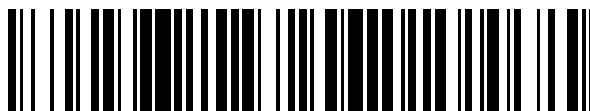


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 499**

51 Int. Cl.:
C07K 14/325 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06772278 .5**
96 Fecha de presentación: **06.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1893638**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO DE PROTEASA ESPECÍFICA DE INSECTOS.**

30 Prioridad:
08.06.2005 US 688635 P
30.09.2005 US 722787 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2011

73 Titular/es:
PIONEER-HI-BRED INTERNATIONAL, INC.
7100 N.W. 62ND AVENUE P.O. BOX 1014
JOHNSTON, IA 50131-1014, US y
E.I. DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY

72 Inventor/es:
ABAD, Andre R.; CHUN, Gary C.;
FLANNAGAN, Ronald D.; HERRMANN, Rafael;
LU, Albert L.; MCCUTCHEN, Billy F.;
RICE, Janet A. y SCHEPERS, Eric J.

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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).

ES 2 368 499 T3

DESCRIPCIÓN

Secuencias de reconocimiento de proteasa específica de insectos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los campos de la biología molecular de plantas y del control de plagas de plantas.

10 **Antecedentes de la invención**

Las plagas de insectos son un factor fundamental en la pérdida de cultivos agrícolas de todo el mundo. Por ejemplo, los daños producidos por el gusano de la raíz del maíz o por el picudo peruano pueden ser económicamente devastadores para los productores agrícolas. La pérdida de cultivos en relación con plagas de insectos ha alcanzado, sólo en lo que respecta al gusano de la raíz del maíz, el billón de dólares anual.

Tradicionalmente, los principales procedimientos para afectar a las poblaciones de plagas de insectos, tales como las poblaciones del gusano de la raíz del maíz, son la rotación de cultivos y la aplicación de pesticidas químicos sintéticos de amplio espectro. No obstante, los consumidores y los reguladores de los gobiernos cada vez están más preocupados por los riesgos para el medioambiente asociados con la producción y uso de pesticidas químicos sintéticos. Debido a estas preocupaciones, los reguladores han prohibido o limitado el uso de algunos de los pesticidas más peligrosos. Por tanto, existe un considerable interés en el desarrollo de pesticidas alternativos.

El control biológico de plagas de insectos de significado agrícola usando un agente microbiano, tal como hongos, bacterias u otras especies de insectos, proporciona una alternativa ecológica y comercialmente atractiva. En términos generales, el uso de biopesticidas supone un riesgo menor de polución y riesgos ambientales, y proporciona una especificidad de diana mayor de la característica de los insecticidas químicos de amplio espectro tradicionales. Además, los biopesticidas a menudo son más baratos de producir y, por tanto, se mejora el rendimiento económico para una amplia variedad de cultivos.

Se sabe que ciertas especies de microorganismos del género *Bacillus* poseen actividad pesticida contra una amplia gama de plagas de insectos, incluidos *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hemiptera*, y otros. *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus papilliae* están entre los agentes de biocontrol con más éxito descubiertos hasta la fecha. La patogeneidad de insectos se ha atribuido a las cepas de: *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. papilliae*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis* (Harwood, ed. (1989) *Bacillus* (Plenum Press), p. 306) y *B. cereus* (documento WO 96/10083). Parece que la actividad pesticida está concentrada en inclusiones proteicas cristalinas parasporales, aunque las proteínas pecticas también se han aislado de la etapa de crecimiento vegetativo de *Bacillus*. Se han aislado y caracterizado Varios genes que codifican estas proteínas pesticidas (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.366.892 y 5.840.868).

Los pesticidas microbianos, particularmente los obtenidos de las cepas de *Bacillus*, han desempeñado un papel importante en la agricultura como alternativas al control químico de las plagas. Recientemente, los científicos agrícolas han desarrollado plantas de cultivo con resistencia potenciada a insectos mediante ingeniería genética de las plantas de cultivo para producir proteínas pesticidas de *Bacillus*. Por ejemplo, las plantas de maíz y algodón sometidas a ingeniería genética para producir proteínas pesticidas aisladas de cepas de *B. thuringiensis*, conocidas como δ -endotoxinas o toxinas Cry (véase Aronson (2002) *Cell Mol. Life Sci.* 59(3):417-425; Schnepf y col. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):775-806) actualmente se usan ampliamente en la agricultura americana y han proporcionado al agricultor una alternativa ecológica a los procedimientos de control de insectos tradicionales. Además, las patatas sometidas a ingeniería genética para que contengan toxinas Cry pesticidas se han comercializado para el agricultor americano. No obstante, aunque se ha probado que tienen mucho éxito comercial, estas plantas de cultivo resistentes a insectos modificadas genéticamente sólo proporcionan resistencia a una amplia gama de las plagas de insectos importantes económicamente. Se ha demostrado que algunos insectos, tales como el gusano de la raíz del maíz occidental, son recalcitrantes.

