos de acuerdo con Parry, J.M. *et al.* (1983) Color Atlas of *Bacillus* species, Wolfe Medical Publications, Londres.

De acuerdo con la presente invención, las proteínas pesticidas producidas durante el crecimiento vegetativo pueden aislarse de *Bacillus*. En una realización, pueden aislarse proteínas insecticidas producidas durante el crecimiento vegetativo. En la técnica se conocen métodos para el aislamiento de proteínas. Generalmente, las proteínas pueden purificarse por cromatografía convencional, incluyendo cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de inmunoafinidad, por cromatografía líquida de alta resolución, tal como cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico, cromatografía líquida de alta resolución de exclusión molecular, cromatografía de alta resolución y cromatografía de interacción hidrófoba, etc., por separación electroforética, tal como electroforesis en gel unidimensional, electroforesis en gel bidimensional, etc. Tales métodos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1 y 2, Ausubel *et al.* (eds.), John Wiley & Sons, NY (1988). Además, pueden prepararse anticuerpos contra preparaciones substancialmente puras de la proteína. Véase, por ejemplo, Radka *et al.* (1983) *J. Immunol.* 128: 2804; y Radka *et al.* (1984) *Immunogenetics* 19:63. Puede utilizarse cualquier combinación de métodos para purificar proteínas que tengan propiedades pesticidas. Cuando se está formulando el protocolo, la actividad pesticida se determina después de cada etapa de purificación.

Tales etapas de purificación producirán una fracción proteica substancialmente purificada. Por “substancialmente purificada” o “substancialmente pura” se entiende una proteína que carece substancialmente de cualquier compuesto asociado normalmente con la proteína en su estado natural. Las preparaciones “substancialmente puras” de proteínas pueden evaluarse por la ausencia de otras bandas proteicas detectables después de SDS-PAGE como se determina visualmente o por una exploración densitométrica. Como alternativa, la ausencia de otras secuencias amino-terminales o restos N-terminales en una preparación purificada puede indicar el nivel de pureza. La pureza puede verificarse por una segunda cromatografía de preparaciones “puras” que muestra la ausencia de otros picos por intercambio iónico, fase inversa o electroforesis capilar. Las expresiones “substancialmente puro” o “substancialmente purificado” no pretenden excluir mezclas artificiales o sintéticas de las proteínas con otros compuestos. Los términos tampoco pretenden excluir la presencia de impurezas minoritarias que no interfieren con la actividad biológica de la proteína y que pueden estar presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta.

Una vez aislada la proteína purificada, la proteína, o los polipéptidos de los que se compone, puede caracterizarse y secuenciarse por métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, la proteína purificada, o los polipéptidos que la componen, puede fragmentarse con bromuro de cianógeno o con proteasas tales como papaína, quimotripsina, tripsina, lisil-C endopeptidasa, etc. (Oike *et al.* (1982) *J. Biol. Chem.* 257:9751-9758; Liu *et al.* (1983) *Int. J. Pept. Protein Res.* 21:209-215). Los péptidos resultantes se separan, preferiblemente por HPLC o por resolución de geles y electrotransferencia en membranas de PVDF, y se someten a secuenciación de aminoácidos. Para realizar esta tarea, los péptidos preferiblemente se analizan por secuenciadores automáticos. Se reconoce que pueden determinarse los extremos N-terminal, C-terminal o secuencias de aminoácidos internas. A partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada, puede sintetizarse una secuencia de nucleótidos que puede usarse como sonda para ayudar al aislamiento del gen que codifica la proteína pesticida.

Se reconoce que las proteínas pesticidas pueden ser oligoméricas y variarán en peso molecular, número de protómeros, péptidos componentes, actividad contra plagas particulares y en otras características. Sin embargo, por los métodos indicados en este documento, pueden aislarse y caracterizarse proteínas activas contra una diversidad de plagas.

Una vez que se ha aislado y caracterizado la proteína purificada, se reconoce que puede alterarse de diversas formas incluyendo sustituciones de aminoácidos, deleciones, truncaciones e inserciones. Los métodos para tales

manipulaciones generalmente son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de la secuencia de aminoácidos de las proteínas pesticidas por mutaciones en el ADN. Tales variantes poseerán la actividad pesticida deseada. Evidentemente, las mutaciones que se realizan en el ADN que codifica la variante no deben poner la secuencia fuera de la fase de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que produzcan una estructura de ARNm secundaria. Véase la publicación de la Solicitud de Patente EP N° 75.444.

De esta manera, la presente invención incluye las proteínas pesticidas así como componentes y fragmentos de las mismas. Es decir, se reconoce que pueden producirse protómeros componentes, polipéptidos o fragmentos de las proteínas que retienen la actividad pesticida. Estos fragmentos incluyen secuencias truncadas, así como secuencias de aminoácidos N-terminales, C-terminales, internas y delecionadas internamente de las proteínas.

La mayoría de las deleciones, inserciones y sustituciones de la secuencia proteica no se espera que produzcan cambios radicales en las características de la proteína pesticida. Sin embargo, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, deleción o inserción antes de hacerlo, un especialista en la técnica apreciará que el efecto se evaluará por ensayos de selección rutinarios.

Las proteínas u otros polipéptidos componentes descritos en este documento pueden usarse solos o en combinación. Es decir, pueden usarse varias proteínas para controlar diferentes plagas de insectos.

Algunas proteínas son cadenas polipeptídicas individuales mientras que muchas proteínas constan de más de una cadena polipeptídica, es decir, son oligoméricas. Además, algunas VIP son pesticidamente activas como oligómeros. En estos casos, se utilizan protómeros adicionales para aumentar la actividad pesticida o activar proteínas pesticidas. Los protómeros que potencian o activan se denominan proteínas auxiliares. Las proteínas auxiliares activan o potencian una proteína pesticida por medio de la interacción con la proteína pesticida para formar una proteína oligomérica que tiene una mayor actividad pesticida que la observada en la ausencia de la proteína auxiliar.

Entre las proteínas pesticidas de la invención, sorprendentemente, puede identificarse una nueva clase de proteínas específicas de insectos dentro del alcance de la presente invención. Dichas proteínas, que se denominan a lo largo de esta solicitud VIP3, pueden obtenerse a partir de cepas de *Bacillus* spp, pero preferiblemente a partir de cepas de *Bacillus thuringiensis* y aún más preferiblemente de cepas de *Bacillus thuringiensis* AB88 y AB424. Dichas VIP están presentes principalmente en los sobrenadantes de cultivos de *Bacillus* constituyendo al menos un 75% del total en la cepa AB88. Las proteínas VIP3 se caracterizan adicionalmente por su espectro único de actividad insecticida, que incluye una actividad contra especies de *Agrotis* y/o *Spodoptera*, pero especialmente una actividad contra el gusano cortador negro y/o la palomilla del maíz y/o el gusano soldado de la remolacha y/o el gusano de los brotes del tabaco y/o el gusano del fruto.

El gusano cortador negro es un insecto importante desde el punto de vista agrícola bastante resistente a las  $\delta$ -endotoxinas. MacIntosh *et al.* (1990) *J Invertebr Pathol* 56, 258-266 indica que las  $\delta$ -endotoxinas CryIA(b) y CryIA(c) poseen propiedades insecticidas contra BCW con una LC<sub>50</sub> mayor de 80  $\mu$ g y 18  $\mu$ g/ml de dieta respectivamente. Las proteínas insecticidas vip3A de acuerdo con la invención proporcionan una mortalidad > 50% cuando se añaden en una cantidad de proteína de al menos 10 a 500, preferiblemente de 50 a 350 y más preferiblemente de 200 a 300 veces menor que la cantidad de proteína CryIA necesaria para conseguir una mortalidad del 50%. Dentro de la invención se prefieren especialmente proteínas insecticidas vip3A que proporcionan una mortalidad del 100% cuando se añaden en una cantidad de proteína al menos 260 veces menor que la cantidad de proteínas CryIA necesaria para conseguir una mortalidad del 50%.

Las proteínas insecticidas vip3 de acuerdo con la invención están presentes principalmente en los sobrenadantes de los cultivos y, por lo tanto, se deben clasificar como proteínas secretadas. Preferiblemente contienen en la secuencia N-terminal varios restos cargados positivamente seguidos de una región de núcleo hidrófobo y no se procesan en el extremo N-terminal durante su exportación.

Al igual que las otras proteínas pesticidas indicadas hasta ahora dentro del alcance de la invención, las proteínas VIP3 pueden detectarse en fases de crecimiento previas a la esporulación estableciendo una distinción clara adicional de otras proteínas que pertenecen a la familia de las  $\delta$ -endotoxinas. Preferiblemente, la expresión de la proteína específica de insectos empieza durante la mitad de la fase logarítmica y continúa durante la esporulación. Debido al modelo de expresión específico en combinación con la alta estabilidad de las proteínas VIP3, pueden encontrarse grandes cantidades de las proteínas VIP3 en sobrenadantes de cultivos en esporulación. Se prefieren especialmente las proteínas VIP3 identificadas en la SEC ID N°: 2 y la SEC ID N°: 5 y las correspondientes moléculas de ADN que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican dichas proteínas, pero especialmente las moléculas de ADN que comprenden las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 4.

Las proteínas pesticidas de la invención pueden usarse en combinación con endotoxinas de Bt o con otras proteínas insecticidas para aumentar la gama de insectos diana. Además, el uso de las VIP de la presente invención en combinación con  $\delta$ -endotoxinas de Bt y otros principios insecticidas de naturaleza distinta tiene una utilidad particular para la prevención y/o tratamiento de la resistencia de insectos. Otros principios insecticidas incluyen inhibidores de proteasa (tanto de tipo serina como de tipo cisteína), lectinas,  $\alpha$ -amilasa y peroxidasa. En una realización preferida, la expresión de VIP en una planta transgénica va acompañada por la expresión de una o más  $\delta$ -endotoxinas de Bt. Esta co-expresión de más de un principio insecticida en la misma planta transgénica puede conseguirse modificando

por ingeniería genética una planta para que contenga y exprese todos los genes necesarios. Como alternativa, puede modificarse por ingeniería genética una planta, parental 1, para la expresión de VIP. Una segunda planta, parental 2, puede modificarse por ingeniería genética para la expresión de la  $\delta$ -endotoxina de Bt. Por medio del cruce del parental 1 con el parental 2, se obtienen plantas descendientes que expresan todos los genes introducidos en los parentales 1 y 2. Son  $\delta$ -endotoxinas de Bt particularmente preferidas las descritas en el documento EP-A 0618976, incorporado en este documento como referencia.

Un número substancial de proteínas citotóxicas, aunque no todas, son de acción binaria. Las toxinas binarias típicamente constan de dos dominios proteicos, uno denominado dominio A y el otro denominado dominio B (véase *Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, J.E. Alouf y J.H. Freer eds. (1991) Academic Press). El dominio A posee una actividad citotóxica potente. El dominio B se une a un receptor de la superficie celular externa antes de internalizarse. Típicamente, el dominio citotóxico A debe ir acompañado por un dominio de translocación para llegar al citoplasma. A menudo, los dominios A y B son polipéptidos separados o protómeros, que están asociados por una interacción proteína-proteína o un enlace disulfuro. Sin embargo, la toxina puede ser un solo polipéptido que se procesa proteolíticamente dentro de la célula en dos dominios, como ocurre en el caso de la exotoxina A de *Pseudomonas*. En resumen, las toxinas binarias típicamente tienen tres dominios importantes, un dominio A citotóxico, un dominio B de unión al receptor y un dominio de translocación. Los dominios A y B a menudo están asociados por dominios de interacción proteína-proteína.

Los dominios de unión al receptor de la presente invención son útiles para suministrar cualquier proteína, toxina, enzima, factor de transcripción, ácido nucleico, agente químico o cualquier otro factor a los insectos diana que tienen un receptor reconocido por el dominio de unión al receptor de las toxinas binarias descritas en esta patente. De forma similar, como las toxinas binarias tienen dominios de translocación que atraviesan las membranas de bicapa de fosfolípidos y acompañan a las citotoxinas a través de estas membranas, tales dominios de translocación pueden ser útiles para acompañar a cualquier proteína, toxina, enzima, factor de transcripción, ácido nucleico, agente químico o cualquier otro factor a través de una bicapa de fosfolípidos tal como la membrana plasmática o la membrana de una vesícula. El dominio de translocación puede perforar membranas por sí mismo, teniendo de esta manera propiedades tóxicas o insecticidas. Además, todas las toxinas binarias tienen dominios citotóxicos; tal dominio citotóxico puede ser útil como una proteína letal, solo o cuando se suministra a cualquier célula diana por cualquier medio.

Finalmente, como las toxinas binarias que constan de dos polipéptidos a menudo forman un complejo, es probable que existan regiones de interacción proteína-proteína dentro de los componentes de las toxinas binarias de la invención. Estos dominios de interacción proteína-proteína pueden ser útiles para formar asociaciones entre cualquier combinación de toxinas, enzimas, factores de transcripción, ácidos nucleicos, anticuerpos, restos de unión a células o cualquier otro agente químico, factor, proteína o dominio de proteínas.

Las toxinas, enzimas, factores de transcripción, anticuerpos, restos de unión a células u otros dominios de proteínas pueden fusionarse con proteínas pesticidas o auxiliares produciendo fusiones genéticas en fase que, cuando se traducen por los ribosomas, producen una proteína de fusión con los atributos combinados de la VIP y los otros componentes usados en la fusión. Además, si el dominio proteico fusionado a la VIP tiene afinidad por otra proteína, ácido nucleico, carbohidrato, lípido u otro agente químico o factor, puede formarse un complejo de tres componentes. Este complejo tendrá los atributos de todos sus componentes. Puede usarse una base lógica similar para producir complejos de cuatro o más componentes. Estos complejos son útiles como toxinas insecticidas, agentes farmacéuticos, reactivos de laboratorio y reactivos de diagnóstico, etc. Son ejemplos en los que actualmente se usan tales complejos toxinas de fusión para terapias potenciales contra el cáncer, reactivos de ensayos ELISA y análisis de inmunotransferencia.

Una estrategia para alterar las proteínas pesticidas o auxiliares es fusionar una "señal S" de 15 aminoácidos a la proteína sin destruir el dominio o dominios de unión a las células de insectos, dominios de translocación o dominios de interacción proteína-proteína de las proteínas. La señal S tiene una alta afinidad ( $K_d = 10^{-9}$  M) por una proteína S ribonucleasa que, cuando se une a la señal S, forma una ribonucleasa activa (véase F.M. Richards y H.W. Wyckoff (1971) en "The Enzymes", Vol. IV (Boyer, P.D. ed.) páginas 647-806. Academic Press, Nueva York). La fusión puede realizarse de tal forma que destruya o elimine la actividad citotóxica de la proteína pesticida o auxiliar, reemplazando de esta manera la actividad citotóxica de VIP por una nueva actividad ribonucleasa citotóxica. La toxina final estaría compuesta por la proteína S, una proteína pesticida y una proteína auxiliar, donde la proteína pesticida o la proteína auxiliar se produce como fusiones traduccionales con la señal S. Pueden usarse estrategias similares para fusionar otras citotoxinas potenciales a proteínas pesticidas o auxiliares incluyendo (pero sin limitación) proteínas de inactivación de ribosomas, hormonas de insectos, receptores de hormonas, factores de transcripción, proteasas, fosfatasa, exotoxina A de *Pseudomonas*, o cualquier otra proteína o factor químico que sea letal cuando se suministre a las células. De forma similar, a las células se les pueden suministrar proteínas que no son letales, pero podrían afectar a la bioquímica o fisiología celular.

El espectro de toxicidad hacia diferentes especies puede alterarse por dominios de fusión a proteínas pesticidas o auxiliares que reconocen receptores de la superficie celular de otras especies. Tales dominios podrían incluir (pero sin limitación) anticuerpos, transferrina, hormonas o secuencias peptídicas aisladas a partir de bibliotecas seleccionadas por afinidad y presentadas por fagos. Además, podrían usarse secuencias peptídicas que se unen a nutrientes, vitaminas, hormonas u otros agentes químicos que se transportan al interior de las células para alterar el espectro de toxicidad.

Las proteínas pesticidas de la presente invención son las proteínas que confieren una propiedad pesticida específica.

## ES 2 213 162 T3

Tales proteínas pueden variar en peso molecular, teniendo los polipéptidos componentes al menos un peso molecular de 30 kDa o mayor, preferiblemente de aproximadamente 50 kDa o mayor.

Es posible que la proteína pesticida pueda ser un componente de una proteína pesticida multimérica. Tal proteína pesticida puede variar en peso molecular, teniendo al menos un peso molecular de 50 kDa hasta al menos 200 kDa, preferiblemente de aproximadamente 100 kDa a 150 kDa.

Para los fines de la invención, la expresión “proteína insecticida vegetativa” (VIP) incluye las proteínas producidas durante el crecimiento vegetativo que, solas o en combinación, pueden usarse para conseguir una actividad pesticida. Esto incluye proteínas pesticidas, proteínas auxiliares y las proteínas que demuestran actividad sólo en presencia de la proteína auxiliar o los componentes polipeptídicos de estas proteínas.

Se reconoce que hay métodos alternativos disponibles para obtener las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las presentes proteínas. Por ejemplo, para obtener la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína pesticida, pueden aislarse clones cosmióticos que expresan la proteína pesticida a partir de una biblioteca genómica. A partir de clones cosmióticos activos mayores, pueden obtenerse subclones más pequeños y ensayarse con respecto a la actividad. De esta manera, pueden secuenciarse clones que expresan una proteína pesticida activa para determinar la secuencia de nucleótidos del gen. Entonces, puede deducirse una secuencia de aminoácidos para la proteína. Como métodos moleculares generales, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Vols. 1-3, Sambrook et al. (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)*, y las referencias citadas en este documento.

La presente invención también incluye secuencias de nucleótidos de organismos distintos de *Bacillus*, donde las secuencias de nucleótidos se pueden aislar por hibridación con las secuencias de nucleótidos de *Bacillus* de la invención. Las proteínas codificadas por tales secuencias de nucleótidos pueden ensayarse con respecto a la actividad pesticida. La invención también incluye las proteínas codificadas por las secuencias de nucleótidos. Además, la invención incluye proteínas obtenidas a partir de organismos distintos de *Bacillus*, donde la proteína presenta reacción cruzada con anticuerpos inducidos contra las proteínas de la invención. De nuevo, las proteínas aisladas pueden ensayarse con respecto a la actividad pesticida por los métodos descritos en este documento o por otros métodos bien conocidos en la técnica.

Una vez aisladas las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas pesticidas de la invención, pueden manipularse y usarse para expresar la proteína en una diversidad de hospedadores incluyendo otros organismos, incluyendo microorganismos y plantas.