De acuerdo con esto, se han realizado esfuerzos para entender el mecanismo de acción de las toxinas Bt y para modificar las toxinas con propiedades mejoradas. Se ha demostrado que las proteasas de intestino pueden afectar al impacto de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y otras proteínas pesticidas del insecto. Algunas proteasas activan las proteínas Cry procesándolas a partir de una forma de "protoxina" en una forma tóxica o "toxina". Véase, Oppert (1999) *Arch. Insect Biochem. Phys.* 42:1-12 y Carroll y col. (1997) *J. Invertebrate Pathology* 70:41-49. Esta activación de la toxina puede incluir la eliminación de los péptidos en N-terminal y C-terminal de la proteína y también pueden incluir la escisión interna de la proteína. Otras proteasas pueden degradar las proteínas pesticidas. Véase Oppert, *ibid.*; véase también las patentes de EE.UU. n° 6.057.491. y 6.339.491.

Los investigadores han determinado que las plantas expresan diversas proteasas, incluidas serina y cisteína proteasas. Véase, *por ejemplo*, Goodfellow y col. (1993) *Plant Physiol.* 101:415-419; Pechan y col. (1999) *Plant Mol. Biol.* 40: 111-119; Lid y col. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:5460-5465. La investigación también que las proteasas de intestino de insecto incluyen catepsinas, tales como proteinasas similares a la catepsina B y L. Véase

Shiba y col. (2001) *Parch. Biochem. Biophys.* 390: 28-34; véase también Purcell y col. (1992) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22:41-47. Por ejemplo, las cisteína proteinasas similares a la cathepsina L se encuentran en el intestino medio de las larvas del gusano de la raíz del maíz occidental. Véase, Koiwa y col. (2000) *FEBS Letters* 471 :67-70; véase también, Koiwa y col. (2000) *Analytical Biochemistry* 282: 153-155. Los sitios sustrato proteolíticos preferidos de estas proteasas se han investigado usando sustratos sintéticos. Véase Alves y col., (2001) *Eur. J. Biochem* 268: 1206-1212 y Melo y col., (2001) *Anal. Biochem.* 293:71-77.

Aunque los investigadores ya han modificado genéticamente plantas, particularmente plantas de cultivos, para que contengan toxinas Cry biológicamente activos (es decir, pesticidas), hasta la fecha los investigadores no han usado de forma efectiva las formas protoxina de los polipéptidos pesticidas junto con proteasas de intestino de insectos para controlar plagas de plantas. Además, estas proteínas extrañas pueden ser degradadas e inactivadas por las proteasas presentes en estas plantas transgénicas. Por tanto es deseable disponer de nuevas estrategias para modificar toxinas de insectos y usar estas toxinas modificadas en las estrategias para controlar las plagas.

El documento WO 2004/003148 divulga δ -endotoxinas que se han modificado para que tenga al menos un sitio proteolítico sensible a cathepsina. El documento WO 02/34774 divulga δ -endotoxinas que son activas contra plagas de coleópteros y δ -endotoxinas modificadas con mejor actividad pesticida o especificidad alterada por la plaga. El documento US 2003/120054 divulga toxinas Cry3A modificadas que tienen mayor toxicidad contra el gusano de la raíz del maíz. El documento WO 95/02693 divulga toxinas Bt con actividad contra dípteros y/o el gusano de la raíz del maíz. El documento US 2002/038005 divulga dos δ -endotoxinas, Cry26Aa1 y Cry28Aa1

Resumen de la invención

Se proporcionan composiciones y los procedimientos para proteger una planta de una plaga de insectos. Las composiciones incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican protoxinas de insectos o toxinas de insectos que comprenden al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a una proteasa de intestino de insecto. Normalmente, el sitio de activación proteolítica se modifica dentro de una región de activación de la protoxina de insectos o toxina de insectos. La escisión proteolítica de una protoxina de insecto modificada mediante la proteasa de insecto modificada libera la toxina de insecto activada dentro del intestino del insecto. La escisión de una toxina de insecto modificada mediante la proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto con mejor actividad pesticida en el intestino del insecto con respecto a la correspondiente toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica. Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden estar unidas de forma operable a cualquier promotor de interés para dirigir la expresión de las protoxinas de insecto o toxinas de insecto modificadas en una planta o célula vegetal. También se proporcionan casetes de expresión y plantas transgénicas, células vegetales y semillas que comprenden estas nuevas moléculas de ácido nucleico. Además se proporcionan composiciones que comprenden protoxinas de insecto modificadas o toxinas de insecto modificadas y procedimientos de su uso en el control de plagas de plantas.

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención encuentran utilidad en procedimientos dirigidos a proteger plantas de plagas de insectos. Los procedimientos comprenden introducir en una planta un polinucleótido de la invención unido operablemente a un promotor que dirige la expresión en una planta.

De acuerdo con esto, la invención proporciona un procedimiento para producir una toxina de insectos que tiene al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a una cisteína proteasa de intestino de insecto y en el que la escisión de dicha protoxina de insecto por dicha cisteína proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto activa; en el que dicho sitio de escisión se introduce en la unión entre el segmento de formación cristalina en N-terminal de la protoxina y la porción C-terminal de la protoxina que comprende la toxina de insecto activa después de la escisión; en el que dicha toxina de insecto activa es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* o una variante o fragmento de la misma, en el que dicha variante y dicho fragmento tienen actividad pesticida y dicha variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con una secuencia de aminoácido de dicha toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*; y en el que dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQS (SEC ID N° 1).

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una protoxina de insecto, en la que dicha protoxina de insecto tiene al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado de modo que comprenda un sitio de escisión que es sensible a una cisteína proteasa de intestino de insecto y en el que la escisión de dicha protoxina de insecto mediante dicha cisteína proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto activa; en el que dicha toxina de insecto activa es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* o una variante o fragmento de la misma, en el que dicha variante y dicho fragmento tienen actividad pesticida y dicha variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con una secuencia de aminoácido de dicha toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*; y en el que:

(a) dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQS (SEC ID N° 1) y se introduce en la unión entre el segmento de formación cristalina en N-terminal de la protoxina y la porción C-terminal de la protoxina que comprende la protoxina de insecto activa después de la escisión;

(b) dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQS (SEC ID N° 1) en el que dicha toxina de insecto activa es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* es una toxina Cry8 o una variante o fragmento de la misma, en el que dicha variante y dicho fragmento tienen actividad pesticida y dicha variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con una secuencia de aminoácido de dicha toxina Cry8; y/o

(c) dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQSLXQS (SEC ID N° 3) o LSQSLSQS (SEC ID N° 4).

La invención también proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención unida de forma operable a un promotor que dirige la expresión en una planta.

La invención también proporciona un procedimiento para proteger una planta de una plaga de insectos, comprendiendo dicho procedimiento la introducción en dicha planta de al menos una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención unida de forma operable a un promotor que dirige la expresión en dicha planta, en el que la expresión de dicha construcción de polinucleótidos produce dicha protoxina de insecto en dicha planta, en el que dicha plaga de insecto ingiere dicha planta y dicha protoxina de insecto y en el que la escisión de dicha protoxina de insecto mediante dicha cisteína proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto activa en el intestino de dicha plaga de insecto.

La invención también proporciona una planta transformada que comprende al menos una construcción de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención unida de forma operable a un promotor que dirige la expresión en dicha planta.

La invención también proporciona una semilla transgénica de dicha planta en la que dicha semilla comprende dicha construcción de polinucleótidos.

La invención también proporciona una protoxina de insecto aislada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico de la invención.

La invención también proporciona una composición que comprende al menos una de dicha protoxina de insecto en combinación con un vehículo.

La invención también proporciona un procedimiento para afectar a una plaga de insecto que comprende aplicar dicha composición al ambiente de dicha plaga de insectos mediante un procedimiento seleccionado de rociar, espolvorear, transmitir y recubrir las semillas.

Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a composiciones y procedimientos que proporcionan protección a una planta de una plaga de insectos y que se puede usar para afectar a estas plagas de insecto. Las composiciones incluyen nuevas moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican protoxinas de insecto modificadas que proporcionan un procesamiento eficaz en toxinas activas dentro del intestino de la plaga de insectos que se alimenta de un huésped vegetal que expresa la protoxina operablemente unida a un promotor que dirige la expresión en una planta. La protoxina de insecto modificada comprende un sitio de activación proteolítica que se modifica para comprender un sitio de escisión que es sensible a una proteasa de intestino de insecto. La expresión de la construcción de polinucleótidos que codifica la protoxina de insecto modificada tiene como resultado la producción de la protoxina de insecto modificada dentro de las células de la planta transgénica. Cuando una plaga de insectos susceptible se alimenta de la planta transgénica y, por tanto, también ingiere la protoxina modificada que se ha expresado en la planta, la protoxina de insecto modificada es escindida por una proteasa de intestino de insecto para generar la toxina activa en el intestino del insecto y, de este modo, afectar a la plaga de insectos.