Los genes pesticidas de la invención pueden optimizarse para aumentar la expresión en plantas. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A 0618976; EP-A 0359472; EP-A 0385962; WO 91/16432; Perlak *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88:3324-3328; y Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Research* 17: 477-498. De esta manera, los genes pueden sintetizarse utilizando codones preferidos en plantas. Es decir, el codón preferido para un hospedador particular es el codón individual que codifica con más frecuencia ese aminoácido en ese hospedador. El codón preferido de maíz, por ejemplo, para un aminoácido particular puede obtenerse a partir de secuencias génicas conocidas de maíz. En Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Research* 17:477-498, cuya descripción se incorpora en este documento como referencia, puede encontrarse el uso de codones de maíz para 28 genes de plantas de maíz. También pueden obtenerse genes sintéticos basándose en la distribución de codones de uso de hospedadores particulares para una aminoácido particular.

De esta manera, las secuencias de nucleótidos pueden optimizarse para la expresión en cualquier planta. Se reconoce que todas o cualquier parte de la secuencia génica puede optimizarse o ser sintética. Es decir, también pueden usarse secuencias sintéticas o parcialmente optimizadas.

De una manera similar, las secuencias de nucleótidos pueden optimizarse para la expresión en cualquier microorganismo. Si se desean más detalles de un uso de codones preferidos de *Bacillus* véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.024.837 y Johansen *et al.* (1988) *Gene* 65:293-304.

En la técnica se describen metodologías para la construcción de cassettes de expresión de plantas así como la introducción de ADN extraño en plantas. Tales cassettes de expresión pueden incluir promotores, terminadores, potenciadores, secuencias líder, intrones y otras secuencias reguladoras unidas operativamente a la secuencia codificante de la proteína pesticida. Además se reconoce que en los cassettes de expresión pueden usarse promotores o terminadores de los genes VIP.

Generalmente, para la introducción de ADN extraño en plantas, se han utilizado vectores de plásmidos Ti para el suministro de ADN extraño así como la captación directa de ADN, liposomas, electroporación, microinyección y el uso de microproyectiles. Tales métodos se han publicado en la técnica. Véase, por ejemplo, Guerche *et al.* (1987) *Plant Science* 52:111-116; Neuhauser *et al.*, (1987) *Theor. Appl. Genet.* 75:30-36; Klein *et al.*, (1987) *Nature* 327: 70-73; Howell *et al.*, (1980) *Science* 208:1265; Horsch *et al.*, (1985) *Science* 227: 1229-1231; DeBlock *et al.*, (1989) *Plant Physiology* 91:694-701; *Methods for Plant Molecular Biology* (Weissbach y Weissbach, eds.) Academic Press, Inc. (1988); y *Methods in Plant Molecular Biology* (Schuler y Zielinski, eds.) Academic Press, Inc (1989). Véase también la solicitud de patente de Estados Unidos con el n° de serie 08/008.374 incorporada en este documento



## ES 2 213 162 T3

como referencia. Véanse también los documentos EP-A 0193259 y EP-A-0451878. Se entenderá que el método de transformación dependerá de la célula vegetal a transformar.

Además se reconoce que los componentes del cassette de expresión pueden modificarse para aumentar la expresión. Por ejemplo, pueden emplearse secuencias truncadas, sustituciones de nucleótidos u otras modificaciones. Véase, por ejemplo, Perlak *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3324-3328; Murray *et al.*, (1898) *Nucleic Acids Research* 17:477-498; y documento WO 91/16432.

La construcción también puede incluir cualquier otro regulador necesario, tal como terminadores (Guerineau *et al.*, (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 226:141-144; Proudfoot, (1991) *Cell*, 64:671-674; Sanfacon *et al.*, (1991), *Genes Dev.*, 5:141-149; Mogen *et al.*, (1990), *Plant Cell*, 2:1261-1272; Munroe *et al.*, (1990), *Gene*, 91:151-158; Ballas *et al.*, (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17:7891-7903; Joshi *et al.*, (1987), *Nucleic Acid Res.*, 15:9627-9639); secuencias consenso traduccionales de plantas (Joshi, C.P., (1987), *Nucleic Acids Research*, 15:6643-6653), intrones (Luehrsen y Walbot, (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 225:81-93) y similares, unidos operativamente a la secuencia de nucleótidos. Puede ser beneficioso incluir secuencias líder 5' en la construcción del cassette de expresión. Tales secuencias líder pueden actuar para mejorar la traducción. En la técnica se conocen líderes de traducción e incluyen:

líderes de picornavirus, por ejemplo, el líder de EMCV (región no codificante 5' del organismo que produce la encefalomiocarditis) (Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R. y Moss, B. (1989) *PNAS USA* 86:6126-6130);

líderes de potyvirus, por ejemplo, líder de TEV (Virus del jaspeado del tabaco) (Allison *et al.*, (1986); líder de MDMV (virus del mosaico enanizante del maíz); *Virology*, 154:9-20), y proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (BiP), (Macejak, D.G., y Sarnow, P., (1991), *Nature*, 353: 90-94;

líder no traducido del ARNm de la proteína de la cubierta del virus del mosaico de la alfalfa (AMV RNA 4), (Jobling, S.A., y Gehrke L., (1987); *Nature*, 325:622-625;

líder del virus del mosaico del tabaco (TMV), (Gallie, D.R. *et al.*, (1989), *Molecular Biology of RNA*, páginas 237-256; y

líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel, S.A., *et al.*, (1991), *Virology*, 81:382-385. Véase también, Della-Cioppa *et al.*, (1987), *Plant Physiology*, 84:965-968.

En el cassette de expresión puede utilizarse un terminador vegetal. Véase Rosenberg *et al.*, (1987), *Gene*, 56:125; Guerineau *et al.*, (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 226:141-144; Proudfoot, (1991), *Cell*, 64:671-674; Sanfacon *et al.*, (1991), *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen *et al.*, (1990) *Plant Cell* 2:1261-1272; Munroe *et al.*, (1990), *Gene*, 91:151-158; Ballas *et al.*, (1989), *Nucleic Acids Res.*, 17:7891-7903; Joshi *et al.*, (1987), *Nucleic Acid Res.*, 15: 9627-9639.

Para una expresión con especificidad de tejido, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden unirse operativamente a promotores con especificidad de tejido. Véase, por ejemplo, el documento EP-A 0618976, incorporado en este documento como referencia.

Dentro del alcance de la presente invención también se incluyen plantas transgénicas, en particular plantas transgénicas fértiles transformadas por medio de los procesos descritos anteriormente y su progenie asexual y/o sexual, que comprende y preferiblemente también expresa la proteína pesticida de acuerdo con la invención. Se prefieren especialmente plantas híbridas.

La planta transgénica de acuerdo con la invención puede ser una planta dicotiledónea o monocotiledónea. Se prefieren las plantas monocotiledóneas de la familia *Graminaceae* que incluyen plantas *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Bromus*, *Oryzae*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale* y *Setaria*.

Se prefieren especialmente el maíz transgénico, el trigo, la cebada, el sorgo, el centeno, la avena, el césped y el arroz.

Entre las plantas dicotiledóneas se prefieren especialmente en esta invención la soja, el algodón, el tabaco, la remolacha azucarera, la colza y el girasol.

Se entiende que la expresión "progenie" incluye la progenie generada tanto "asexual" como "sexualmente" de plantas transgénicas. Esta definición también pretende incluir todos los mutantes y variantes que se pueden obtener por medio de procesos conocidos, tales como por ejemplo fusión celular o selección de mutantes, y que presentan las propiedades características de la planta parental transformada inicialmente, junto con todos los productos de cruce y de fusión del material vegetal transformado.

Otro objeto de la invención se refiere al material de proliferación de plantas transgénicas.

El material de proliferación de plantas transgénicas se define, en relación con la invención, como cualquier material vegetal que puede propagarse sexual o asexualmente *in vivo* o *in vitro*. Dentro del alcance de la presente invención se prefieren particularmente protoplastos, células, callos, tejidos, órganos, semillas, embriones, polen, células huevo,

cigotos, junto con cualquier otro material de propagación obtenido a partir de plantas transgénicas.

También son objeto de la presente invención partes de plantas, tales como por ejemplo flores, tallos, frutos, hojas, raíces procedentes de plantas transgénicas o su progenie previamente transformadas por medio del proceso de la invención y, por lo tanto, que constan al menos en parte de células transgénicas.

Antes de que el material de propagación vegetal [frutos, tubérculos, granos, semillas], pero especialmente las semillas, se venda como un producto comercial, habitualmente se trata con un recubrimiento protector que comprende herbicidas, insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea junto con vehículos, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación adicionales empleados habitualmente en la técnica de la formulación para proporcionar protección contra los daños producidos por bacterias hongos o plagas animales.

Para tratar las semillas, el recubrimiento protector puede aplicarse a las semillas impregnando los tubérculos o granos con una formulación líquida o recubriéndolos con una formulación húmeda o seca combinada. Además, en casos especiales, se pueden utilizar otros métodos de aplicación a las plantas, por ejemplo el tratamiento dirigido a los brotes o a los frutos.

La semilla vegetal de acuerdo con la invención que contiene una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida de acuerdo con la invención, puede tratarse con un recubrimiento protector de semillas que comprende un compuesto de tratamiento de semillas tal como, por ejemplo, captano, carboxina, tiram (TMTD<sup>®</sup>), metalaxil (Apron<sup>®</sup>) y pirimifos-metil (Actellic<sup>®</sup>) y otros que se usan comúnmente en el tratamiento de semillas. Dentro del alcance de la invención se prefieren recubrimientos protectores de semillas que comprenden una composición entomocida de acuerdo con la invención sola o en combinación con un recubrimiento protector de semillas usado habitualmente en el tratamiento de las semillas.

De esta manera, es otro objeto de la presente invención proporcionar un material de propagación de plantas para plantas cultivadas, pero especialmente semillas de plantas, que se trata con un recubrimiento protector de semillas como se ha definido anteriormente en este documento.

Se reconoce que los genes que codifican las proteínas pesticidas pueden usarse para transformar organismos patógenos de insectos. Tales organismos incluyen baculovirus, hongos, protozoos, bacterias y nematodos.

Las cepas de *Bacillus* de la invención pueden usarse para proteger cultivos agrícolas y productos de plagas. Como alternativa, puede introducirse un gen que codifica el pesticida a través de un vector adecuado en un hospedador microbiano, y dicho hospedador puede aplicarse al medio, a plantas o a animales. Pueden seleccionarse microorganismos hospedadores que se sepa que ocupan la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos se seleccionan de forma que sean capaces de competir satisfactoriamente en el entorno particular con los microorganismos de tipo silvestre, proporcionar un mantenimiento estable y expresión del gen que expresa el pesticida polipeptídico y, deseablemente, proporcionar una protección mejorada del pesticida frente a la degradación e inactivación ambiental.

Tales microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. Son de un interés particular microorganismos tales como bacterias, por ejemplo, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylius*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. Son de un interés particular especies de bacterias de la fitosfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacteria*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus*, *Clavibacter xyli* y *Azotobacter vinlandii*, y especies de levaduras de la fitosfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces rosues*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pollulans*. Son de particular interés los microorganismos pigmentados.

Se dispone de varias vías para introducir un gen que expresa la proteína pesticida en el microorganismo hospedador en condiciones que permitan el mantenimiento y la expresión estables del gen. Por ejemplo, pueden construirse cassettes de expresión que incluyan las construcciones de ADN de interés unidas operativamente con las señales reguladoras de la transcripción y la traducción para la expresión de las construcciones de ADN, y una secuencia de ADN homóloga a una secuencia del organismo hospedador, con lo que se producirá la integración, y/o un sistema de replicación que sea funcional en el hospedador, con lo que se producirá una integración o mantenimiento estable.

Las señales reguladoras de la transcripción y la traducción incluyen, pero sin limitación, promotores, sitios de inicio de la transcripción, operadores, activadores, potenciadores, otros elementos reguladores, sitios de unión a ribosomas, un codón de iniciación, señales de terminación, y similares. Véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.039.523; la Patente de Estados Unidos N° 4.853.331; el documento EPO0480762A2; Sambrook *et al.*, *supra*; Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Maniatis *et al.* (eds) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982), Advanced Bacterial Genetics, Davis *et al.* (eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1980); y las referencias citadas en este documento.

Las células hospedadoras adecuadas, donde las células que contienen el pesticida se tratarán para prolongar la actividad de la toxina en la célula cuando la célula tratada se aplique al medio de la plaga o plagas diana, pueden incluir procariotas o eucariotas, normalmente limitándose a las células que no producen sustancias tóxicas para organismos superiores tales como mamíferos. Sin embargo, podrían usarse organismos que producen sustancias tóxicas para organismos superiores, donde la toxina es inestable o el nivel de aplicación es suficientemente bajo para evitar cualquier posibilidad de toxicidad contra un hospedador mamífero. Como hospedadores, serán de un interés particular los procariotas y los eucariotas inferiores, tales como hongos. Los procariotas ilustrativos, tanto gram-negativos como gram-positivos, incluyen *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, *Erwinia*, *Shigella*, *Salmonella*, y *Proteus*; *Bacillaceae*; *Rhizobiaceae*, tales como *Rhizobium*; *Spirillaceae*, tales como fotobacterias, *Zymomonas*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Desulfovibrio*, *Spirillum*; *Lactobacillaceae*; *Pseudomonadaceae*, tales como *Pseudomonas* y *Acetobacter*; *Azotobacteraceae* y *Nitrobacteraceae*. Entre los eucariotas se encuentran los hongos, tales como *Phycomycetes* y *Ascomycetes*, que incluyen levaduras, tales como *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*; y levaduras *Basidiomycetes*, tales como *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Sporobolomyces*, y similares.

Las características de interés particular en la selección de una célula hospedadora para fines de producción incluyen la facilidad de introducción del gen de la proteína en el hospedador, la disponibilidad de sistemas de expresión, la eficacia de expresión, la estabilidad de la proteína en el hospedador y la presencia de capacidades genéticas auxiliares. Las características de interés para uso como microcápsula pesticida incluyen cualidades protectoras para el pesticida, tales como paredes celulares espesas, pigmentación y empaquetamiento intracelular o formación de cuerpos de inclusión; afinidad por las hojas; ausencia de toxicidad para mamíferos; atractivo para ser ingerido por las plagas; facilidad de destrucción y fijación sin dañar a la toxina; y similares. Otras consideraciones incluyen la facilidad de formulación y manipulación, aspectos económicos, estabilidad durante el almacenamiento y similares.

Los organismos hospedadores de un interés particular incluyen levaduras tales como *Rhodotorula sp.*, *Aureobasidium sp.*, *Saccharomyces sp.*, y *Sporobolomyces sp.*; organismos del filoplano tales como *Pseudomonas sp.*, *Erwinia sp.* y *Flavobacterium sp.*; u otros organismos tales como *Escherichia*, *Lactobacillus sp.*, *Bacillus sp.*, y similares. Los organismos específicos incluyen *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y similares.

Pueden introducirse genes VIP en microorganismos que se multiplican en las plantas (epífitos) para liberar proteínas VIP en plagas diana potenciales. Los epífitos pueden ser, por ejemplo, bacterias gram-positivas o gram-negativas.

Por ejemplo, pueden aislarse bacterias colonizadoras de raíces a partir de la planta de interés por métodos conocidos en la técnica. Específicamente, podría aislarse una cepa de *Bacillus cereus* que coloniza las raíces a partir de las raíces de una planta (por ejemplo, véase J. Handelsman, S. Raffel, E. Mester, L. Wunderlich y C. Grau, *Appl. Environ. Microbiol.* 56:713-718, (1990)). Podrían introducirse VIP1 y/o VIP2 y/o VIP3 en un *Bacillus cereus* colonizador de raíces por métodos convencionales conocidos en la técnica.

Además, puede introducirse VIP3 u otros VIP de la invención en el *Bacillus* colonizador de las raíces por medio de electro-transformación. Específicamente, los VIP pueden clonarse en un vector lanzadera, por ejemplo, pHT3101 (D. Lereclus *et al.*, *FEMS Microbiol. Letts.*, 60:211-218 (1989)) como se describe en el ejemplo 10. El vector lanzadera pHT3101 que contiene la secuencia codificante para el VIP particular después puede utilizarse para transformar el *Bacillus* colonizador de raíces por medio de electroporación (D. Lereclus *et al.* 1989, *FEMS Microbiol. Letts.* 60:211-218).

Pueden diseñarse sistemas de expresión de forma que las proteínas VIP se secreten fuera del citoplasma de bacterias gram-negativas, por ejemplo, *E. coli*. Las ventajas de secretar proteínas VIP son (1) se evitan los efectos tóxicos potenciales de las proteínas VIP expresadas dentro del citoplasma, (2) se puede aumentar el nivel de proteína VIP expresada y (3) se puede ayudar a la purificación eficaz de la proteína VIP.

Pueden obtenerse proteínas VIP que se secreten en *E. coli*, por ejemplo, por medio de la fusión de un péptido señal de *E. coli* apropiado con el extremo amino-terminal del péptido señal de VIP o por medio del reemplazo del péptido señal de VIP por el péptido señal de *E. coli*. Pueden encontrarse péptidos señal reconocidos por *E. coli* en proteínas que ya se sabe que se secretan en *E. coli*, por ejemplo, la proteína OmpA (J. Ghayeb, H. Kimura, M. Takahara, Y. Masui y M. Inouye, *EMBO J.*, 3:2437-2442 (1984)). OmpA es una proteína principal de la membrana externa de *E. coli* y, de esta manera, se considera que su péptido señal es eficaz en el proceso de translocación. Además, el péptido señal de OmpA no necesita modificarse antes del procesamiento, como sería el caso de otros péptidos señal, por ejemplo el péptido señal de lipoproteínas (G. Duffaud, P. March y M. Inouye, *Methods in Enzymology*, 153:492 (1987)).

Específicamente, pueden introducirse sitios de restricción únicos BamHI en los extremos amino-terminal y carboxi-terminal de las secuencias codificantes de VIP usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Estos fragmentos BamHI pueden clonarse en fase en el vector pIN-III-ompA1, A2 o A3 (J. Ghayeb, H. Kimura, M. Takahara, H. Hsiung, Y. Masui y M. Inouye, *EMBO J.*, 3:2437-2442 (1984)) creando de esta manera un gen de fusión ompA:VIP que se secreta en el espacio periplásmico. Los otros sitios de restricción en el poliengarce de pIN-III-ompA pueden eliminarse por métodos convencionales conocidos en la técnica de forma que la secuencia codificante de aminoácidos amino-terminal de VIP esté directamente después del sitio de escisión del péptido señal de ompA. De esta manera, la secuencia de VIP secretada en *E. coli* sería idéntica a la secuencia de VIP nativa.