Los procedimientos para proteger las plantas de una plaga de insectos comprenden además introducir en una planta una construcción de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina de insecto modificada unida operablemente a un promotor que dirige la expresión en una planta. La toxina de insecto modificada comprende un sitio de activación proteolítica que se modifica para comprender un sitio de escisión que es sensible a una proteasa de intestino de insecto. La expresión de la construcción de polinucleótidos que codifica la toxina de insecto modificada tiene como resultado la producción de la toxina de insecto modificada dentro de las células de la planta transgénica. Cuando una plaga de insectos susceptible se alimenta de la planta transgénica y, por tanto, también ingiere la toxina de insecto modificada que se ha expresado en la planta, la toxina de insecto modificada es escindida por una proteasa de intestino de insecto para generar una toxina activa en el intestino del insecto que tiene mejor actividad pesticida respecto a la correspondiente toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica, afectando de este modo, a la plaga de insectos. Las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que codifican protoxinas de insecto modificadas que tienen al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible

a una proteasa de intestino de insecto. La escisión de una protoxina de insecto modificada mediante la proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto activa en el intestino del insecto. De acuerdo con la presente invención, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican toxinas de insecto modificadas que tienen al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a una proteasa de intestino de insecto. La escisión de la toxina de insecto modificada mediante una proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto en el intestino del insecto que muestra mejor actividad pesticida con respecto a la correspondiente toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica. Los ácidos nucleico divulgados en el presente documento encuentran utilidad en procedimientos para proteger una planta de una plaga de insectos. Con "Protoxina de insecto modificada" o "toxina de insecto modificada" se pretende decir una protoxina de insecto o toxina de insecto que comprende al menos un sitio de activación proteolítica que no se produce de forma natural en la protoxina de insecto o toxina de insecto y que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a la escisión por una proteasa de intestino de insecto. Con "sensible a la escisión" se pretende decir que la proteasa reconoce el sitio de escisión y, por tanto, es capaz de escindir la protoxina o toxina en el sitio de escisión. Normalmente, el sitio de activación proteolítica no natural se modifica dentro de una región de activación de la protoxina de insecto o toxina de insecto. Con "región de activación" en el contexto de una protoxina de insecto se pretende decir una región dentro de la protoxina de insecto en la que la escisión proteolítica en el sitio de activación modificado tiene como resultado la producción de una toxina de insecto biológicamente activa. La "región de activación" en el contexto de una toxina de insecto se refiere a una región dentro de la toxina de insecto en la que la escisión proteolítica en el sitio de activación modificado tiene como resultado la producción de una toxina de insecto con mejor actividad pesticida, tal como se define en el presente documento. Para los fines de la presente invención, una toxina de insecto biológicamente activa también se denomina "toxina", "toxina de insecto", "toxina de insecto activa", "toxina de insecto activada" o "forma activada" de una protoxina de insecto.

Las composiciones de la invención también incluyen construcciones de polinucleótidos que comprenden esta moléculas de ácido nucleico de protoxina de insecto y de toxina de insecto modificadas. Estas construcciones incluyen, entre otros, casetes de expresión, en los que las secuencias de nucleótidos codifican las protoxinas de insecto modificadas o toxinas de insecto modificadas están unidas operablemente a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal. La invención además proporciona células vegetales, plantas y semillas que comprenden una construcción de polinucleótidos divulgada en el presente documento. Las composiciones de la invención son útiles en la protección de una planta de plagas de insectos y se pueden usar para afectar a plagas de insectos que interactúan con una planta durante una o más fases del ciclo de vida del insecto.

Las nuevas moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que codifican una protoxina de insecto o toxina de insecto modificada que comprende al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a la escisión por una proteasa que reside en el intestino de un insecto. En realizaciones concretas, el sitio de activación proteolítica se modifica para comprender un sitio de escisión que es el sitio de escisión preferido para una nueva proteasa de intestino de insecto divulgada en el presente documento más adelante.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican protoxinas de insecto modificadas o toxinas de insecto modificadas se pueden usar en los procedimientos de la invención para proteger una planta de una plaga de insectos. Con "proteger una planta de una plaga de insectos" se quiere decir limitar o eliminar daños relacionados con plagas de insectos en una planta mediante, por ejemplo, inhibición de la capacidad de la plaga de insectos para crecer, alimentarse y/o reproducirse o matando la plaga de insectos. En algunas realizaciones, una construcción de polinucleótidos que comprende una secuencia de codificación de una protoxina de insecto modificada, unida operablemente a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal, se puede introducir en una planta. La expresión de esta construcción de polinucleótidos dentro de las células de esta planta produce la protoxina de insecto modificada en dichas células vegetales. Cuando una plaga de insectos susceptible se alimenta de las células de la planta que están expresando esta protoxina de insecto modificada, la protoxina de insecto modificada ingerida es escindida por la proteasa de intestino de insecto, de modo que se produce una toxina de insecto activa en el intestino del insecto y afecta a la plaga de insectos. De forma similar, cuando una construcción de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina de insecto modificada, unida operablemente a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal se introduce en una planta, se expresa la toxina de insecto modificada. Cuando una plaga de insectos se alimenta de una planta que expresa la toxina de insecto modificada, la toxina de insecto modificada ingerida es escindida por una proteasa de intestino de insecto, de modo que se produce una toxina de insecto activa en el intestino del insecto que muestra mejor actividad pesticida respecto a la toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica modificada. La presencia de la toxina de insecto con mejor actividad pesticida en el intestino de insecto afecta a la plaga de insectos.

En otras realizaciones, la invención se dirige a las protoxinas de insecto modificadas y toxinas de insecto modificadas codificadas por las moléculas de ácido nucleico de la presente invención y a procedimientos de uso de estos polipéptidos. Además se proporcionan composiciones y formulaciones que comprenden una protoxina de insecto modificada o una toxina de insecto modificada, o variantes o fragmentos de las mismas, que comprenden al menos un sitio de activación proteolítica no natural que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a la escisión por una proteasa de intestino de insecto. Las composiciones de la protoxina de insecto

modificada y la toxina de insecto modificada de la invención son útiles en procedimientos dirigidos a afectar a plagas de insectos. De este modo, la invención proporciona además un procedimiento para afectar a una plaga de insectos de una planta, que comprende aplicar, por ejemplo, una composición o formulación que comprende una protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada en el medioambiente de la plaga de insectos. Como se usa en el presente documento “afectar a una de insectos de una planta” incluye, entre otros, evitar que la plaga de insectos se siga alimentando de la planta, dañando a la plaga de insectos mediante, por ejemplo, inhibición de la capacidad del insecto para crecer, alimentarse y/o reproducirse, o matando la plaga de insectos. En una realización, la protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada se combina con un vehículo para la posterior aplicación en el medioambiente de la plaga de insectos. Aunque la invención no está ligada a teoría de operación alguna, en una realización, una plaga de insectos ingiere una composición de protoxina de insecto modificada. A continuación, la protoxina de insecto modificada es escindida por una proteasa de intestino de insecto para producir una toxina biológicamente activa en el intestino de la plaga de insectos, de modo que afecta a la plaga de insectos. Como alternativa, una plaga de insectos puede ingerir una composición de toxina de insecto modificada de modo que la toxina de insecto es escindida por una proteasa de intestino de insecto para producir una toxina de insecto activa en el intestino del insecto con mejor actividad respecto a la toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica. La presencia de una toxina de insecto con mejor actividad pesticida en el intestino de insecto afecta a la plaga de insectos, tal como se ha definido en el presente documento.

Un experto en la técnica reconocería que las composiciones y procedimientos de la invención se pueden usar solos o en combinación con otras composiciones y procedimientos para controlar las plagas de insectos que afectan a las plantas. Por ejemplo, la presente invención puede usarse junto con otras proteínas pesticidas o pesticidas químicos tradicionales.

Aunque la invención no depende de un mecanismo biológico concreto para proteger una planta de una plaga de insectos, la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención en una planta y la ingestión de esta planta por una plaga de insectos puede tener como resultado la producción de toxinas de insecto activas, o toxinas de insecto activas con mejor actividad pesticida, en el intestino del insecto, lo que tiene como resultado un incremento de la resistencia de la planta a plagas de insecto. Las plantas transgénicas de la invención encuentran utilidad en la agricultura en procedimientos para proteger plantas de plagas de insectos y para afectar a plagas de insectos. Ciertas realizaciones de la invención proporcionan plantas de cultivo transformadas, tales como, por ejemplo, plantas de maíz, que encuentran utilidad en procedimientos para afectar a plagas de insectos de la planta, tales como, por ejemplo, gusanos de raíz de maíz occidental, del norte, del sur y mejicano. Otras realizaciones de la invención proporcionan plantas de patata transformadas que encuentran utilidad en procedimientos para afectar al escarabajo de la patata de Colorado, plantas de algodón transformadas, que encuentran utilidad en procedimientos para afectar al picudo peruano del algodón, y césped transformado, que encuentra utilidad en procedimientos para afectar al insecto picudo de los prados, *Sphenophorus parvulus*.