5 Cuando el péptido señal nativo de VIP no se necesita para un repliegamiento apropiado de la proteína madura, tales secuencias señal pueden retirarse y reemplazarse por la secuencia señal de ompA. Pueden introducirse sitios de restricción BamHI únicos en el extremo amino de las secuencias codificantes de proproteína directamente después de las secuencias codificantes del péptido señal de VIP y el extremo carboxi de la secuencia codificante de VIP. Estos fragmentos BamHI después pueden clonarse en los vectores pIN-III-ompA como se ha descrito anteriormente.

10 En la técnica se conocen métodos generales para emplear las cepas de la invención en el control pesticida o en la modificación por ingeniería genética de otros organismos como agentes pesticidas. Véanse, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.039.523 y el documento EP 0480762A2.

15 Las VIP pueden fermentarse en un hospedador bacteriano y las bacterias resultantes procesarse y usarse como pulverizaciones microbianas de la misma manera que se han usado cepas de *Bacillus thuringiensis* como pulverizaciones insecticidas. En el caso de una VIP que se secreta a partir de *Bacillus*, la señal de secreción se retira o se muta usando procedimientos conocidos en la técnica. Tales mutaciones y/o deleciones previenen la secreción de la proteína VIP en el medio de crecimiento durante el proceso de fermentación. Las VIP quedan retenidas dentro de la célula y las células después se procesan para producir las VIP encapsuladas. Para este fin puede usarse cualquier microorganismo adecuado. Se ha usado pseudomonas para expresar endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* como proteínas encapsuladas y las células resultantes se han procesado y pulverizado como un insecticida (H. Gaertner *et al.* 1993, In Advanced Engineered Pesticides, L. Kim ed.)

20 De esta manera se usan diversas cepas de *Bacillus thuringiensis*. Tales cepas de Bt producen las proteínas endotoxinas así como VIP. Como alternativa, tales cepas pueden producir sólo VIP. Se ha demostrado que una cepa con esporulación deficiente de *Bacillus subtilis* produce altos niveles de endotoxina CryIIIA procedente de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse, H. y Lereclus, D., "Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* CryIIIA toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a *spoOA* mutant", *J. Bacteriol.*, 176:4734-4741 (1994)). Puede prepararse un mutante *spoOA* similar en *Bacillus thuringiensis* y usarse para producir VIP encapsuladas que no se secretan en el medio sino que quedan retenidas dentro de las células.

30 Para mantener las VIP dentro de la células de *Bacillus*, el péptido señal puede desarmarse de forma que ya no funcione como una señal de secreción.

35 Como alternativa, los péptidos señal de VIP de la invención pueden eliminarse de la secuencia, haciendo que sean irreconocibles como proteínas de secreción en *Bacillus*. Específicamente, puede modificarse por ingeniería genética un sitio de inicio de metionina delante de la secuencia de la proproteína usando métodos conocidos en la técnica.

Pueden introducirse genes VIP en microorganismos que se multiplican en plantas (epífitos) para suministrar proteínas VIP a plagas diana potenciales. Los epífitos pueden ser, por ejemplo, bacterias gram-positivas o gram-negativas.

40 Las cepas de *Bacillus* de la invención o los microorganismos que se han alterado genéticamente para contener el gen pesticida y la proteína pueden usarse para proteger cultivos agrícolas y productos frente a plagas. En un aspecto de la invención, se tratan células enteras, es decir no lisadas, de un organismo productor de una toxina (pesticida) con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al medio de la plaga o plagas diana.

45 Como alternativa, los pesticidas se producen introduciendo un gen heterólogo en un hospedador celular. La expresión del gen heterólogo ocasiona, directa o indirectamente, la producción intracelular y el mantenimiento del pesticida. Estas células después se tratan en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al medio de la plaga o las plagas diana. El producto resultante retiene la toxicidad de la toxina. Estos pesticidas encapsulados de forma natural después pueden formularse de acuerdo con técnicas convencionales para la aplicación en el medio que alberga una plaga diana, por ejemplo, un sustrato, agua y el follaje de las plantas. Véase, por ejemplo, el documento EPA 0192319, y las referencias citadas en el mismo.

50 Los ingredientes activos de la presente invención normalmente se aplican en forma de composiciones y pueden aplicarse al área de cultivo o a la planta a tratar simultáneamente o en sucesión con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes o donadores de micronutrientes u otras preparaciones que influyen sobre el crecimiento de las plantas. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con vehículos aceptables desde el punto de vista agrícola, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación empleados habitualmente en la técnica de la formulación. Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas habitualmente en la tecnología de la formulación, por ejemplo, sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, espesantes, aglutinantes o fertilizantes.

65 Los métodos preferidos de aplicación de un ingrediente activo de la presente invención o una composición agroquímica de la presente invención que contiene al menos una de las proteínas específicas de insectos producidas por las cepas bacterianas de la presente invención son aplicación en las hojas, recubrimiento de semillas y aplicación en el sustrato. El número de aplicaciones y la velocidad de aplicación dependen de la intensidad de infestación por la plaga correspondiente.

De esta manera, la presente invención proporciona una composición entomocida que comprende como ingrediente activo al menos una de las nuevas proteínas específicas de insectos de acuerdo con la invención y/o un microorganismo recombinante que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante, pero especialmente una cepa de *Bacillus* spp recombinante, tal como *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante, o un derivado o mutante de la misma, junto con un adyuvante agrícola tal como un vehículo, diluyente, tensioactivo o adyuvante promotor de la aplicación. La composición también puede contener otro compuesto biológicamente activo. Dicho compuesto puede ser tanto un fertilizante o donador de micronutrientes como otra preparación que influya sobre el crecimiento de la planta. También puede ser un herbicida selectivo, insecticida, fungicida, bactericida, nematocida, molusquicida o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con vehículos aceptables desde el punto de vista agrícola, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación empleados habitualmente en la técnica de la formulación. Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas habitualmente en la tecnología de la formulación, por ejemplo, sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, espesantes, aglutinantes o fertilizantes.

La composición puede comprender de un 0,1 a un 99% en peso del ingrediente activo, de un 1 a un 99,9% en peso de un adyuvante sólido o líquido, y de un 0 a un 25% en peso de un tensioactivo. El ingrediente activo que comprende al menos una de las nuevas proteínas específicas de insecto de acuerdo con la invención o un microorganismo recombinante que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante, pero especialmente una cepa de *Bacillus* spp recombinante, tal como una cepa de *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis* que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante, un derivado o mutante de la misma, o la composición que contiene dicho ingrediente activo, puede administrarse a las plantas o cultivos a proteger junto con ciertos insecticidas o agentes químicos distintos (1993 Crop Protection Chemicals Reference, Chemical and Pharmaceutical Press, Canadá) sin perder potencia. Esto es compatible con la mayoría de los materiales de pulverización agrícolas usados comúnmente, pero no debe usarse en soluciones de pulverización extremadamente alcalinas. Puede administrarse como un polvo, suspensión, polvo humectable o cualquier otra forma de material adecuada para la aplicación agrícola.

La invención también proporciona métodos para controlar o inhibir plagas de insectos por medio de la aplicación de un ingrediente activo que comprende al menos una de las nuevas proteínas específicas de insectos de acuerdo con la invención o un microorganismo recombinante que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante o una composición que comprende dicho ingrediente activo en (a) un medio en el que puede existir la plaga de insectos, (b) una planta o parte de una planta para proteger dicha planta o parte de la planta de los daños producidos por una plaga de insectos o (c) semillas para proteger una planta que se desarrolla a partir de dichas semillas de los daños producidos por una plaga de insectos.

Un método de aplicación preferido en el área de la protección de plantas es la aplicación en el follaje de las plantas (aplicación foliar), dependiendo el número de aplicaciones y la velocidad de aplicación de la planta a proteger y del riesgo de infestación por la plaga en cuestión. Sin embargo, el ingrediente activo también puede penetrar en las plantas a través de las raíces (acción sistémica) si el *locus* de las plantas se impregna con una formulación líquida o si el ingrediente activo se incorpora en forma sólida en el *locus* de las plantas, por ejemplo en el sustrato, por ejemplo en forma granulada (aplicación en el sustrato). En arrozales, tales gránulos pueden aplicarse en cantidades medidas en el campo de arroz inundado.

Las composiciones de acuerdo con la invención también son adecuadas para proteger un material de propagación de plantas, por ejemplo semillas, tales como frutos, tubérculos o granos, o esquejes de plantas, frente a las plagas de insectos. El material de propagación puede tratarse con la formulación antes de la plantación: las semillas, por ejemplo, pueden recubrirse antes de sembrarse. El ingrediente activo de la invención también puede aplicarse a granos (recubrimiento) impregnando los granos con una formulación líquida o recubriéndolos con una formulación sólida. La formulación también puede aplicarse en el sitio de plantación cuando el material de propagación se está plantando, por ejemplo, en los surcos de siembra durante la siembra. La invención también se refiere a los métodos de tratamiento de un material de propagación de plantas y al material de propagación de plantas tratados de esta manera.

Las composiciones de acuerdo con la invención que comprenden como ingrediente activo un microorganismo recombinante que contiene al menos uno de los nuevos genes de toxina en forma recombinante, pero especialmente una cepa de *Bacillus spp* recombinante tal como una cepa de *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis* que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante, o un derivado mutante de la misma, pueden aplicarse en cualquier método conocido para el tratamiento de semillas o de sustratos con cepas bacterianas. Por ejemplo, véase la Patente de Estados Unidos N° 4.863.866. Las cepas son eficaces para el biocontrol aunque el microorganismo no esté vivo. Sin embargo, se prefiere la aplicación del microorganismo vivo.

Los cultivos diana a proteger dentro del alcance de la presente invención comprenden, por ejemplo, las siguientes especies de plantas:

cereales (trigo, cebada, centeno, avena, arroz, sorgo y cultivos relacionados), remolacha (remolacha azucarera y remolacha forrajera), hierba para forraje (dátilo apelotonado, cañuela y similares), frutos de hueso, frutos pomáceos y frutos blandos (manzanas, peras, ciruelas, melocotones, almendras, cerezas, fresas, frambuesas y moras), plantas leguminosas (judías, lentejas, guisantes, soja), plantas para la obtención de aceite (colza, mostaza, adormidera, aceitunas, girasol, coco, ricino, cacao, cacahuètes), cucurbitáceas (calabazas, pepinos, melones), plantas para la obtención de fibras (algodón, lino, cáñamo, yute), frutos cítricos (naranjas, limones, pomelos, mandarinas), hortalizas (espinacas, lechugas, espárragos, coles y otras brassicáceas, cebollas, tomates, patatas, pimientos), plantas lauráceas (aguacate, zanahoria, canela, alcanforero), árboles de hoja caduca y coníferas (por ejemplo, tilos, tejos, robles, alisos, chopos, abedules, abetos, alerce, pinos), o plantas tales como maíz, tabaco, nueces, café, caña de azúcar, té, vides, lúpulo, plátanos y plantas de caucho natural, así como plantas ornamentales (incluyendo las compuestas).

Una cepa de *Bacillus spp* recombinante, tal como una cepa *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis*, que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante, normalmente se aplica en forma de composiciones entomocidas y puede aplicarse en el área de cultivo o la planta a tratar, simultáneamente o en sucesión, con compuestos biológicamente activos adicionales. Estos compuestos pueden ser tanto fertilizantes como donadores de micronutrientes u otras preparaciones que influyen sobre el crecimiento de las plantas. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea junto con otros vehículos, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación empleados habitualmente en la técnica de la formulación.

El ingrediente activo de acuerdo con la invención puede usarse en forma no modificada o junto con cualquier vehículo aceptable desde el punto de vista agrícola que sea adecuado. Tales vehículos son adyuvantes empleados convencionalmente en la técnica de la formulación agrícola y, por lo tanto, se formulan de una manera conocida en concentrados emulsionables, pastas recubribles, soluciones pulverizables directamente o diluibles, emulsiones diluidas, polvos humectables, polvos solubles, polvo fino, granulados y también encapsulaciones, por ejemplo, en substancias poliméricas. Al igual que la naturaleza de las composiciones, los métodos de aplicación, tales como pulverización, atomización, espolvoreo, dispersión o vertido, se eligen de acuerdo con el objetivo deseado y las circunstancias prevalentes. Las proporciones de aplicación ventajosas normalmente son de aproximadamente 50 g a aproximadamente 5 kg de ingrediente activo (a.i.) por hectárea ("ha", aproximadamente 2.471 acres), preferiblemente de aproximadamente 100 g a aproximadamente 2 kg a.i./ha. Son proporciones de aplicación importantes de aproximadamente 200 g a aproximadamente 1 kg a.i./ha y de 200 g a 500 g a.i./ha.

En el caso de semillas recubiertas, son proporciones de aplicación ventajosas de 0,5 g a 1000 g a.i. por 100 kg de semillas, preferiblemente de 3 g a 100 g a.i. por 100 kg de semillas o de 10 g a 50 g a.i. por 100 kg de semilla.

Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas habitualmente en la tecnología de la formulación, por ejemplo, substancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, espesantes, aglutinantes o fertilizantes. Las formulaciones, es decir, las composiciones entomocidas, preparaciones o mezclas que contienen la cepa de *Bacillus spp* recombinante, tales como cepas de *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis* que contienen al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante como ingrediente activo o combinaciones de las mismas con otros ingredientes activos y, cuando sea apropiado, un adyuvante sólido líquido, se preparan de una manera conocida, por ejemplo, mezclando homogéneamente y/o triturando los ingredientes activos con diluyentes, por ejemplo, disolventes, vehículos sólidos y, en algunos casos, compuestos con actividad superficial (tensioactivos).

Son disolventes adecuados: hidrocarburos aromáticos, preferiblemente las fracciones que contienen de 8 a 12 átomos de carbono, por ejemplos, mezclas de xileno o naftalenos sustituidos, ftalatos tales como ftalato de dibutilo o ftalato de dioctilo, hidrocarburos alifáticos tales como ciclohexano o parafinas, alcoholes y glicoles y sus éteres y ésteres, tales como etanol, etilenglicol monometil o monoetil éter, cetonas tales como ciclohexanona, disolventes fuertemente polares tales como N-metil-2-pirrolidona, dimetilsulfóxido o dimetilformamida, así como aceites vegetales o aceites vegetales epoxidados tales como aceite de coco epoxidado o aceite de soja; o agua.

Los vehículos sólidos usados, por ejemplo, para polvos finos y polvos dispersables, normalmente son cargas minerales naturales tales como calcita, talco, caolín, montmorillonita o attapulgita. Para mejorar las propiedades físicas también puede añadirse ácido silícico muy disperso o polímeros absorbentes muy dispersos. Los vehículos granulares adsorbentes son de tipo poroso, por ejemplo piedra pómez, ladrillo triturado, sepiolita o bentonita; y los vehículos no adsorbentes adecuados son materiales tales como calcita o arena. También puede usarse un gran número de materiales pregranulados de naturaleza orgánica o inorgánica, por ejemplo, especialmente dolomita o residuos vegetales triturados.

Los compuestos tensioactivos adecuados son, dependiendo de la naturaleza de los ingredientes activos a formular, tensioactivos no iónicos, catiónicos y/o aniónicos con buenas propiedades de emulsión, dispersión y humectación. También se entenderá que el término "tensioactivos" comprende mezclas de tensioactivos. Los tensioactivos aniónicos adecuados pueden ser jabones solubles en agua y compuestos tensioactivos sintéticos solubles en agua. Son jabones adecuados las sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o sales de amonio sustituido o no sustituido

de ácidos grasos superiores (con 10 a 22 átomos de carbono), por ejemplo, las sales de sodio o potasio del ácido oleico o esteárico, o de mezclas de ácidos grasos naturales que pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de aceite de coco o de sebo. Otros tensioactivos adecuados también son las sales de metiltaurina de ácidos grasos así como fosfolípidos modificados y no modificados.

5

Sin embargo, con más frecuencia se usan los tensioactivos denominados sintéticos, especialmente sulfonatos grasos, sulfatos grasos, derivados de bencimidazol sulfonado o alquilarilsulfonatos. Los sulfonatos o sulfatos grasos normalmente están en forma de sales de metales alcalinos, sales de metales alcalinotérreos o sales de amonio sustituido o no sustituido, y generalmente contienen un radical alquilo de 8 a 22 átomos de carbono que también incluye el resto alquilo de radicales acilo, por ejemplo, la sal de sodio o calcio del ácido lignosulfónico, de dodecilsulfato, o de una mezcla de sulfatos de alcohol graso obtenido a partir de ácidos grasos naturales. Estos compuestos también comprenden las sales de ésteres de ácido sulfúrico y ácidos sulfónicos de aductos de alcohol graso/óxido de etileno. Los derivados de bencimidazol sulfonados preferiblemente contienen dos grupos de ácido sulfónico y un radical de ácido graso que contiene de aproximadamente 8 a 22 átomos de carbono. Son ejemplos de alquilarilsulfonatos las sales de sodio, calcio o trietanolamina del ácido dodecibenceno sulfónico, el ácido dibutilnaftaleno sulfónico, o de un producto de condensación de ácido naftalenosulfónico/formaldehído. También son adecuados los correspondientes fosfatos, por ejemplo sales del éster del ácido fosfórico de un aducto de p-nonilfenol con 4 a 14 moles de óxido de etileno.

10

15

20

Son tensioactivos no iónicos, preferiblemente, derivados de poliglicol éter de alcoholes alifáticos o cicloalifáticos, o ácidos grasos saturados o insaturados y alquilfenoles, conteniendo dichos derivados de 3 a 30 grupos de glicol éter y de 8 a 20 átomos de carbono en el resto de hidrocarburo (alifático) y de 6 a 18 átomos de carbono en el resto alquilo de los alquilfenoles.

25

Son otros tensioactivos no iónicos adecuados, los aductos solubles en agua de óxido de polietileno con polipropilenglicol, etilendiaminopolipropilenglicol y alquilpolipropilenglicol que contiene de 1 a 10 átomos de carbono en la cadena alquilo, conteniendo dicho aductos de 20 a 250 grupos de etilenglicol éter y de 10 a 100 grupos de propilenglicol éter. Estos compuestos normalmente contienen de 1 a 5 unidades de etilenglicol por unidad de propilenglicol. Son ejemplos representativos de tensioactivos no iónicos nonilfenolpolietoxietanoles, poliglicol éteres de aceite de ricino, aductos de óxido de polipropileno/polietileno, tributilfenoxipolietoxietanol, polietilenglicol y octilfenoxipolietoxietanol. También son tensioactivos no iónicos adecuados ésteres de ácidos grasos de polioxietileno sorbitán, tales como trioleato de polioxietileno sorbitán.