Con “protoxina de insecto” o “protoxina” se quiere decir un polipéptido biológicamente inactivo que se convierte en una toxina de insecto activa tras la escisión en un sitio de activación proteolítica por una proteasa. En algunas realizaciones, la activación de la toxina procede eliminando un péptido en C terminal, un péptido en N terminal o péptidos de las regiones tanto N terminal como C terminal de la protoxina. “Toxina de insecto” se refiere a un polipéptido que muestra actividad pesticida, tal como, por ejemplo, la forma activada de una protoxina de insecto (es decir, el polipéptido escindido que posee actividad pesticida). Toxinas de insecto de la invención son las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* y fragmentos y variantes de las mismas. Como se usa en el presente documento, la expresión “actividad pesticida” se refiere a la actividad de una sustancia, tal como, por ejemplo, una proteína que puede medirse mediante ensayos rutinarios conocidos en la técnica. Dichos ensayos incluyen, entre otros, mortalidad de plagas, pérdida de peso de las plagas, repelencia de las plagas, atracción de las plagas y otros cambios de comportamiento y físicos de una plaga después de comer y estar expuesta a la sustancia durante un periodo de tiempo adecuado. Procedimientos generales incluyen la adición del compuesto u organismo experimental a la fuente de alimentos en un contenedor cerrado. Ensayos para evaluar la actividad pesticida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.570.005 y 6.339.144.

En algunas realizaciones, la toxina de insecto modificada es escindida por una proteasa de intestino de insecto para producir una toxina de insecto con mejor actividad pesticida con respecto a la correspondiente toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica. Como se usa en el presente documento, la expresión “mejor actividad pesticida” caracteriza una toxina de insecto de la invención que tiene una actividad pesticida potenciada respecto a la actividad de la correspondiente toxina de insecto no modificada (es decir, la toxina de insecto carece del sitio de activación proteolítica modificado). Mejor actividad pesticida se refiere a cualquier incremento de la actividad pesticida de la toxina de insecto escindida cuando se compara con la actividad pesticida de la toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica. En algunas realizaciones, un hallazgo de actividad pesticida mejorada o potenciada requiere una demostración de un incremento de la toxicidad de al menos 10 %, contra el insecto diana, y, más preferentemente, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 100%, 200%, o mayor incremento de la toxicidad respecto a la actividad pesticida de la toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica modificada, determinado frente al mismo insecto. También se puede usar cualquier ensayo estándar para medir la actividad pesticida para evaluar los incrementos de la actividad pesticida.

La etapa de desarrollo preferida para analizar la actividad pesticida es la etapa de larva o formas inmaduras de un insecto de interés. Los insectos pueden criarse en total oscuridad a una temperatura desde aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C y desde aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 % de humedad relativa. Los bioensayos se pueden realizar tal como se ha descrito en Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83(6): 2480-2485. El experto en la técnica conoce bien procedimientos de cría de larvas de insectos y realizar bioensayos.

La toxina de insecto de la invención es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt) y (δ -endotoxina). Véase, por ejemplo, Crickmore y col. (2004) *Bacillus Thuringiensis Toxin Nomenclature at lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt* y Crickmore y col. (1998) *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62:807-813. Las δ -endotoxinas son tóxicas para las larvas de una serie de plagas de insecto, incluidos los miembros de los órdenes de lepidópteros, dípteros y coleópteros. Estas protoxinas de insecto de la invención están limitadas a las toxinas Cry, incluidas, por ejemplo, Cry1, Cry 2, Cry3, Cry4, Cry5, Cry6, Cry7, Cry8 y Cry9. De particular interés son las δ -endotoxinas de tipo Cry8. Las toxinas "de tipo Cry8" incluyen la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos que comparten un grado alto de identidad o similitud de secuencia con las secuencias descritas anteriormente clasificadas como Cry8, que incluyen toxinas como, por ejemplo, Cry8Bb1 (véase el número de registro en Genbank CA057542; SEC ID N° 10 (secuencia de nucleótidos; SEC ID N° 11 (secuencia de aminoácidos) y Cry8Bc1 (véase el número de registro en Genbank CA057543; SEC ID N° 12 (secuencia de nucleótidos), SEC ID N° 13 (secuencia de aminoácidos)). Véase la solicitud de patente de EE.UU. pendiente de tramitación n° 10/606.320, titulada "Proteínas que codifican genes con actividad pesticida", presentada el 25 de junio de 2003 y publicada como US 20040091505 el 13 de mayo de 2004. Con "protoxina de insecto de tipo Cry8" se pretende decir el polipéptido biológicamente inactivo que se convierte en la toxina de insecto de tipo Cry8 activada tras la escisión en un sitio de activación proteolítica mediante una proteasa. La toxina de insecto de tipo Cry8 activada es la que tiene actividad pesticida. Como se usa en el presente documento, "toxina de insecto de tipo Cry8" se refiere a un polipéptido pesticida biológicamente activo que comparte un grado alto de identidad o similitud de secuencia con las secuencias de toxina de insecto Cry8.