30

35

Los tensioactivos catiónicos son preferiblemente sales de amonio cuaternario que contienen, como substituyente en N, al menos un radical alquilo que tiene de 8 a 22 átomos de carbono y, como substituyentes adicionales, radicales alquilo, bencilo o hidroxialquilo inferior no substituidos o halogenados. Las sales preferiblemente están en forma de haluros, metilsulfatos o etilsulfatos, por ejemplo, cloruro de esteariltrimetilamonio o bromuro de bencil-di-(2-cloroetil)etilamonio.

40

Los tensioactivos empleados habitualmente en la técnica de la formulación se describen, por ejemplo, en "McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual", MC Publishing Corp. Ridgewood, N.J., 1979; Dr. Helmut Stache, "Tensid Taschenbuch" (Handbook of Surfactants), Carl Hanser Verlag, MunichNienna.

45

Otra característica particularmente preferida de una composición entomocida de la presente invención es la persistencia del ingrediente activo cuando se aplica a las plantas y al sustrato. Las posibles causas de pérdida de actividad incluyen inactivación por luz ultravioleta, calor, exudados de hoja y pH. Por ejemplo, a alto pH, particularmente en presencia de un reductor, se solubilizan los cristales de  $\delta$ -endotoxina y, de esta forma, se vuelven más accesibles a la inactivación proteolítica. El alto pH de las hojas también podría ser importante, particularmente cuando la superficie de la hoja puede estar en el intervalo de pH 8-10. La formulación de una composición entomocida de la presente invención puede solucionar estos problemas por medio de la inclusión de aditivos para ayudar a prevenir la pérdida del ingrediente activo o la encapsulación del material de tal manera que el ingrediente activo quede protegido de la inactivación. La encapsulación puede realizarse químicamente (McGuire y Shasha, J Econ Entomol 85: 1425-1433, 1992) o biológicamente (Barnes y Cummings, 1986; documento EP-A 0 192 319). La encapsulación química implica un proceso en el que el ingrediente activo se recubre con un polímero mientras que la encapsulación biológica implica la expresión de los genes de  $\delta$ -endotoxina en un microbio. Para la encapsulación biológica, el microbio intacto que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante se usa como ingrediente activo en la formulación. Además, los protectores UV podrían reducir eficazmente las lesiones por irradiación. La inactivación debida al calor también podría controlarse incluyendo un aditivo apropiado.

50

55

60

Dentro de la presente solicitud se prefieren formulaciones que comprenden microorganismos vivos como ingrediente activo, en forma de la célula vegetativa o, más preferiblemente, en forma de esporas, si están disponibles. Las formulaciones adecuadas pueden constar, por ejemplo, de geles de polímero que están reticulados con cationes polivalentes y comprenden estos microorganismos. Esto se describe, por ejemplo, por D.R. Fravel *et al.*, en *Phytopathology*, Vol. 75, N° 7.774-777, 1985 para el alginato como material polimérico. Por esta publicación también se sabe que pueden usarse conjuntamente materiales de vehículo. Por regla general, estas formulaciones se preparan mezclando soluciones de polímeros formadores de gel sintéticos o naturales, por ejemplo, alginatos, y soluciones acuosas de sales de iones metálicos polivalentes, por ejemplo en forma de gotitas individuales, siendo posible que el microorganismo

65

## ES 2 213 162 T3

esté suspendido en una o en las dos soluciones de reacción. La formación del gel empieza con la mezcla en forma de gotas. Estas partículas de gel pueden secarse posteriormente. Este proceso se denomina gelificación ionotrópica. Dependiendo del grado de secado, se forman partículas compactas y duras de polímeros que están estructuralmente reticulados a través de cationes polivalentes y comprenden los microorganismos y un vehículo presente distribuido de forma predominantemente uniforme. El tamaño de las partículas puede ser de hasta 5 mm.

En el documento EP-A 1-0 097 517 se describen composiciones basadas en polisacáridos parcialmente reticulados que, además de un microorganismos, por ejemplo, también pueden comprender ácido silícico finamente dividido como material de vehículo, teniendo lugar la reticulación, por ejemplo, a través de iones de Ca<sup>++</sup>. Las composiciones tienen una actividad acuosa no mayor que 0,3. W.J. Cornick *et al.* describen en un artículo de revisión [New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases, páginas 345-372, Alan R. Liss, Inc. (1990)] diversos sistemas de formulación, gránulos con vermiculita como vehículo y perlas de alginato compactas preparadas por el proceso de gelificación ionotrópico mencionado. Tales composiciones también se describen por D.R. Fravel en Pesticide Formulations and Application Systems: 11th Volume, ASTM STP 1112 American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 1992, páginas de 173 a 179 y pueden usarse para formular los microorganismos recombinantes de acuerdo con la invención.

Las composiciones entomocidas de la invención normalmente contienen de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 99%, preferiblemente de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 95%, y aún más preferiblemente de aproximadamente un 3 a aproximadamente un 90% del ingrediente activo, de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99,9%, preferiblemente de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 99%, y aún más preferiblemente de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 95% de un adyuvante sólido o líquido, y de aproximadamente un 0 a aproximadamente un 25%, preferiblemente, de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 25%, y aún más preferiblemente de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 20% de un tensioactivo.

En una realización preferida de la invención, las composiciones entomocidas normalmente contienen de un 0,1 a un 99%, preferiblemente de un 0,1 a un 95% de una cepa de *Bacillus spp* recombinante, tal como una cepa de *Bacillus cereus* o *Bacillus thuringiensis* que contiene al menos una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica las nuevas proteínas específicas de insectos en forma recombinante, o una combinación de la misma con otros ingredientes activos, de 1 a un 99,9% de un adyuvante sólido o líquido, y de un 0 a un 25%, preferiblemente de un 0,1 a un 20% de un tensioactivo.

Aunque los productos comerciales preferiblemente se formulan como concentrados, el usuario final normalmente empleará formulaciones diluidas de una concentración substancialmente menor. Las composiciones entomocidas también pueden contener otros ingredientes tales como estabilizantes, antiespumantes, reguladores de la viscosidad, aglutinantes, espesantes así como fertilizantes u otros ingredientes activos, para obtener efectos especiales.

Habiéndose descrito de forma general la invención, la misma se entenderá por referencia a los siguientes ejemplos detallados que se proporcionan con fines ilustrativos y no deben considerarse limitantes de la invención a menos que se especifique.

Se ha creado una nomenclatura convencional basándose en la identidad de la secuencia de las proteínas incluidas en la presente invención. A continuación se muestran los nombres de los genes y proteínas para los ejemplos detallados que se presentan a continuación y su relación con los nombres usados en la solicitud parental [solicitud de patente de Estados Unidos con el n° de serie 314594/08].

<i>Nombre del Gen/Proteína según la Nomenclatura Convencional</i>	<i>Nombre del Gen/Proteína en la Solicitud Parental</i>	<i>Descripción de Proteína</i>
VIP3A(a)	--	VIP de la cepa AB88 como se describe en SEC ID N°: 1 de la presente solicitud
VIP3A(b)	--	VIP de cepa AB424 como se describe en SEC ID N°: 4 de la presente solicitud



## Sección experimental

### Ejemplos de formulación

5 El ingrediente activo usado en los siguientes ejemplos de formulación son *Bacillus cereus* cepa AB78 que tiene el N° de Acceso NRRL B-21058; las cepas de *Bacillus thuringiensis* que tiene los N° de Acceso NRRL B-21060, NRRL B-21224, NRRL B-21225, NRRL B-21226, NRRL B-21227 y NRRL B-21439; y las cepas de *Bacillus spp* que tienen los N° de Acceso NRRL B-21228, NRRL B-21229 y NRRL B-21230. Todas las cepas mencionadas son  
10 aislados naturales que comprenden las proteínas específicas de insectos de acuerdo con la invención.

Como alternativa, se usan las proteínas específicas de insectos aisladas como ingrediente activo solo o en combinación con las cepas de *Bacillus* mencionadas anteriormente.

15

A1. Polvos humectables			
	a)	b)	c)
esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	25%	50%	75%
lignosulfonato sódico	5%	5%	--
laurilsulfato sódico	3%	--	5%
diisobutilnaftalenosulfonato sódico	--	6%	10%
octilfenol polietilenglicol éter (7-8 moles de óxido de etileno)	--	2%	--
25 ácido silícico muy disperso	5%	10%	10%
caolín	62%	27%	--

30 Las esporas se mezclan minuciosamente con los adyuvantes y la mezcla se tritura minuciosamente en un molino adecuado, produciendo polvos humectables que pueden diluirse con agua para proporcionar suspensiones de las concentraciones deseadas.

35

A2. Concentrado emulsionable	
esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10%
octilfenol polietilenglicol éter (4-5 moles de óxido de etileno)	3%
40 dodecibencenosulfonato cálcico	3%
poliglicol éter de aceite de ricino (36 moles de óxido de etileno)	4%
ciclohexanona	30%
45 mezcla de xileno	50%

Pueden obtenerse emulsiones de cualquier concentración requerida a partir de este concentrado por dilución con agua.

50

A3. Polvo		
	a)	b)
esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	5%	8%
55 talco	95%	--
caolín	--	92%

60 Se obtienen polvos listos para el uso mezclando el ingrediente activo con los vehículos y triturando la mezcla en un molino adecuado.

65

## ES 2 213 162 T3

A4. Granulado de Extrusor	
Esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	10%
lignosulfonato sódico	2%
carboximetilcelulosa	1%
caolín	87%

El ingrediente activo o la combinación se mezcla y se tritura con los adyuvantes y la mezcla posteriormente se humedece con agua. La mezcla se extruye, se granula y se seca en una corriente de aire.

A5. Gránulo Recubierto	
esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	3%
polietilenglicol (peso mol. 200)	3%
caolín	94%

El ingrediente activo o la combinación se aplica uniformemente en un mezclador al caolín humedecido con polietilenglicol. De esta manera, se obtienen granulados recubiertos que no desprenden polvo.

A6. Concentrado de Suspensión	
esporas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40%
etilenglicol	10%
nonilfenol polietilenglicol éter (15 moles de óxido de etileno)	6%
lignosulfonato sódico	10%
carboximetilcelulosa	1%
solución acuosa de formaldehído al 37%	0,2%
aceite de silicona en forma de una solución acuosa al 75%	0,8%
agua	32%

El ingrediente activo o la combinación se mezclan íntimamente con los adyuvantes proporcionando un concentrado de suspensión a partir del cual pueden obtenerse suspensiones de cualquier concentración deseada por dilución con agua.

### Ejemplo 1

#### *Cultivo bacteriano*

Se usó un subcultivo de la cepa AB78 de Bc para inocular el siguiente medio, conocido como caldo TB:

Triptona	12 g/l
Extracto de lavadura	24 g/l
Glicerol	4 ml/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,1 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,7 g/l
pH 7,4	

El fosfato potásico se añadió al caldo esterilizado en autoclave después de la refrigeración. Los matraces se incubaron a 30°C en un agitador rotatorio a 250 rpm durante 24 h-36 h, lo que representa desde las primeras etapas hasta las etapas intermedias de la fase de crecimiento logarítmica.

El procedimiento anterior puede aumentarse fácilmente a escala a fermentadores mayores por procedimientos bien conocidos en la técnica.

## ES 2 213 162 T3

Durante el crecimiento vegetativo, normalmente 24-36 horas después de iniciar el cultivo, que representa desde las primeras etapas hasta las etapas intermedias de la fase de crecimiento logarítmica, se centrifugaron bacterias AB78 del sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo que contenía la proteína activa se usó en bioensayos.

### 5 Ejemplo 2

#### *Bioensayos en insectos*

Se ensayó la cepa AB78 de *B. cereus* contra diversos insectos como se describe más adelante.

10

Gusano de la raíces del maíz del oeste, del norte y del sur, *Diabrotica virgifera virgifera*, *D. longicornis barberi* y *D. undecimpunctata howardi*, respectivamente: se realizaron diluciones del sobrenadante de cultivo de AB78 cultivado durante 24-36 horas, se mezclaron con dieta artificial fundida (Marrone *et al.* (1985), *J. of Economic Entomology* 78:290-293) y se dejaron solidificar. La dieta solidificada se cortó y se puso en placas. Se pusieron larvas recién nacidas en la dieta y se mantuvieron a 30°C. Después de 6 días se registró la mortalidad.

15

*Bioensayo en clones de E. coli*: se cultivaron células *E. coli* durante una noche en caldo que contenía 100 µg/ml de ampicilina a 37°C. Se sonicaron diez ml de cultivo tres veces durante 20 segundos cada vez. Se añadieron 500 µl de cultivo sonificado a dieta fundida de gusano de las raíces del maíz del oeste.

20

Escarabajo de la patata de Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*: se realizaron diluciones en Triton X-100 (para proporcionar una concentración final de TX-100 del 0,1%) del sobrenadante de cultivo de AB78 cultivado durante 24-36 horas. Se sumergieron piezas de hojas de patata de cinco cm<sup>2</sup> en estas diluciones, se secaron al aire y se pusieron en un papel de filtro humedecido en placas de plástico. Se pusieron larvas recién nacidas en las piezas de hoja y se mantuvieron a 30°C. Se registró la mortalidad después de 3-5 días.

25

Gorgojo amarillo de la harina, *Tenebrio molitor*. Se realizaron diluciones de sobrenadante de cultivo de AB78 cultivado durante 24-36 horas, se mezclaron con dieta artificial fundida (Bioserv nº F9240) y se dejaron solidificar. La dieta solidificada se cortó y se puso en placas de plástico. Se pusieron larvas recién nacidas sobre la dieta y se mantuvieron a 30°C. Se registró la mortalidad después de 6-8 días.

30

Perforador europeo del maíz, gusano cortador negro, gusano de los brotes del tabaco, gusano cornudo del tabaco y gusano soldado de la remolacha; *Ostrinia nubilalis*, *Agrotis ipsilon*, *Heliothis virescens*, *Manduca sexta* y *Spodoptera exigua*, respectivamente: se realizaron diluciones en TX-100 (para proporcionar una concentración final de TX-100 del 0,1%) del sobrenadante de cultivo de AB78 cultivado durante 24-36 horas. Se pusieron 100 µl con una pipeta en la superficie de 18 cm<sup>2</sup> de una dieta artificial solidificada (Bioserv nº F9240) y ésta se dejó secar al aire. Después se pusieron larvas recién nacidas sobre la superficie de la dieta y se mantuvieron a 30°C. Se registró la mortalidad después de 3-6 días.

35

Mosquito doméstico del norte: *Culex pipiens*: se realizaron diluciones del sobrenadante de cultivo de AB78 cultivado durante 24-36 horas. Se pusieron 100 µl con una pipeta en 10 ml de agua en un recipiente de plástico de 30 ml. Se añadieron larvas en la tercera fase larvaria al agua y se mantuvieron a temperatura ambiente. Se registró la mortalidad después de 24-48 horas. En la tabla 14 se proporciona el espectro de actividad entomocida de AB78.

40

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

# ES 2 213 162 T3

TABLA 14

Actividad de sobrenadantes de cultivo de AB78 contra diversas especies de insectos		
Especies de insectos ensayadas hasta la fecha	Orden	Actividad
Gusano de las raíces del maíz del oeste ( <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> )	Col	+++
Gusano de las raíces del maíz del norte ( <i>Diabrotica longicornis barberi</i> )	Col	+++
Gusano de las raíces del maíz del sur ( <i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i> )	Col	-
Escarabajo de la patata de Colorado ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> )	Col	-
Gorgojo amarillo de la harina ( <i>Tenebrio molitor</i> )	Col	-
Perforador europeo del maíz ( <i>Ostrinia nubilalis</i> )	Lep	-
Gusano de los brotes del tabaco ( <i>Heliothis virescens</i> )	Lep	-
Gusano cornudo del tabaco ( <i>Manduca sexta</i> )	Lep	-
gusano soldado de la remolacha ( <i>Spodoptera exigua</i> )	Lep	-
gusano cortador negro ( <i>Agrotis ipsilon</i> )	Lep	-
Mosquito doméstico del norte ( <i>Culex pipiens</i> )	Dip	-

La cepa AB78 de *B. cereus* recién descubierta mostró un espectro significativamente diferente de actividad insecticida en comparación con  $\delta$ -endotoxinas activas de coleópteros conocidas procedentes de Bt. En particular, AB78 mostró una actividad más selectiva contra escarabajos que las cepas Bt activas contra coleópteros conocidas, ya que fue específicamente activa contra *Diabrotica spp.* Más específicamente, fue la más activa contra *D. virgifera virgifera* y *D. longicornis barberi* pero no contra *D. undecimpunctata howardi*.

Se bioensayaron varias cepas de *Bacillus* para comprobar la actividad durante el crecimiento vegetativo (tabla 15) contra el gusano de las raíces del maíz del oeste. Los resultados demuestran que AB78 es única, ya que la actividad contra el gusano de las raíces del maíz del oeste no es un fenómeno general.

ES 2 213 162 T3

TABLA 15

Actividad de sobrenadantes de cultivo de diversas especies de <i>Bacillus</i> contra el gusano de las raíces del maíz del oeste	
Cepa de <i>Bacillus</i>	Porcentaje de mortalidad WCRW
<i>B. cereus</i> (Bat. 1)	100
<i>B. cereus</i> (Bat. 2)	100
<i>B. cereus</i> (Carolina Bio.)	12
<i>B. cereus</i> ATCC 11950	12
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	8
<i>B. mycoides</i> (Carolina Bio.)	30
<i>B. popilliae</i>	28
<i>B. thuringiensis</i> HD135	41
<i>B. thuringiensis</i> HD191	9
<i>B. thuringiensis</i> GC91	4
<i>B. thuringiensis isrealensis</i>	24
Control de Agua	4

En la tabla 16 se proporciona la actividad específica de AB78 contra el gusano de las raíces del maíz del oeste.

TABLA 16

Actividad del sobrenadante de cultivo de AB78 contra el gusano de las raíces del maíz del oeste recién nacido	
Concentración de sobrenadante de cultivo ( $\mu$ l/ml)	Porcentaje de mortalidad WCRW
100	100
25	87
10	80
5	40
2,5	20
1	6
0	0

Se calculó una  $LC_{50}$  de 6,2  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo por ml de dieta de gusano de las raíces del maíz del oeste.

El sedimento celular también se bioensayó y no tuvo actividad contra WCRW. De esta manera, la presencia de actividad sólo en el sobrenadante indica que esta VIP es una exotoxina.

Ejemplo 3

*Clonación de cósmidos de ADN total procedente de la cepa AB78 de B. Cereus*

Se clonó el gen VIP1(a) procedente de ADN total preparado a partir de la cepa AB78 como se indica a continuación:

*El aislamiento del ADN de AB78 se realizó como se indica a continuación:*

1. Se cultivaron las bacterias en 10 ml de caldo L durante una noche. (Se usó un tubo de centrifuga estéril de 50 ml).

## ES 2 213 162 T3

2. Se añadieron 25 ml de caldo L nuevo y ampicilina (30  $\mu\text{g/ml}$ ).

3. Se cultivaron las células durante 2-6 horas a 30°C con agitación.

5 4. Se centrifugaron las células en un tubo de polipropileno de 50 ml con tapa naranja en una centrífuga clínica de sobremesa IEC a una velocidad de 3/4.

10 5. El sedimento celular se resuspendió en 10 ml de TES (TES = TRIS 50 mM pH 8,0, EDTA 100 mM, NaCl 15 mM).

6. Se añadieron 30 mg de lisozima y la mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C.

7. Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de SDS al 20% y 400  $\mu\text{l}$  de solución madre de proteinasa K (20 mg/ml). Se incubó a 37°C.

15 8. Se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de proteinasa K nueva. Se incubó durante 1 hora a 55°C. Se añadieron 5 ml de TES para obtener un volumen final de 15 ml.

20 9. Se extrajo con fenol dos veces (100 ml de fenol, centrifugación a temperatura ambiente a una velocidad 3/4 en una centrífuga clínica de sobremesa IEC). El sobrenadante (fase superior) se transfirió a un tubo limpio usando una pipeta de calibre ancho.

10. Se extrajo una vez con 1:1 vol. de fenol:cloroformo/alcohol isoamílico (relación 24:1).

25 11. Se precipitó el ADN con un volumen igual de isopropanol frío; se centrifugó para sedimentar el ADN.

12. El sedimento se resuspendió en 5 ml de TE.

30 13. El ADN se precipitó con 0,5 ml de NaOAc 3 M pH 5,2 y 11 ml de etanol al 95%. Se puso a -20°C durante 2 horas.

14. Se recogió el ADN de “gancho” del tubo con un asa de plástico, se transfirió a un tubo de microcentrífuga, se centrifugó, se retiró el exceso de etanol con una pipeta, y se secó al vacío.

35 15. Se resuspendió en 0,5 ml de TE. Se incubó durante 90 minutos a 65°C para ayudar a mantener el ADN en solución.

16. Se determinó la concentración usando procedimientos convencionales.

### 40 *Clonación de cósmidos de AB78*

Todos los procedimientos, a menos que se indique otra cosa, se realizaron de acuerdo con el protocolo de Stratagene, Superoos 1 Instruction Manual, N° de cat. 251301.

45 En general, las etapas fueron las siguientes:

A. Digestión parcial con Sau 3A del ADN de AB78.

B. Preparación del ADN del vector.

50 C. Unión y empaquetamiento del ADN

D. Titulación de la biblioteca de cósmidos

55 1. Iniciar un cultivo de células HB101 poniendo 50 ml de un cultivo de una noche en 5 ml de TB con maltosa al 0,2%. Incubar durante 3,5 horas a 37°C.

2. Centrifugar las células y resuspenderlas en 0,5 ml de  $\text{MgSO}_4$  10 mM.

60 3. Añadir conjuntamente:

100  $\mu\text{l}$  células

100  $\mu\text{l}$  mezcla de empaquetamiento diluida

65 100  $\mu\text{l}$  10 mM  $\text{MgSO}_4$

30  $\mu\text{l}$  TB

## ES 2 213 162 T3

4. Adsorber a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitación.
5. Añadir 1 ml de TB y mezclar suavemente. Incubar durante 30 minutos a 37°C.
6. Cultivar 200 l en placas de L-amp. Incubar a 37°C durante una noche.

Se seleccionaron aleatoriamente al menos 400 clones de cósmidos y se analizó su actividad contra el gusano de las raíces del maíz del oeste como se describe en el ejemplo 2. En hibridaciones de Southern se usó el ADN de 5 clones activos y de 5 clones no activos. Los resultados demostraron que la hibridación obtenida usando la sonda oligonucleotídica descrita anteriormente se correlacionaba con la actividad del gusano de las raíces del maíz del oeste (tabla 18).

Los clones cosmidicos P3-12 y P5-4 se han depositado en el Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL) y se les ha concedido los números de acceso NRRL B-21061 y NRRL B-21059 respectivamente.

TABLA 18

<b>Actividad de clones cosmidicos de AB78 contra el gusano de las raíces del maíz del oeste</b>	
Clon	Porcentaje medio de mortalidad (N=4)
<b>Clones que hibridan con la sonda</b>	
P1-73	47
P1-83	64
P2-2	69
P3-12	85
P5-4	97
<b>Clones que no hibridan con la sonda</b>	
P1-2	5
P3-8	4
P3-9	12
P3-18	0
P4-6	9

### Ejemplo 4

#### *Purificación de VIP a partir de la cepa AB88*

Se realizaron cultivos líquidos bacterianos durante una noche [durante 12 horas] a 30°C en medio TB. Las células se centrifugaron a 5000 x g durante 20 minutos y se retuvo el sobrenadante. Las proteínas presentes en el sobrenadante se precipitaron con sulfato amónico (saturación del 70%), se centrifugaron [a 500 x g durante 15 minutos] y se retuvo el sedimento. El sedimento se resuspendió en el volumen original de Tris 20 mM pH 7,5 y se dializó durante una noche frente al mismo tampón a 4°C. El dializado de AB88 era más turbio que el material comparable procedente de AB78. El dializado se valoró a pH 4,5 usando citrato sódico 20 mM (pH 2,5) y, después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la solución se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. El sedimento de proteínas se redisolvió en Bis-Tris-Propano 20 mM pH 9,0.

Las proteínas de AB88 se han separado por varios métodos diferentes después de la clarificación incluyendo enfoque isoelectrico (Rotofor, BioRad, Hercules, CA), precipitación a pH 4,5, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular y ultrafiltración.

Las proteínas se separaron en una columna de intercambio aniónico Poros HQ/N (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA) usando un gradiente lineal de NaCl de 0 a 500 mM en Bis-Tris-Propano 20 mM pH 9,0 a un caudal de 4 ml/min. La proteína insecticida se eluyó a NaCl 250 mM.

La proteína activa contra el perforador europeo del maíz (ECB) permanecía en el sedimento obtenido por precipitación del dializado a pH 4,5. Cuando se realizó un IEF preparativo sobre el dializado usando anfólitos de pH 3-10, se encontró actividad insecticida contra ECB en todas las fracciones con un pH de 7 o mayor. El análisis de SDS-PAGE de estas fracciones mostró bandas proteicas de peso molecular ~60 kDa y ~80 kDa. Las bandas de 60 kDa y 80 kDa se separaron por HPLC de intercambio aniónico en una columna Poros-Q (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA). Se obtuvo la secuencia N-terminal a partir de dos fracciones que contenían proteínas de peso molecular ligeramente

## ES 2 213 162 T3

diferente, pero ambas de un tamaño de aproximadamente 60 kDa. Las secuencias obtenidas eran similares entre sí y a algunas  $\delta$ -endotoxinas.

5 Cuando el sedimento activo contra ECB a pH 4,5 se separó adicionalmente por intercambio aniónico en una columna Poros-Q, se encontró actividad sólo en las fracciones que contenían una banda principal de ~60 kDa.

10 La proteína activa para el gusano cortador negro también permanecía en el sedimento cuando el dializado de AB88 se llevó a pH 4,5. En el IEF preparativo usando anfólitos de pH 3-10, no se encontró actividad en las fracciones de IEF activas para ECB; en cambio, la actividad fue la máxima en una fracción de pH 4,5-5,0. Sus componentes principales tienen pesos moleculares de ~75 y ~80 kDa.

El sedimento de pH 4,5 se separó por HPLC de intercambio aniónico para producir fracciones que contenían sólo el material de 35 kDa y fracciones que contenían tanto la banda de 35 kDa como la banda de 80 kDa.

### 15 Ejemplo 5

#### *Caracterización de VIP de AB88*

20 Se generaron fracciones que contenían las diversas proteínas vegetativas activas contra lepidópteros como se describió en el ejemplo 4. Se separaron fracciones con actividad insecticida en geles de SDS-poliacrilamida del 8 al 16% y se transfirieron a membranas de PVDF [LeGendre *et al.*, (1989) en: A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, ed Matsudaria PT (Academic Press Inc, Nueva York)]. Los análisis biológicos de las fracciones demostraron que diferentes VIP eran responsables de las diferentes actividades contra especies de lepidópteros.

25 La actividad contra *Agrotis ipsilon* se debe a una proteína de 80 kDa y/o una proteína de 35 kDa, suministradas individualmente o en combinación. Estas proteínas no están relacionadas con ninguna  $\delta$ -endotoxina de Bt como se demuestra por la falta de homología de secuencias de  $\delta$ -endotoxina de Bt conocidas. La proteína insecticida vip3A(a) de la cepa AB88 está presente principalmente (al menos un 75% del total) en sobrenadantes de cultivos de AB88.

30 Además, estas proteínas no se encuentran en el cristal de  $\delta$ -endotoxina de AB88. Se compararon secuencias N-terminales de las proteínas  $\delta$ -endotoxinas principales con las secuencias N-terminales de las VIP de 80 kDa y 35 kDa y no revelaron homología de secuencias. La secuencia N-terminal de la proteína insecticida vip3A(a) posee varios restos cargados positivamente (de Asn2 a Asn7) seguidos de una región de núcleo hidrófoba (de Thr8 a Ile34). A diferencia de la mayoría de las proteínas de secreción conocidas, la proteína insecticida vip3A(a) de la cepa AB88 no se procesa N-terminalmente durante la exportación.

35 La actividad contra *Ostrinia nubilalis* se debe a una VIP de 60 kDa y la actividad contra *Spodoptera frugiperda* se debe a una VIP de tamaño desconocido.

40 La cepa AB88 de *Bacillus thuringiensis* se ha depositado en el Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA y se le ha concedido en número de acceso NRRL B-21225.

### 45 Ejemplo 6

#### *Aislamiento y actividad biológica de B. Thuringiensis AB424*

50 Se aisló una cepa de *B. thuringiensis*, denominada AB424, a partir de una muestra de piña de pino cubierta con musgo por métodos convencionales conocidos en la técnica. Se realizó un subcultivo de AB424 y se preparó para el bioensayo como se describe en el ejemplo 1.

La actividad biológica se evaluó como se describe en el ejemplo 2. Los resultados son los siguientes:

55

Especie de insecto ensayada	Porcentaje de mortalidad
<i>Ostrinia nubilalis</i>	100
<i>Agrotis ipsilon</i>	100
<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	0

60

65 La cepa AB424 se ha depositado en Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA, y se le ha concedido el n° de acceso NRRL B-21439.



## ES 2 213 162 T3

### Ejemplo 7

#### *Clonación de los genes VIP3A(a) y VIP3A(b) que codifican proteínas activas contra el gusano cortador negro*

5 Se aisló ADN total a partir de aislados AB88 y AB424 [Ausubel *et al* (1988), en: Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY)] y se digirió con las enzimas de restricción *XbaI* [biblioteca de fragmentos *XbaI* fraccionada por tamaños de 4,0 a 5,0 kb del ADN de AB88 de *B. thuringiensis*] y *EcoRI* [biblioteca de fragmentos *EcoRI* fraccionados por tamaños de 4,5 a 6,0 kb de ADN de AB424 de *B. thuringiensis*] respectivamente, se unió al vector pBluescript previamente linealizado con las mismas enzimas y desfosforilado, y se utilizó para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Los clones recombinantes se transfirieron a filtros de nitrocelulosa que posteriormente se sondearon con un oligonucleótido de 33 bases de longitud marcado con <sup>32</sup>P que correspondía a los 11 aminoácidos N-terminales de la proteína de 80 kDa activa contra *Agrotis ipsilon* (gusano cortador negro). La hibridación se realizó a 42°C en 2 x SSC/SDS al 0,1% (1 x SSC = NaCl 0,15 M/citrato sódico 0,015 M, pH 7,4) durante 5 minutos y dos veces a 50°C en 1 x SSC/SDS al 0,1% durante 10 minutos. Cuatro de 400 clones recombinantes fueron positivos. 15 Los bioensayos de insectos de los recombinantes positivos mostraron una toxicidad contra larvas del gusano cortador negro comparable a la de los sobrenadantes de AB88 o AB424.

El plásmido pCIB7104 contiene un fragmento *XbaI* de 4,5 kb de ADN de AB88. Se construyeron subclones para definir la región codificante de la proteína insecticida. 20

Se construyó *E. coli* pCIB7105 por clonación del fragmento *XbaI-AccI* de 3,5 kb de pCIB7104 en pBluescript.

El plásmido pCIB7106 contenía un fragmento *EcoRI* de 5,0 kb de ADN de AB424. Este fragmento se digirió adicionalmente con *HincII* para obtener un inserto *EcoRI-HincII* de 2,8 kb (pCIB7107), que aún codificaba una proteína insecticida funcional. 25

La secuencia de nucleótidos de pCIB7104, un clon recombinante positivo de AB88, y de pCIB7107, un clon recombinante positivo de AB424, se determinó por el método de terminación dideoxi de Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467 (1977), usando kits de secuenciación PRISM Ready Reaction Dye Deoxi Terminator Cycle y kits de secuenciación PRISM Sequenase<sup>®</sup> Terminator Double-Stranded ADN y se analizó en un secuenciador automático ABI 373. 30

El clon pCIB7104 contiene el gen VIP3A(a) cuya región codificante se describe en la SEC ID N°: 1 y la secuencia de la proteína codificada se describe en la SEC ID N°: 2. En la SEC ID N°: 3 se proporciona una versión sintética de la región codificante diseñada para conseguir una alta expresión en maíz. En la SEC ID N°: 6 se describe una fusión entre una secuencia sintética y una secuencia nativa. Puede diseñarse cualquier número de genes sintéticos basándose en la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID N°: 2. 35

El clon pCIB7107 contiene el gen VIP3A(b) cuya región codificante se describe en la SEC ID N°: 4 y la proteína codificada se describe en la SEC ID N°: 5. Tanto pCIB7104 como pCIB7107 se han depositado en el Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL) y se les ha concedido los números de acceso NRRL B-21422 y NRRL B-21423, respectivamente. 40

El gen de VIP3A(a) contiene una fase de lectura abierta (ORF) que se extiende desde el nucleótido 732 al 3105. Esta ORF codifica un péptido de 791 aminoácidos que corresponde a una masa molecular de 88.500 daltons. Una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) se localiza 6 bases antes de la primera metionina y su secuencia identifica una SD fuerte para *Bacillus*. 45

El gen VIP3A(b) tiene una identidad del 98% con VIP3A(a). 50

Cuando se sondó la mancha de transferencia del ADN total aislado a partir de células *B. thuringiensis* AB88 con un fragmento de 33 bases que abarca la región N-terminal de la proteína insecticida VIP3A, pudieron observarse bandas individuales en diferentes productos de digestión de restricción. Este resultado se confirmó usando sondas mayores que incluían la región codificante del gen. Una búsqueda de la base de datos del GenBank no reveló ninguna homología con proteínas conocidas. 55

### Ejemplo 8

#### *Expresión de las proteínas insecticidas VIP3A*

60 El transcurso de tiempo para la expresión de la proteína insecticida VIP3A(a) se analizó por transferencia de western. Se tomaron muestras de cultivos de *Bacillus thuringiensis* AB88 a lo largo de su curva de crecimiento y esporulación. La proteína insecticida VIP3A(a) puede detectarse en los sobrenadantes de cultivos AB88 durante la fase logarítmica, tan pronto como quince horas después de iniciar el cultivo. Alcanzó su nivel máximo durante las primeras etapas de la fase estacionaria y se mantuvo a altos niveles durante y después de la esporulación. Se obtuvieron resultados similares cuando se usaron sobrenadantes de cultivos de *Bacillus cereus* AB424. Los niveles de proteína insecticida VIP3A(a) reflejaron la expresión del gen VIP3A(a) como se determina por transferencia de Northern. El inicio de la esporulación se determinó por observaciones microscópicas directas y por análisis de la presencia de 65

## ES 2 213 162 T3

$\delta$ -endotoxinas en los sedimentos celulares. Pudieron detectarse proteínas de tipo Cry-I en las últimas etapas de la fase estacionaria, durante y después de la esporulación.

### Ejemplo 9

5

#### *Identificación de nuevos genes de tipo VIP3 por hibridación*

10 Para identificar *Bacillus* que contenían genes relacionados con la VIP3A(a) del aislado AB88, se seleccionó por hibridación una colección de aislados de *Bacillus*. Se realizaron cultivos de 463 cepas de *Bacillus* en pocillos de microtitulación hasta la esporulación. Se usó un estampador de colonias de 96 púas para transferir los cultivos a placas de 150 mm que contenían L-agar. Las placas inoculadas se mantuvieron a 30°C durante 10 horas y después a 4°C durante una noche. Las colonias se transfirieron a filtros de nylon y se sondearon con un fragmento *Hind*III de 1,2 kb procedente de VIP3A(a). La hibridación se realizó durante una noche a 62°C usando las condiciones de hibridación de Maniatis *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982). Los filtros se lavaron con 2xSSC/SDS al 0,1% a 15 62°C y se expusieron a una película de rayos X.

20 De las 463 cepas de *Bacillus* seleccionadas, 60 contienen genes de tipo VIP3 que podrían detectarse por hibridación. La caracterización adicional de algunas de ellas (AB6 y AB426) demostró que sus sobrenadantes contenían una proteína insecticida de BCW similar a la proteína Vip3, que son activas contra el gusano cortador negro.

20

### Ejemplo 10

#### *Caracterización de una cepa M2194 de B. thuringiensis que contiene un gen de tipo VIP3 críptico*

25 Se demostró que una cepa de *B. thuringiensis*, denominada M2194, contenía genes parecidos a VIP3 por hibridación de colonias como se describe en el ejemplo 8. El gen de tipo VIP3 de M2194 se considera críptico, ya que no puede detectarse ninguna expresión a lo largo de las fases de crecimiento bacteriano por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos policlonales inducidos contra la proteína VIP3A(a) aislada a partir de AB88 o por bioensayo como se describe en el ejemplo 2.

30

35 Se produjo antisuero contra la proteína insecticida VIP3A(a) purificada en conejos. La proteína unida a nitrocelulosa (50  $\mu$ g) se disolvió en DMSO y se emulsionó con adyuvante completo de Freund (Difco). A dos conejos se les administraron inyecciones subcutáneas una vez al mes durante 3 meses. Se extrajo sangre de los conejos 10 días después de la segunda y tercera inyecciones y se recuperó el suero a partir de las muestras de sangre [Harlow *et al* (1988) en: *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY)].

35

40 El gen de tipo VIP3 de M2194 se clonó en pKS siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 3, que creó pCIB7108. Las células *E. coli* que contenían pCIB7108 que comprende el gen VIP3 de M2194 eran activas contra el gusano cortador negro, demostrando que el gen codifica una proteína funcional con actividad insecticida. El plásmido pCIB7108 se ha depositado en el Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL) y se le ha concedido el N° de Acceso NRRL B-21438.