Las toxinas Bt Cry son una familia de proteínas insecticidas que se sintetizan como protoxinas y cristalizan como inclusiones parasporales. Cuando son ingeridas por una plaga de insectos, la estructura microcristalina se disuelve por la acción del pH alcalino del intestino medio del insecto y la protoxina es escindida por las proteasas del intestino del insecto para generar la toxina activa. La toxina Bt activada se une a los receptores en el epitelio del intestino del insecto, provocando lesiones en la membrana e hinchazón asociada y lisis del intestino del insecto. La muerte del insecto se produce por inanición y septicemia. Véase, por ejemplo., Li y col. (1991) *Nature* 353:815-821.

La forma de protoxina de las toxinas Cry contiene un segmento formador cristalino. Una comparación de las secuencias de aminoácidos de toxinas Cry activas de diferentes especificidades pone de manifiesto adicionalmente cinco bloques de secuencia altamente conservados. Estructuralmente, las toxinas Cry comprenden tres dominios distintos que son, del extremo N al C: un agrupamiento de siete hélices alfa implicadas en la formación de poros (denominadas "dominio 1"), tres láminas beta antiparalelas implicadas en la unión celular (denominadas "dominio 2") y un sándwich beta (denominado "dominio 3"). Los expertos en la materia conocen la localización y propiedades de estos dominios. Véase, por ejemplo, Li y col., (1991) *ant.* y Morse y col., (2001) *Structure* 9:409-417.

Las protoxinas de insecto modificadas o toxinas de insecto modificadas de la invención pueden obtenerse de cualquier protoxina de insecto o toxina de insecto nativa (es decir, natural) adecuada, tal como las Bt δ -endotoxinas nativas descritas anteriormente, mediante modificación del sitio de activación proteolítica de interés dentro de la secuencia de la protoxina de insecto o toxina de insecto nativa. De este modo, se puede alterar una secuencia de nucleótidos que codifica la protoxina de insecto o toxina de insecto nativa de interés mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio, para comprender los codones del sitio de activación proteolítica de interés, es decir un sitio sensible a las proteasas de intestino de insecto. Como se ha indicado anteriormente, los del(los) sitio(s) de activación proteolítica de interés se modifican dentro de la región de la secuencia codificadora nativa que corresponde a un sitio de activación de la protoxina de insecto o toxina de insecto nativa, de modo que la escisión proteolítica de la protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada codificada mediante la proteasa de interés tiene como resultado la producción de la toxina de insecto activa o una toxina de insecto activa con una actividad pesticida mejorada.

Como alternativa, las protoxinas de insecto modificadas o toxinas de insecto modificadas de la invención pueden obtenerse de fragmentos o variantes protoxinas de insecto nativas o toxinas de insecto nativas, como se ha definido en el presente documento más adelante, siempre que el fragmento o variante de la protoxina de insecto o toxina de insecto nativa da una toxina de insecto activada (es decir, que tiene actividad pesticida) o una toxina que tiene mejor actividad pesticida en el caso de una toxina de insecto modificada, tras la escisión proteolítica por la proteasa de intestino de insecto de interés. De este modo, las secuencias codificadoras para dichos fragmentos y variantes de la protoxina de insecto nativa o toxina de insecto nativa sirven como material de partida para modificar en los codones para el (los) sitios de activación proteolítica de interés. En esencia, una protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada diseñada de este modo representa un fragmento o variante de la protoxina de insecto o toxina de insecto nativa que se ha modificado para comprender el sitio de activación proteolítica de interés dentro de una región de activación del respectivo polipéptido. Ejemplos de variantes y fragmentos de protoxinas y toxinas de insecto se proporcionan en la solicitud de patente de EE.UU. pendiente de tramitación n° .1 0/606,320 titulada

"Genes que codifican proteínas con actividad pesticida", presentada el 25 de junio de 2003 y publicada como US 2004 0091505 el 13 de mayo de 2004 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 1 0/746.1 titulada "Genes que codifican proteínas con actividad pesticida" presentada el 24 de diciembre de 2003 y publicada como US 2004 0210963 el 21 de octubre de 2004.