40

### Ejemplo 11

#### *Actividad insecticida de proteínas VIP3A*

50 El espectro de actividad de proteínas insecticidas VIP3A se determinó cualitativamente en bioensayos de insectos en los que se suministraron a larvas células *E. coli* recombinantes que llevaban los genes VIP\*A. En estos ensayos, las células que llevaban los genes VIP3A(a) y VIP3A(b) fueron insecticidas contra *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*. En las mismas condiciones experimentales, los extractos bacterianos que contenían proteínas VIP3A no mostraron ninguna actividad contra *Ostrinia nubilalis*.

55

60

65

ES 2 213 162 T3

Efecto de proteínas insecticidas VIP*A sobre larvas de <i>Agrotis ipsilon</i>	
Tratamiento	Mortalidad (%)
medio TB	5
Sobrenadante de AB88	100
Sobrenadante de Ab424	100
Tampón	7
<i>E coli</i> pKS	10
<i>E coli</i> pCIB7104 (AB88)	100
<i>E coli</i> pCIB7105 (AB88)	100
<i>E coli</i> pCIB7106 (AB424)	100
<i>E coli</i> pCIB7107 (AB424)	100

Efecto de proteínas insecticidas VIP3A sobre larvas de insectos lepidópteros		
Tratamiento	Insecto	(%) Mortalidad
<i>E coli</i> pKS	BCW	10
	FAW	5
	BAW	10
	TBW	8
	CEW	10
	ECB	5
<i>E coli</i> pCIB7105 <i>E coli</i> pCIB7107	BCW	100
	FAW	100
	BAW	100
	TBW	100
	CEW	50
	ECB	10

BCW = gusano cortador negro; FAW = palomilla del maíz; BAW = gusano soldado de la remolacha; TBW = gusano de los brotes del tabaco; CEW = gusano del fruto; ECB = perforador europeo del maíz

50 Ejemplo 12

*Aislamiento y actividad biológica de otras especies de Bacillus sp.*

55 Se han aislado otras especies de *Bacillus* que producen proteínas con actividad insecticida durante el crecimiento vegetativo. Estas cepas se aislaron a partir de muestras de medio por metodologías convencionales. Se prepararon aislados para bioensayos y se ensayaron como se describe en los ejemplos 1 y 2 respectivamente. A continuación se representan en una tabla los aislados que produjeron proteínas insecticidas durante el crecimiento vegetativo con actividad contra *Agrotis ipsilon* en el bioensayo. No se observó ninguna correlación entre la presencia de un cristal de  $\delta$ -endotoxina y la producción de proteínas insecticidas vegetativas.

65

ES 2 213 162 T3

Aislado de <i>Bacillus</i>	Presencia de cristal de $\delta$ -endotoxina	Porcentaje de mortalidad
AB6	+	100
AB53	-	80
AB88	+	100
AB195	-	60
AB211	-	70
AB217	-	83
AB272	-	80
AB279	-	70
AB289	+	100
AB292	+	80
AB294	-	100
AB300	-	80
AB359	-	100

Los aislados AB289, AB294 y AB359 se han depositado en el Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria II 61604, USA y se les ha concedido los números de acceso NRRL B-21227, NRRL B-21229, y NRRL B-21226, respectivamente.

A continuación se representan en una tabla los aislados de *Bacillus* que producen proteínas insecticidas durante el crecimiento vegetativo con actividad contra *Diabrotica virgifera virgifera*.

Aislado de <i>Bacillus</i>	Presencia de cristal de $\delta$ -endotoxina	Porcentaje de mortalidad
AB52	-	50
AB59	-	71
AB68	+	60
AB78	-	100
AB122	-	57
AB218	-	64
AB256	-	64

Los aislados AB59 y AB256 se han depositado en el Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria Illinois 61604, USA, y se les han concedido los números de acceso NRRL B-21228 y NRRL B-2130, respectivamente.

Se han realizado los siguientes depósitos en Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), Northern Regional Research Center, 1815 North University Street, Peoria Illinois 61604, USA:

ES 2 213 162 T3

Denominación de la cepa	Número de depósito	Fecha de deposición
1. <i>E. coli</i> PL2	NRRL B-21221	9 de marzo de 1994
2. <i>E. coli</i> PL2	NRRL B-21221N	2 de septiembre de 1994
3. <i>E. coli</i> pCIB6022	NRRL B-21222	9 de marzo de 1994
4. <i>E. coli</i> pCIB6023	NRRL B-21223	9 de marzo de 1994
5. <i>E. coli</i> pCIB6023	NRRL B-21223N	2 de septiembre de 1994
6. <i>Bacillus thuringiensis</i> HD73-78VIP	NRRL B-21224	9 de marzo de 1994
7. <i>Bacillus thuringiensis</i> AB88	NRRL B-21225	9 de marzo de 1994
8. <i>Bacillus thuringiensis</i> AB359	NRRL B-21226	9 de marzo de 1994
9. <i>Bacillus thuringiensis</i> AB289	NRRL B-21227	9 de marzo de 1994
10. <i>Bacillus</i> sp. AB59	NRRL B-21228	9 de marzo de 1994
11. <i>Bacillus</i> sp. AB294	NRRL B-21229	9 de marzo de 1994
12. <i>Bacillus</i> sp. AB256	NRRL B-21230	9 de marzo de 1994
13. <i>E. coli</i> P5-4	NRRL B-21059	18 de marzo de 1993
14. <i>E. coli</i> P3-12	NRRL B-21061	18 de marzo de 1993
15. <i>Bacillus cereus</i> AB78	NRRL B-21058	18 de marzo de 1993
16. <i>Bacillus thuringiensis</i> AB6	NRRL B-21060	18 de marzo de 1993
17. <i>E. coli</i> pCIB6202	NRRL B-21321	2 de septiembre de 1994
18. <i>E. coli</i> pCIB7100	NRRL B-21322	2 de septiembre de 1994
19. <i>E. coli</i> pCIB7101	NRRL B-21323	2 de septiembre de 1994
20. <i>E. coli</i> pCIB7102	NRRL B-21324	2 de septiembre de 1994
21. <i>E. coli</i> pCIB7103	NRRL B-21325	2 de septiembre de 1994
22. <i>E. coli</i> pCIB7104	NRRL B-21422	24 de marzo de 1995
23. <i>E. coli</i> pCIB7107	NRRL B-21423	24 de marzo de 1995
24. <i>E. coli</i> pCIB7108	NRRL B-21438	5 de Mayo de 1995
25. <i>Bacillus thuringiensis</i> AB424	NRRL B-21439	5 de Mayo de 1995

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de ADN que codifica una proteína pesticida que se puede aislar durante la fase de crecimiento vegetativo de *Bacillus spp.* o variantes y fragmentos de la proteína que retienen actividad pesticida, donde dicha proteína se puede aislar a partir de un medio de cultivo líquido, y donde dicha proteína se codifica por una secuencia de nucleótidos que hibrida con una secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1, 3 ó 4 a 65°C en un tampón que comprende SDS al 7% y fosfato sódico 0,5 M, o donde dicha proteína presenta reacción cruzada con anticuerpos inducidos contra las proteínas de la SEC ID N°: 2 ó 5.
- 10 2. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, que codifica una proteína como se define por la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 7.
- 15 3. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene la secuencia de nucleótidos proporcionada en la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6.
4. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de nucleótidos que se ha optimizado total o parcialmente para la expresión en una planta utilizando codones preferidos para plantas.
- 20 5. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 4, que tiene la secuencia de nucleótidos proporcionada en la SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 6.
6. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de nucleótidos que se ha optimizado total o parcialmente para la expresión en un microorganismo utilizando codones preferidos para el hospedador.
- 25 7. Una molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, que se puede obtener por un proceso que comprende
- (a) obtener una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida;
- 30 (b) hibridar dicha molécula de ADN con una sonda oligonucleotídica que se puede obtener a partir de una molécula de ADN definida en la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 6 y
- 35 (c) aislar dicho ADN hibridado.
8. Un cassette de expresión que comprende una molécula de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 unida operativamente a secuencias de expresión vegetales que incluyen las señales reguladoras de la transcripción y la traducción necesarias para la expresión de las construcciones de ADN asociadas en un organismo hospedador y, opcionalmente, secuencias reguladoras adicionales.
- 40 9. Un cassette de expresión de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque el organismo hospedador es una planta.
- 45 10. Una molécula de vector que comprende un cassette de expresión de acuerdo con la reivindicación 8.
11. Una proteína pesticida codificada por una molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1.
12. La proteína pesticida de la reivindicación 11 **caracterizada** porque dicha proteína tiene un peso molecular de aproximadamente 60 a aproximadamente 100 kDa.
- 50 13. La proteína pesticida de acuerdo con la reivindicación 12, que tiene la secuencia de aminoácidos proporcionada en la SEC ID N°: 29 o la SEC ID N°: 32.
- 55 14. La proteína pesticida de acuerdo con la reivindicación 11, que se puede aislar durante la fase de crecimiento vegetativa de *Bacillus thuringiensis* AB88 depositado con el número de acceso NRRL B-21225, o *Bacillus thuringiensis* AB424 depositado con el número de acceso NRRL 8-21439.
- 60 15. Un organismo hospedador que comprende una molécula de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un cassette de expresión que comprende dicha molécula de ADN, o una molécula de vector que comprende dicho cassette de expresión, preferiblemente incorporado de forma estable en el genoma del organismo hospedador.
- 65 16. El organismo hospedador de acuerdo con la reivindicación 15, seleccionado entre el grupo compuesto por plantas y células de insectos, bacterias, levaduras, baculovirus, protozoos, nematodos y algas.
17. El organismo hospedador de acuerdo con la reivindicación 15, que es un microorganismo transformado con un cassette de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 o una molécula de vector de acuerdo

## ES 2 213 162 T3

con la reivindicación 10, **caracterizado** porque dicho microorganismo es preferiblemente un microorganismo que se multiplica en plantas.

18. El organismo hospedador de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado** porque el microorganismo es una bacteria colonizadora de raíces o una cepa de *Pseudomonas*.

19. El organismo hospedador de acuerdo con la reivindicación 17, **caracterizado** porque el microorganismo es *Bacillus thuringiensis* AB88 depositado con el número de acceso NRRL B-21225 o *Bacillus thuringiensis* AB424 depositado con el número de acceso NRRL B-21439.

20. Una planta transgénica que incluye partes así como la progenie y las semillas de la misma, transformada de forma estable con una molécula de ADN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un cassette de expresión de acuerdo con la reivindicación 9.

21. La planta de acuerdo con la reivindicación 20 que expresa una proteína pesticida de acuerdo con la reivindicación 11.

22. La planta de acuerdo con la reivindicación 21 que expresa además un segundo principio de control de insectos distinto, tal como la  $\delta$ -endotoxina de Bt.

23. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20-22 a 23 que se selecciona entre el grupo compuesto por maíz, sorgo, trigo, girasol, algodón, arroz, soja, cebada y colza.

24. La planta de acuerdo con la reivindicación 23 que es una planta de maíz.

25. La planta de acuerdo con la reivindicación 23 que es una planta de algodón.

26. La planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 que es una planta híbrida.

27. Semilla de una planta de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25 tratada con un recubrimiento protector de semillas.

28. Un método para aislar una molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho método

(a) obtener una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína pesticida; y

(b) hibridar dicha molécula de ADN con una sonda oligonucleotídica que se puede obtener a partir de una molécula de ADN definida en la SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 30, SEC ID N°: 31 o SEC ID N°: 51 y

(c) aislar dicho ADN hibridado.

29. Un método para aumentar la gama de insectos diana, **caracterizado** porque un cassette de expresión de acuerdo con la reivindicación 8 se expresa en una planta junto con al menos una segunda proteína insecticida que es diferente de la proteína pesticida codificada por dicho cassette de expresión.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 29, **caracterizado** porque la segunda proteína insecticida se selecciona entre el grupo compuesto por  $\delta$ -endotoxinas de Bt, inhibidores de proteasa, lectinas,  $\alpha$ -amilasas y peroxidases.

31. Un método para proteger las plantas contra las lesiones producidas por una plaga de insectos que comprende plantar una planta transgénica para una molécula de ADN que codifica una proteína pesticida que hibrida en condiciones moderadamente rigurosas con una sonda oligonucleotídica que se puede obtener a partir de una molécula de ADN definida por la SEC ID N°: 28, SEC ID N°: 30, SEC ID N°: 35 o SEC ID N°: 51 de acuerdo con la reivindicación 1 y que expresa la proteína pesticida.

32. Un método para producir una planta o una célula vegetal que expresa una proteína pesticida que comprende transformar dicha planta o célula vegetal con un cassette de expresión de acuerdo con la reivindicación 9 o una molécula de vector de acuerdo con la reivindicación 10.

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---

# ES 2 213 162 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

(A) NOMBRE: SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

(B) CALLE:

(C) CIUDAD: Basilea

(E) PAÍS: Suiza

(F) CÓDIGO POSTAL: 4002

(G) TELÉFONO:

(H) TELEFAX: +41 61 323 50 44

(I) TELEX:

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nuevas proteínas y cepas pesticidas

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible

(B) ORDENADOR: PC IBM compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatenIn Release N° 1.0, Versión N° 1.30B

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2378 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 9..2375

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "secuencia de ADN nativo que codifica la proteína VIP3A(a) de AB88 contenida en pCIB7104"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 1:

50	AGATGAAC ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA AGC ACA AGA GGC TTA CCA Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro 1 5 10	50
50	AGT TTT ATT GAT TAT TTT AAT GGC ATT TAT GGA TTT GCC ACT GGT ATC Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile 15 20 25 30	98
55	AAA GAC ATT ATG AAC ATG ATT TTT AAA ACG GAT ACA GGT GGT GAT CTA Lys Asp Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu 35 40 45	146
60	ACC CTA GAC GAA ATT TTA AAG AAT CAG CAG TTA CTA AAT GAT ATT TCT Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser 50 55 60	194
65	GGT AAA TTG GAT GGG GTG AAT GGA AGC TTA AAT GAT CTT ATC GCA CAG Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln 65 70 75	242
65	GGA AAC TTA AAT ACA GAA TTA TCT AAG GAA ATA TTA AAA ATT GCA AAT Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn 80 85 90	290



ES 2 213 162 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

GAA CAA AAT CAA GTT TTA AAT GAT GTT AAT AAC AAA CTC GAT GOG ATA 338  
 Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile  
 95 100 105 110

AAT ACG ATG CTT OGG GTA TAT CTA CCT AAA ATT ACC TCT ATG TTG AGT 386  
 Asn Thr Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser  
 115 120 125

GAT GTA ATG AAA CAA AAT TAT GCG CTA AGT CTG CAA ATA GAA TAC TTA 434  
 Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu  
 130 135 140

AGT AAA CAA TTG CAA GAG ATT TCT GAT AAG TTG GAT ATT ATT AAT GTA 482  
 Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val  
 145 150 155

AAT GTA CTT ATT AAC TCT ACA CTT ACT GAA ATT ACA OCT GCG TAT CAA 530  
 Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln  
 160 165 170

AGG ATT AAA TAT GTG AAC GAA AAA TTT GAG GAA TTA ACT TTT GCT ACA 578  
 Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr  
 175 180 185 190

GAA ACT AGT TCA AAA GTA AAA AAG GAT GGC TCT OCT GCA GAT ATT CTT 626  
 Glu Thr Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu  
 195 200 205

GAT GAG TTA ACT GAG TTA ACT GAA CTA GCG AAA AGT GTA ACA AAA AAT 674  
 Asp Glu Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn  
 210 215 220

GAT GTG GAT GGT TTT GAA TTT TAC CTT AAT ACA TTC CAC GAT GTA ATG 722  
 Asp Val Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met  
 225 230 235

GTA GGA AAT AAT TTA TTC GGG OST TCA GCT TTA AAA ACT GCA TOG GAA 770  
 Val Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu  
 240 245 250

TTA ATT ACT AAA GAA AAT GTG AAA ACA AGT GGC AGT GAG GTC GGA AAT 818  
 Leu Ile Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn  
 255 260 265 270

GTT TAT AAC TTC TTA ATT GTA TTA ACA GCT CTG CAA GCC CAA GCT TTT 866  
 Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe  
 275 280 285

CTT ACT TTA ACA ACA TGC CGA AAA TTA TTA GGC TTA GCA GAT ATT GAT 914  
 Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp  
 290 295 300

TAT ACT TCT ATT ATG AAT GAA CAT TTA AAT AAG GAA AAA GAG GAA TTT 962  
 Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe  
 305 310 315

ES 2 213 162 T3

	AGA GTA AAC ATC CTC CCT ACA CTT TCT AAT ACT TTT TCT AAT CCT AAT	1010
	Arg Val Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn	
	320 325 330	
5	TAT GCA AAA GTT AAA GGA AGT GAT GAA GAT GCA AAG ATG ATT GTG GAA	1058
	Tyr Ala Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu	
	335 340 345 350	
10	GCT AAA CCA GGA CAT GCA TTG ATT GGG TTT GAA ATT AGT AAT GAT TCA	1106
	Ala Lys Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser	
	355 360 365	
15	ATT ACA GTA TTA AAA GTA TAT GAG GCT AAG CTA AAA CAA AAT TAT CAA	1154
	Ile Thr Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln	
	370 375 380	
20	GTC GAT AAG GAT TCC TTA TCG GAA GTT ATT TAT GGT GAT ATG GAT AAA	1202
	Val Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys	
	385 390 395	
25	TTA TTG TGC CCA GAT CAA TCT GAA CAA ATC TAT TAT ACA AAT AAC ATA	1250
	Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile	
	400 405 410	
30	GTA TTT CCA AAT GAA TAT GTA ATT ACT AAA ATT GAT TTC ACT AAA AAA	1298
	Val Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys	
	415 420 425 430	
35	ATG AAA ACT TTA AGA TAT GAG GTA ACA GCG AAT TTT TAT GAT TCT TCT	1346
	Met Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser	
	435 440 445	
40	ACA GGA GAA ATT GAC TTA AAT AAG AAA AAA GTA GAA TCA AGT GAA GCG	1394
	Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala	
	450 455 460	
45	GAG TAT AGA ACG TTA AGT GCT AAT GAT GAT GGG GTG TAT ATG CCG TTA	1442
	Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu	
	465 470 475	
50	GGT GTC ATC AGT GAA ACA TTT TTG ACT CCG ATT AAT GGG TTT GGC CTC	1490
	Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu	
	480 485 490	
55	CAA GCT GAT GAA AAT TCA AGA TTA ATT ACT TTA ACA TGT AAA TCA TAT	1538
	Gln Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr	
	495 500 505 510	
60	TTA AGA GAA CTA CTG CTA GCA ACA GAC TTA AGC AAT AAA GAA ACT AAA	1586
	Leu Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys	
	515 520 525	
65	TTG ATC GTC CCG CCA AGT GGT TTT ATT AGC AAT ATT GTA GAG AAC GGG	1634

ES 2 213 162 T3

	Leu	Ile	Val	Pro	Pro	Ser	Gly	Phe	Ile	Ser	Asn	Ile	Val	Glu	Asn	Gly	
				530					535					540			
5	TOC	ATA	GAA	GAG	GAC	AAT	TTA	GAG	CCG	TGG	AAA	GCA	AAT	AAT	AAG	AAT	1682
	Ser	Ile	Glu	Glu	Asp	Asn	Leu	Glu	Pro	Trp	Lys	Ala	Asn	Asn	Lys	Asn	
			545					550					555				
10	GCG	TAT	GTA	GAT	CAT	ACA	GGC	GGA	GTG	AAT	GGA	ACT	AAA	GCT	TTA	TAT	1730
	Ala	Tyr	Val	Asp	His	Thr	Gly	Gly	Val	Asn	Gly	Thr	Lys	Ala	Leu	Tyr	
			560				565					570					
15	GTT	CAT	AAG	GAC	GGA	GGA	ATT	TCA	CAA	TTT	ATT	GGA	GAT	AAG	TTA	AAA	1778
	Val	His	Lys	Asp	Gly	Gly	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Lys	
			575			580					585					590	
20	CCG	AAA	ACT	GAG	TAT	GTA	ATC	CAA	TAT	ACT	GTT	AAA	GGA	AAA	CCT	TCT	1826
	Pro	Lys	Thr	Glu	Tyr	Val	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Lys	Pro	Ser	
				595					600						605		
25	ATT	CAT	TTA	AAA	GAT	GAA	AAT	ACT	GGA	TAT	ATT	CAT	TAT	GAA	GAT	ACA	1874
	Ile	His	Leu	Lys	Asp	Glu	Asn	Thr	Gly	Tyr	Ile	His	Tyr	Glu	Asp	Thr	
				610					615					620			
30	AAT	AAT	AAT	TTA	GAA	GAT	TAT	CAA	ACT	ATT	AAT	AAA	CGT	TTT	ACT	ACA	1922
	Asn	Asn	Asn	Leu	Glu	Asp	Tyr	Gln	Thr	Ile	Asn	Lys	Arg	Phe	Thr	Thr	
				625				630					635				
35	GGA	ACT	GAT	TTA	AAG	GGA	GTG	TAT	TTA	ATT	TTA	AAA	AGT	CAA	AAT	GGA	1970
	Gly	Thr	Asp	Leu	Lys	Gly	Val	Tyr	Leu	Ile	Leu	Lys	Ser	Gln	Asn	Gly	
			640				645					650					
40	GAT	GAA	GCT	TGG	GGA	GAT	AAC	TTT	ATT	ATT	TTG	GAA	ATT	AGT	CCT	TCT	2018
	Asp	Glu	Ala	Trp	Gly	Asp	Asn	Phe	Ile	Ile	Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ser	
				655		660					665					670	
45	GAA	AAG	TTA	TTA	AGT	CCA	GAA	TTA	ATT	AAT	ACA	AAT	AAT	TGG	ACG	AGT	2066
	Glu	Lys	Leu	Leu	Ser	Pro	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Asn	Trp	Thr	Ser	
					675					680					685		
50	ACG	GGA	TCA	ACT	AAT	ATT	AGC	GGT	AAT	ACA	CTC	ACT	CTT	TAT	CAG	GGA	2114
	Thr	Gly	Ser	Thr	Asn	Ile	Ser	Gly	Asn	Thr	Leu	Thr	Leu	Tyr	Gln	Gly	
				690					695					700			
55	GGA	CGA	GGG	ATT	CTA	AAA	CAA	AAC	CTT	CAA	TTA	GAT	AGT	TTT	TCA	ACT	2162
	Gly	Arg	Gly	Ile	Leu	Lys	Gln	Asn	Leu	Gln	Leu	Asp	Ser	Phe	Ser	Thr	
				705				710					715				
60	TAT	AGA	GTG	TAT	TTT	TCT	GTG	TOC	GGA	GAT	GCT	AAT	GTA	AGG	ATT	AGA	2210
	Tyr	Arg	Val	Tyr	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Asp	Ala	Asn	Val	Arg	Ile	Arg	
				720			725					730					
65	AAT	TCT	AGG	GAA	GTG	TTA	TTT	GAA	AAA	AGA	TAT	ATG	AGC	GGT	GCT	AAA	2258
	Asn	Ser	Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Glu	Lys	Arg	Tyr	Met	Ser	Gly	Ala	Lys	
						740					745					750	

ES 2 213 162 T3

5 GAT GTT TCT GAA ATG TTC ACT ACA AAA TTT GAG AAA GAT AAC TTT TAT 2306  
 Asp Val Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr  
 755 760 765  
 10 ATA GAG CTT TCT CAA GGG AAT AAT TTA TAT GGT GGT CCT ATT GTA CAT 2354  
 Ile Glu Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His  
 770 775 780  
 15 TTT TAC GAT GTC TCT ATT AAG TAA 2378  
 Phe Tyr Asp Val Ser Ile Lys  
 785

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 789 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2:

25 Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe  
 1 5 10 15  
 30 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
 20 25 30  
 35 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu  
 35 40 45  
 40 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys  
 50 55 60  
 45 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn  
 65 70 75 80  
 50 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln  
 85 90 95  
 55 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
 100 105 110  
 60 Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
 115 120 125  
 65 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
 130 135 140  
 70 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val  
 145 150 155 160  
 75 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
 165 170 175

ES 2 213 162 T3

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
 180 185 190  
 5 Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu  
 195 200 205  
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
 210 215 220  
 10 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly  
 225 230 235 240  
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile  
 245 250 255  
 15 Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
 260 265 270  
 20 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr  
 275 280 285  
 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr  
 290 295 300  
 25 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
 305 310 315 320  
 30 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala  
 325 330 335  
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys  
 340 345 350  
 35 Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr  
 355 360 365  
 40 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp  
 370 375 380  
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu  
 385 390 395 400  
 45 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe  
 405 410 415  
 50 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys  
 420 425 430  
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly  
 435 440 445  
 55 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr  
 450 455 460

60

65

ES 2 213 162 T3

Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val  
 465 470 475 480  
 5 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala  
 485 490 495  
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
 500 505 510  
 10 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
 515 520 525  
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile  
 530 535 540  
 15 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 545 550 555 560  
 20 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
 565 570 575  
 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
 580 585 590  
 25 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
 595 600 605  
 30 Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 610 615 620  
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
 625 630 635 640  
 35 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 645 650 655  
 40 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys  
 660 665 670  
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly  
 675 680 685  
 45 Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg  
 690 695 700  
 Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg  
 705 710 715 720  
 50 Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser  
 725 730 735  
 55 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val  
 740 745 750  
 Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu  
 755 760 765  
 60 Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr  
 770 775 780  
 65 Asp Val Ser Ile Lys  
 785

## ES 2 213 162 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2403 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

- (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADN sintético"

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: misc\_feature
- (B) LOCALIZACIÓN: 11..2389
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "secuencia de ADN optimizada para maíz que codifica VIP3A(A)"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 3:

	<b>GGATCCACCA ATGAACATGA ACAAGAACAA CACCAAGCTG AGCAACCGOG COCTGCOGAG</b>	<b>60</b>
25	<b>CTTCATCGAC TACTTCAAG GCATCTAAGG CTTOGCCAOC GGCATCAAGG ACATCATGAA</b>	<b>120</b>
	<b>CATGATCTTC AAGACOGACA COGGCGGOGA CCTGAOCCTG GACGAGATOC TGAAGAACCA</b>	<b>180</b>
30	<b>GCAGCTGCTG AACGACATCA GGGCAAGCT GGAOOGGOTG AACGGCAGOC TGAOOGAOC</b>	<b>240</b>
	<b>GATCGCOGAG GGCAACCTGA ACACOGAGCT GAGCAAGGAG ATCCTTAAGA TOGCAACGA</b>	<b>300</b>
	<b>GCAGAACCAG GTGCTGAACG ACGTGAACAA CAAGCTGGAC GOCATCAACA CCATGCTGOG</b>	<b>360</b>
35	<b>CGTGTACCTG CCGAAGATCA CCAGCATGCT GAGCGACGTG ATGAAGCAGA ACTACGCOCT</b>	<b>420</b>
	<b>GAGCCTGCAG ATOGASTAOC TGAGCAAGCA GCTGCAGGAG ATCAGOGACA AGCTGGACAT</b>	<b>480</b>
40	<b>CATCAACGTG AAOGTCTGA TCAACAGCAC CCTGACOGAG ATCACCCOGG CCTACCAGOG</b>	<b>540</b>
	<b>CATCAAGTAC GTGAACGAGA AGTTCGAAGA GCTGAOCCTC GOCACCGAGA CCAGCAGCAA</b>	<b>600</b>
45	<b>GGTGAAGAAG GACGGCAGCC CGGCCACAT CCTGGAOGAG CTGAOCGAGC TGACCGAGCT</b>	<b>660</b>
	<b>GGCCAAGAGC GTGACCAAGA ACGACGTGGA CGGCTTCGAG TTCTACCTGA ACAOCTTOCA</b>	<b>720</b>

ES 2 213 162 T3

OGACGTGATG GTGGGCAACA ACCTGTTGGG CCGCAGGGCC CTGAAGACCG CCAGCGAGCT 780  
 GATCACCAAG GAGAACGTGA AGACCAGCGG CAGCGAGGTG GGCAACGTGT ACAACTTOCT 840  
 5 GATCGTGCTG ACOGCCCTGC AGGCCAGGC CTTOCTGACC CTGACCAOCT GTCGCAAGCT 900  
 GCTGGGCCTG GCOGACATCG ACTACACCAG CATCATGAAC GAGCACTTGA ACAAGGAGAA 960  
 10 GGAGGAGTTC CGCGTGAACA TOCTGCOGAC OCTGAGCAAC AOCTTCAGCA ACOOGAACTA 1020  
 CGCCAAGGTG AAGGGCAGCG ACGAGGAOCC CAAGATGATC GTGGAGGCTA AGCOGGGCOA 1080  
 OGOGTGATC GGCTTOGAGA TCAGCAACGA CAGCATCAOC GTGCTGAAGG TGTACGAGGC 1140  
 15 CAAGCTGAAG CAGAACTACC AGGTGGACAA GGACAGCTTG AGCGAGGTGA TCTACGGOGA 1200  
 CATGGACAAG CTGCTGTGTC CGAOCAGAG OGAGCAATC TACTACACCA ACAACATOGT 1260  
 20 GTTCCCGAAC GAGTACGTGA TCACCAAGAT CGACTTCACC AAGAAGATGA AGACCCTGGG 1320  
 CTAOGAGGTG ACOGCCAACT TCTAOGACAG CAGCACGGCC GAGATCGAOC TGAACAAGAA 1380  
 GAAGGTGGAG AGCAGCGAGG CCGAGTACCG CACCTGAGC GCGAACGAGG ACGGCGTCTA 1440  
 25 CATGCCACTG GGOGTGATCA GCGAGAOCTT OCTGAOOOOG ATCAAOGGCT TTGGCCTGCA 1500  
 GGCCGACGAG AACAGCGGCC TGATCAOCTT GAOCTGTAAG AGCTAOCCTGC GCGAGCTGCT 1560  
 30 GCTAGCCAOC GAOCTGAGCA ACAAGSAGAC CAAGCTGATC GTGCCACCGA GGGCTTCAT 1620  
 CAGCAACATC GTGGAGAAGC GCAGCATOGA GGAGGACAAC CTGGAGCOGT GGAAGGCCAA 1680  
 35 CAACAAGAAC GOCTAOGTGG ACCACACCGG CGGGGTGAAC GGCAOCCAAG COCTGTAOGT 1740  
 GCACAAGGAC GCGGGCATCA GOCAGTTCAT OGGCGACAAG CTGAAGCCGA AGAOCGAGTA 1800  
 40 CSTGATCCAG TACACOGTGA AGGGCAAGCC ATCGATTAC CTGAAGGAGC AGACACCCGG 1860  
 CTACATCCAC TACGAGGACA CCAACAACAA OCTGGAGGAC TACCAGACCA TCAACAAGOG 1920  
 CTTCAOCCAC GGCACOGAOC TGAAGGGOGT GTACCTGATC CTGAAGAGCC AGAACGGOGA 1980  
 45 OGAGGOCTGG GGOGACAAC TCAATCATCCT GGAGATCAGC CCGAGOGAGA AGCTGCTGAG 2040  
 CCCGGAGCTG ATCAACACCA ACAACTGGAC CAGCACGGCC AGCAOCCAACA TCAGCGGCAA 2100  
 50 CACCTGACC CTGTACCAGG GCGGCGCGG CATCCTGAGC CAGAACCTGC AGCTGGACAG 2160  
 CTTCAGCAOC TACCGGTGT ACTTCAGCGT GAGCGGOGAC GCCAAGTGC GCATCOGCAA 2220  
 55 CAGCOGCGAG GTGCTGTTGG AGAAGAGGTA CATGAGGGCC GCCAAGGAGG TGAGCGAGAT 2280  
 GTTCACCAC AAGTTOGAGA AGGACAACCT CTACATCGAG CTGAGCCAGG GCAACAACCT 2340  
 60 GTACGGGGCC CCGATCGTGC ACTTCTACGA CGTGAGCATC AAGTTAACGT AGAGCTCAGA 2400  
 TCT 2403

65



## ES 2 213 162 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 2612 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 118..2484
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Secuencia de ADN nativa que codifica VIP3A(b) de AB424"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 4:

	<b>ATTGAAATTG ATAAAAGTT ATGAGTGT TT AATAATCAGT AATTACCAAT AAAGAATTAA</b>	<b>60</b>
	<b>GAATACAAGT TTACAAGAAA TAAGTGTAC AAAAAATAGC TGAAAAGGAA GATGAAC</b>	<b>117</b>
25	<b>ATG AAC AAG AAT AAT ACT AAA TTA AGC ACA AGA GGC TTA OCA AGT TTT</b> Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe <b>790</b> <span style="margin-left: 150px;"><b>795</b></span> <span style="margin-left: 150px;"><b>800</b></span> <span style="margin-left: 150px;"><b>805</b></span>	<b>165</b>
30	<b>ATT GAT TAT TTC AAT GGC ATT TAT GGA TTT GCC ACT GGT ATC AAA GAC</b> Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp <span style="margin-left: 100px;"><b>810</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>815</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>820</b></span>	<b>213</b>
35	<b>ATT ATG AAC ATG ATT TTT AAA ACG GAT ACA GGT GGT GAT CTA ACC CTA</b> Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu <span style="margin-left: 100px;"><b>825</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>830</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>835</b></span>	<b>261</b>
40	<b>GAC GAA ATT TTA AAG AAT CAG CAG CTA CTA AAT GAT ATT TCT GGT AAA</b> Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys <span style="margin-left: 100px;"><b>840</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>845</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>850</b></span>	<b>309</b>
45	<b>TTG GAT GGG GTG AAT GGA AGC TTA AAT GAT CTT ATC GCA CAG GGA AAC</b> Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn <b>855</b> <span style="margin-left: 150px;"><b>860</b></span> <span style="margin-left: 150px;"><b>865</b></span>	<b>357</b>
50	<b>TTA AAT ACA GAA TTA TCT AAG GAA ATA TTA AAA ATT GCA AAT GAA CAA</b> Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln <b>870</b> <span style="margin-left: 150px;"><b>875</b></span> <span style="margin-left: 150px;"><b>880</b></span> <span style="margin-left: 150px;"><b>885</b></span>	<b>405</b>
55	<b>AAT CAA GTT TTA AAT GAT GTT AAT AAC AAA CTC GAT GCG ATA AAT ACG</b> Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr <span style="margin-left: 100px;"><b>890</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>895</b></span> <span style="margin-left: 100px;"><b>900</b></span>	<b>453</b>
60		
65		

ES 2 213 162 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ATG CTT CGG GTA TAT CTA CCT AAA ATT ACC TCT ATG TTG AGT GAT GTA 501  
 Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
 905 910 915

ATG AAA CAA AAT TAT GCG CTA AGT CTG CAA ATA GAA TAC TTA AGT AAA 549  
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
 920 925 930

CAA TTG CAA GAG ATT TCT GAT AAG TTG GAT ATT ATT AAT GTA AAT GTA 597  
 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val  
 935 940 945

CTT ATT AAC TCT ACA CTT ACT GAA ATT ACA OCT GCG TAT CAA AGG ATT 645  
 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
 950 955 960 965

AAA TAT GTG AAC GAA AAA TTT GAG GAA TTA ACT TTT GCT ACA GAA ACT 693  
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
 970 975 980

AGT TCA AAA GTA AAA AAG GAT GGC TCT OCT GCA GAT ATT CGT GAT GAG 741  
 Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Arg Asp Glu  
 985 990 995

TTA ACT GAG TTA ACT GAA CTA GCG AAA AGT GTA ACA AAA AAT GAT GTG 789  
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
 1000 1005 1010

GAT GGT TTT GAA TTT TAC CTT AAT ACA TTC CAC GAT GTA ATG GTA GGA 837  
 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly  
 1015 1020 1025

AAT AAT TTA TTC GGG CGT TCA GCT TTA AAA ACT GCA TCG GAA TTA ATT 885  
 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile  
 1030 1035 1040 1045

ACT AAA GAA AAT GTG AAA ACA AGT GGC AGT GAG GTC GGA AAT GTT TAT 933  
 Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
 1050 1055 1060

AAC TTC CTA ATT GTA TTA ACA GCT CTG CAA GCA AAA GCT TTT CTT ACT 981  
 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr  
 1065 1070 1075

TTA ACA CCA TGC CGA AAA TTA TTA GGC TTA GCA GAT ATT GAT TAT ACT 1029  
 Leu Thr Pro Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr  
 1080 1085 1090

TCT ATT ATG AAT GAA CAT TTA AAT AAG GAA AAA GAG GAA TTT AGA GTA 1077  
 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
 1095 1100 1105

ES 2 213 162 T3

AAC ATC CTC CCT ACA CTT TCT AAT ACT TTT TCT AAT CCT AAT TAT GCA 1125  
 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala  
 1110 1115 1120 1125  
 5  
 AAA GTT AAA GGA AGT GAT GAA GAT GCA AAG ATG ATT GTG GAA GCT AAA 1173  
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys  
 1130 1135 1140  
 10  
 CCA GGA CAT GCA TTG ATT GGG TTT GAA ATT AGT AAT GAT TCA ATT ACA 1221  
 Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr  
 1145 1150 1155  
 15  
 GTA TTA AAA GTA TAT GAG GCT AAG CTA AAA CAA AAT TAT CAA GTC GAT 1269  
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp  
 1160 1165 1170  
 20  
 AAG GAT TOC TTA TCG GAA GTT ATT TAT GGC GAT ATG GAT AAA TTA TTG 1317  
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu  
 1175 1180 1185  
 25  
 TGC CCA GAT CAA TCT GGA CAA ATC TAT TAT ACA AAT AAC ATA GTA TTT 1365  
 Cys Pro Asp Gln Ser Gly Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe  
 1190 1195 1200 1205  
 30  
 CCA AAT GAA TAT GTA ATT ACT AAA ATT GAT TTC ACT AAA AAA ATG AAA 1413  
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys  
 1210 1215 1220  
 35  
 ACT TTA AGA TAT GAG GTA ACA GCG AAT TTT TAT GAT TCT TCT ACA GGA 1461  
 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly  
 1225 1230 1235  
 40  
 GAA ATT GAC TTA AAT AAG AAA AAA GTA GAA TCA AGT GAA GCG GAG TAT 1509  
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr  
 1240 1245 1250  
 45  
 AGA ACG TTA AGT GCT AAT GAT GAT GGG GTG TAT ATG COG TTA GGT GTC 1557  
 Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val  
 1255 1260 1265  
 50  
 ATC AGT GAA ACA TTT TTG ACT CCG ATT AAT GGG TTT GGC CTC CAA GCT 1605  
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala  
 1270 1275 1280 1285  
 55  
 GAT GAA AAT TCA AGA TTA ATT ACT TTA ACA TGT AAA TCA TAT TTA AGA 1653  
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
 1290 1295 1300  
 60  
 GAA CTA CTG CTA GCA ACA GAC TTA AGC AAT AAA GAA ACT AAA TTG ATC 1701  
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
 1305 1310 1315  
 65  
 GTC COG CCA AGT GGT TTT ATT AGC AAT ATT GTA GAG AAC GGG TOC ATA 1749  
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile  
 1320 1325 1330

ES 2 213 162 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

GAA GAG GAC AAT TTA GAG CCG TGG AAA GCA AAT AAT AAG AAT GCG TAT 1797  
 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 1335 1340 1345

GTA GAT CAT ACA GGC GGA GTG AAT GGA ACT AAA GCT TTA TAT GTT CAT 1845  
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
 1350 1355 1360 1365

AAG GAC GGA GGA ATT TCA CAA TTT ATT GGA GAT AAG TTA AAA CCG AAA 1893  
 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
 1370 1375 1380

ACT GAG TAT GTA ATC CAA TAT ACT GTT AAA GGA AAA CCT TCT ATT CAT 1941  
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
 1385 1390 1395

TTA AAA GAT GAA AAT ACT GGA TAT ATT CAT TAT GAA GAT ACA AAT AAT 1989  
 Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 1400 1405 1410

AAT TTA GAA GAT TAT CAA ACT ATT AAT AAA CGT TTT ACT ACA GGA ACT 2037  
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
 1415 1420 1425

GAT TTA AAG GGA GTG TAT TTA ATT TTA AAA AGT CAA AAT GGA GAT GAA 2085  
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 1430 1435 1440 1445

GCT TGG GGA GAT AAC TTT ATT ATT TTG GAA ATT AGT CCT TCT GAA AAG 2133  
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys  
 1450 1455 1460

TTA TTA AGT CCA GAA TTA ATT AAT ACA AAT AAT TGG ACG AGT ACG GGA 2181  
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly  
 1465 1470 1475

TCA ACT AAT ATT AGC GGT AAT ACA CTC ACT CTT TAT CAG GGA GGA OGA 2229  
 Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg  
 1480 1485 1490

GGG ATT CTA AAA CAA AAC CTT CAA TTA GAT AGT TTT TCA ACT TAT AGA 2277  
 Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg  
 1495 1500 1505

GTG TAT TTC TCT GTG TCC GGA GAT GCT AAT GTA AGG ATT AGA AAT TCT 2325  
 Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser  
 1510 1515 1520 1525

AGG GAA GTG TTA TTT GAA AAA AGA TAT ATG AGC GGT GCT AAA GAT GTT 2373  
 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val  
 1530 1535 1540

TCT GAA ATG TTC ACT ACA AAA TTT GAG AAA GAT AAC TTC TAT ATA GAG 2421  
 Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu  
 1545 1550 1555

## ES 2 213 162 T3

CTT TCT CAA GGG AAT AAT TTA TAT GGT GGT CCT ATT GTA CAT TTT TAC 2469  
 Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr  
 1560 1565 1570

5 GAT GTC TCT ATT AAG TAAGATCGGG ATCTAATATT AACAGTTTTT AGAAGCTAAT 2524  
 Asp Val Ser Ile Lys  
 1575

10 TCTTGATATAA TGTCCTTGAT TATGGAAAAA CACAATTTTG TTTGCTAAGA TGTATATATA 2584  
 GCTCACTCAT TAAAAGGCAA TCAAGCTT 2612

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 789 aminoácidos
- 20 (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 5:

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

30 Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
 20 25 30

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

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

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

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

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
 100 105 110

50 Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
 115 120 125

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

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

60

65

ES 2 213 162 T3

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
 165 170 175  
 5 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
 180 185 190  
 10 Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Arg Asp Glu  
 195 200 205  
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
 210 215 220  
 15 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly  
 225 230 235 240  
 20 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile  
 245 250 255  
 Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
 260 265 270  
 25 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr  
 275 280 285  
 Leu Thr Pro Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr  
 290 295 300  
 30 Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
 305 310 315 320  
 35 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala  
 325 330 335  
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys  
 340 345 350  
 40 Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr  
 355 360 365  
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp  
 370 375 380  
 45 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu  
 385 390 395 400  
 50 Cys Pro Asp Gln Ser Gly Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe  
 405 410 415  
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys  
 420 425 430  
 55 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly  
 435 440 445

60

65

ES 2 213 162 T3

5     Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr  
        450                                 455                                 460  
 10     Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val  
        465                                 470                                 475                                 480  
 15     Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala  
        485                                 490                                 495  
 20     Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
        500                                 505                                 510  
 25     Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
        515                                 520                                 525  
 30     Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile  
        530                                 535                                 540  
 35     Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
        545                                 550                                 555                                 560  
 40     Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
        565                                 570                                 575  
 45     Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
        580                                 585                                 590  
 50     Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
        595                                 600                                 605  
 55     Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
        610                                 615                                 620  
 60     Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
        625                                 630                                 635                                 640  
 65     Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
        645                                 650                                 655  
 70     Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys  
        660                                 665                                 670  
 75     Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly  
        675                                 680                                 685  
 80     Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg  
        690                                 695                                 700  
 85     Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg  
        705                                 710                                 715                                 720  
 90     Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser  
        725                                 730                                 735  
 95     Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val  
                                   740                                    745                                    750

## ES 2 213 162 T3

Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu  
755 760 765

5 Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr  
770 775 780

10 Asp Val Ser Ile Lys  
785

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 6:

#### 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 2444 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: NO

#### 25 (ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 17..2444

(D) OTRA INFORMACIÓN: /producto= "fusión 3A(a) sintética: nativa"

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6:

35

40

45

50

55

60

65



ES 2 213 162 T3

5	GGATOCACCA ATGAAC ATG AAC AAG AAC AAC ACC AAG CTG AGC ACC CGC Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg 1 5 10	49
10	GCC CTG CCG AGC TTC ATC GAC TAC TTC AAC GGC ATC TAC GGC TTC GCC Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala 15 20 25	97
15	ACC GGC ATC AAG GAC ATC ATG AAC ATG ATC TTC AAG ACC GAC ACC GGC Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly 30 35 40	145
20	GGC GAC CTG ACC CTG GAC GAG ATC CTG AAG AAC CAG CAG CTG CTG AAC Gly Asp Leu Thr Leu Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn 45 50 55	193
25	GAC ATC AGC GGC AAG CTG GAC GGC GTG AAC GGC AGC CTG AAC GAC CTG Asp Ile Ser Gly Lys Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu 60 65 70 75	241
30	ATC GCC CAG GGC AAC CTG AAC ACC GAG CTG AGC AAG GAG ATC CTT AAG Ile Ala Gln Gly Asn Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys 80 85 90	289
35	ATC GGC AAC GAG CAG AAC CAG GTG CTG AAC GAC GTG AAC AAC AAG CTG Ile Ala Asn Glu Gln Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu 95 100 105	337
40	GAC GCC ATC AAC ACC ATG CTG CGC GTG TAC CTG CCG AAG ATC ACC AGC Asp Ala Ile Asn Thr Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser 110 115 120	385
45	ATG CTG AGC GAC GTG ATG AAG CAG AAC TAC GCC CTG AGC CTG CAG ATC Met Leu Ser Asp Val Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile 125 130 135	433
50	GAG TAC CTG AGC AAG CAG CTG CAG GAG ATC AGC GAC AAG CTG GAC ATC Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile 140 145 150 155	481
55	ATC AAC GTG AAC GTC CTG ATC AAC AGC ACC CTG ACC GAG ATC ACC CCG Ile Asn Val Asn Val Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro 160 165 170	529
60	GCC TAC CAG CGC ATC AAG TAC GTG AAC GAG AAG TTC GAA GAG CTG ACC Ala Tyr Gln Arg Ile Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr 175 180 185	577
65	TTC GCC ACC GAG ACC AGC AGC AAG GTG AAG AAG GAC GGC AGC CCG GCC Phe Ala Thr Glu Thr Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala 190 195 200	625
70	GAC ATC CTG GAC GAG CTG ACC GAG CTG ACC GAG CTG GCC AAG AGC GTG	673

ES 2 213 162 T3

	Asp Ile Leu Asp Glu Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val	
	205	210
		215
5	ACC AAG AAC GAC GTG GAC GGC TTC GAG TTC TAC CTG AAC ACC TTC CAC	721
	Thr Lys Asn Asp Val Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His	
	220	225
		230
		235
10	GAC GTG ATG GTG GGC AAC AAC CTG TTC GGC GGC AGC GCC CTG AAG ACC	769
	Asp Val Met Val Gly Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr	
		240
		245
		250
15	GCC AGC GAG CTG ATC ACC AAG GAG AAC GTG AAG ACC AGC GGC AGC GAG	817
	Ala Ser Glu Leu Ile Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu	
		255
		260
		265
20	GTG GGC AAC GTG TAC AAC TTC CTG ATC GTG CTG ACC GGC CTG CAG GCC	865
	Val Gly Asn Val Tyr Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala	
		270
		275
		280
25	CAG GCC TTC CTG ACC CTG ACC ACC TGT CGC AAG CTG CTG GGC CTG GCC	913
	Gln Ala Phe Leu Thr Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala	
		285
		290
		295
30	GAC ATC GAC TAC ACC AGC ATC ATG AAC GAG CAC TTG AAC AAG GAG AAG	961
	Asp Ile Asp Tyr Thr Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys	
	300	305
		310
		315
35	GAG GAG TTC CGC GTG AAC ATC CTG CCG ACC CTG AGC AAC ACC TTC AGC	1009
	Glu Glu Phe Arg Val Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser	
		320
		325
		330
40	AAC CCG AAC TAC GCC AAG GTG AAG GGC AGC GAC GAG GAC GCC AAG ATG	1057
	Asn Pro Asn Tyr Ala Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met	
		335
		340
		345
45	ATC GTG GAG GCT AAG CCG GGC CAC GCG TTG ATC GGC TTC GAG ATC AGC	1105
	Ile Val Glu Ala Lys Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser	
		350
		355
		360
50	AAC GAC AGC ATC ACC GTG CTG AAG GTG TAC GAG GCC AAG CTG AAG CAG	1153
	Asn Asp Ser Ile Thr Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln	
		365
		370
		375
55	AAC TAC CAG GTG GAC AAG GAC AGC TTG AGC GAG GTG ATC TAC GGC GAC	1201
	Asn Tyr Gln Val Asp Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp	
		380
		385
		390
		395
60	ATG GAC AAG CTG CTG TGT CCG GAC CAG AGC GAG CAA ATC TAC TAC ACC	1249
	Met Asp Lys Leu Leu Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr	
		400
		405
		410
65	AAC AAC ATC GTG TTC CCG AAC GAG TAC GTG ATC ACC AAG ATC GAC TTC	1297
	Asn Asn Ile Val Phe Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe	
		415
		420
		425

ES 2 213 162 T3

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

ACC AAG AAG ATG AAG ACC CTG CGC TAC GAG GTG ACC GCC AAC TTC TAC 1345  
 Thr Lys Lys Met Lys Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr  
 430 435 440

GAC AGC AGC ACC GGC GAG ATC GAC CTG AAC AAG AAG AAG GTG GAG AGC 1393  
 Asp Ser Ser Thr Gly Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser  
 445 450 455

AGC GAG GGC GAG TAC CGC ACC CTG AGC GCG AAC GAC GAC GGC GTC TAC 1441  
 Ser Glu Ala Glu Tyr Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr  
 460 465 470 475

ATG CCA CTG GGC GTG ATC AGC GAG ACC TTC CTG ACC CCG ATC AAC GGC 1489  
 Met Pro Leu Gly Val Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly  
 480 485 490

TTT GGC CTG CAG GGC GAC GAG AAC AGC OGC CTG ATC ACC CTG ACC TGT 1537  
 Phe Gly Leu Gln Ala Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys  
 495 500 505

AAG AGC TAC CTG CGC GAG CTG CTG CTA GCC ACC GAC CTG AGC AAC AAG 1585  
 Lys Ser Tyr Leu Arg Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys  
 510 515 520

GAG ACC AAG CTG ATC GTG CCA CCG AGC GGC TTC ATC AGC AAC ATC GTG 1633  
 Glu Thr Lys Leu Ile Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val  
 525 530 535

GAG AAC GGC AGC ATC GAG GAG GAC AAC CTG GAG CCG TGG AAG GCC AAC 1681  
 Glu Asn Gly Ser Ile Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn  
 540 545 550 555

AAC AAG AAC GCC TAC GTG GAC CAC ACC GGC GGC GTG AAC GGC ACC AAG 1729  
 Asn Lys Asn Ala Tyr Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys  
 560 565 570

GCC CTG TAC GTG CAC AAG GAC GGC GGC ATC AGC CAG TTC ATC GGC GAC 1777  
 Ala Leu Tyr Val His Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp  
 575 580 585

AAG CTG AAG CCG AAG ACC GAG TAC GTG ATC CAG TAC ACC GTG AAG GGC 1825  
 Lys Leu Lys Pro Lys Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly  
 590 595 600

AAG CCA TOG ATT CAC CTG AAG GAC GAG AAC ACC GGC TAC ATC CAC TAC 1873  
 Lys Pro Ser Ile His Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr  
 605 610 615

GAG GAC ACC AAC AAC AAC CTG GAG GAC TAC CAG ACC ATC AAC AAG OGC 1921  
 Glu Asp Thr Asn Asn Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg  
 620 625 630 635

TTC ACC ACC GGC ACC GAC CTG AAG GGC GTG TAC CTG ATC CTG AAG AGC 1969  
 Phe Thr Thr Gly Thr Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser  
 640 645 650

ES 2 213 162 T3

CAG AAC GGC GAC GAG GCC TGG GGC GAC AAC TTC ATC ATC CTG GAG ATC 2017  
 Gln Asn Gly Asp Glu Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile  
 655 660 665  
 5  
 AGC COG AGC GAG AAG CTG CTG AGC CCG GAG CTG ATC AAC ACC AAC AAC 2065  
 Ser Pro Ser Glu Lys Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn  
 670 675 680  
 10  
 TGG ACC AGC ACC GGC AGC ACC AAC ATC AGC GGC AAC ACC CTG ACC CTG 2113  
 Trp Thr Ser Thr Gly Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu  
 685 690 695  
 15  
 TAC CAG GGC GGC OGG GGG ATT CTA AAA CAA AAC CTT CAA TTA GAT AGT 2161  
 Tyr Gln Gly Gly Arg Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser  
 700 705 710 715  
 20  
 TTT TCA ACT TAT AGA GTG TAT TTT TCT GTG TCC GGA GAT GCT AAT GTA 2209  
 Phe Ser Thr Tyr Arg Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val  
 720 725 730  
 25  
 AGG ATT AGA AAT TCT AGG GAA GTG TTA TTT GAA AAA AGA TAT ATG AGC 2257  
 Arg Ile Arg Asn Ser Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser  
 735 740 745  
 30  
 GGT GCT AAA GAT GTT TCT GAA ATG TTC ACT ACA AAA TTT GAG AAA GAT 2305  
 Gly Ala Lys Asp Val Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp  
 750 755 760  
 35  
 AAC TTT TAT ATA GAG CTT TCT CAA GGG AAT AAT TTA TAT GGT GGT CCT 2353  
 Asn Phe Tyr Ile Glu Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro  
 765 770 775  
 40  
 ATT GTA CAT TTT TAC GAT GTC TCT ATT AAG NAA GAT CGG GAT CTA ATA 2401  
 Ile Val His Phe Tyr Asp Val Ser Ile Lys Xaa Asp Arg Asp Leu Ile  
 780 785 790 795  
 45  
 TTA ACA GTT TTT AAA AGC NAA TTC TTG TAT AAT GTC CTT GAT T 2444  
 Leu Thr Val Phe Lys Ser Xaa Phe Leu Tyr Asn Val Leu Asp  
 800 805

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 7:

- 45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 809 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7:  
 55  
 60  
 65

ES 2 213 162 T3

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

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
 20 25 30

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

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

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

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

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu  
 195 200 205

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

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

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

Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
 260 265 270

Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Gln Ala Phe Leu Thr  
 275 280 285

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

65

ES 2 213 162 T3

Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
 305 310 315 320  
 5 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala  
 325 330 335  
 Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys  
 340 345 350  
 10 Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr  
 355 360 365  
 Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp  
 370 375 380  
 15 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu  
 385 390 395 400  
 20 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe  
 405 410 415  
 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys  
 420 425 430  
 25 Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly  
 435 440 445  
 Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr  
 450 455 460  
 30 Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val  
 465 470 475 480  
 35 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala  
 485 490 495  
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
 500 505 510  
 40 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
 515 520 525  
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile  
 530 535 540  
 45 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 545 550 555 560  
 50 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
 565 570 575  
 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
 580 585 590  
 55 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
 595 600 605  
 60  
 65

ES 2 213 162 T3

Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 610 615 620  
 5 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
 625 630 635 640  
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 645 650 655  
 10 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys  
 660 665 670  
 15 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly  
 675 680 685  
 Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg  
 690 695 700  
 20 Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg  
 705 710 715 720  
 Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser  
 725 730 735  
 25 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val  
 740 745 750  
 30 Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu  
 755 760 765  
 Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr  
 770 775 780  
 35 Asp Val Ser Ile Lys Xaa Asp Arg Asp Leu Ile Leu Thr Val Phe Lys  
 785 790 795 800  
 40 Ser Xaa Phe Leu Tyr Asn Val Leu Asp  
 805  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65