Se reconoce que las variaciones en una protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada divulgada en el presente documento se pueden introducir a nivel de la molécula de ácido nucleico que codifica una forma modificada de una protoxina de insecto o toxina de insecto nativa con el fin de producir una variante de la protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada. Es decir, habiendo divulgado una secuencia de nucleótidos que codifica una protoxina de insecto o toxina de insecto nativa con al menos un sitio de activación proteolítica de interés modificada dentro de la secuencia nativa, un experto en la materia puede introducir después variaciones en la secuencia de nucleótidos divulgada de la invención, de modo que la protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada codificada es una variante de la protoxina de insecto nativa modificada o toxina de insecto nativa modificada. Dichas variaciones incluyen delecciones, sustituciones y adiciones de uno o más residuos, e incluyen variaciones que tienen como resultado formas truncadas de la protoxina de insecto modificada. Cualquiera de estas variaciones se puede introducir en la secuencia de nucleótidos que codifica la protoxina de insecto nativa modificada o toxina de insecto modificada, siempre que la variante codificada de la protoxina de insecto nativa modificada o toxina de insecto modificada se pueda escindir para producir una toxina de insecto biológicamente activa, es decir una toxina de insecto que tiene actividad pesticida como ya se ha indicado anteriormente en otro lugar, o, en el caso de una toxina de insecto modificada, una toxina con actividad pesticida mejorada respecto a la toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítico. Dichas variantes y fragmentos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. pendiente de tramitación nº 1 0/606.320, presentada el 25 de junio de 2003 y publicada como US 2004 0091505 el 13 de mayo de 2004, y la patente de EE.UU. nº 5.877.012.

Con "proteasa" se pretende decir una enzima que escinde los polipéptidos hidrolizando los enlaces peptídicos. Como se usa en el presente documento, "proteasa de intestino de insecto" se refiere a una cisteína proteasa que se encuentra de forma natural en el tracto digestivo de una plaga de insectos. Los investigadores han establecido que en el intestino de insectos se expresa una amplia gama de proteasas, incluidas cisteína y serina proteasas. Véase, por ejemplo., Shiba y col., (2001) Arch. Biochem. Biophys. 390:28-34; véase también, Purcell y col. (1992) Insect Biochem. Mol. Biol. 22:1-47; Koiwa y col., (2000) FEBS Letters 471:67-70; Koiwa y col., (2000) Anal. Biochem. 282: 153-155. En la presente invención se puede usar cualquier cisteína proteasa de intestino de insecto. En algunas realizaciones, la proteasa de intestino de insecto es, por ejemplo, una proteasa de tipo catepsina L. En realizaciones concretas, la proteasa de intestino de insecto es una proteasa de tipo catepsina L divulgada en el presente documento más adelante.

Con un "sitio proteolítico" se quiere decir una secuencia de aminoácidos que confiere sensibilidad a una clase de proteasas o a una proteasa concreta de modo que un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos es escindido en dicho sitio por miembros de la clase de proteasas o de la proteasa concreta. Como se usa en el presente documento, un "sitio de activación proteolítica" es un sitio proteolítico que se ha modificado en una región de activación de una protoxina de insecto o de una toxina de insecto. Como se usa en el presente documento en el contexto de una protoxina de insecto, una "región de activación" es una región dentro de una protoxina de insecto de modo que la escisión proteolítica en el sitio de activación proteolítica dentro de la región de activación genera una toxina de insecto biológicamente activa. Una "región de activación" en una toxina de insecto se refiere a una región de una toxina de insecto de modo que la escisión proteolítica en el sitio de activación proteolítica dentro de la región de activación genera una toxina de insecto que muestra actividad pesticida mejorada con respecto a la correspondiente toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica modificada. Se dice que un sitio proteolítico es "sensible" a la(s) proteasa(s) que reconoce(n) dicho sitio. Se reconoce que la eficiencia de la digestión proteolítica variará y que una disminución de la eficiencia de la digestión proteolítica puede conducir a un incremento de la estabilidad o la longevidad del polipéptido dentro de una célula vegetal o dentro de un intestino de insecto. Por tanto, un sitio proteolítico puede conferir sensibilidad a más de una proteasa o clase de proteasas, pero la eficiencia de la digestión en dicho sitio por acción de varias proteasas puede variar.

Los sitios proteolíticos incluyen, por ejemplo, sitios de tripsina, sitios de quimotripsina, sitios de papaína, sitios de catepsina y sitios de tipo catepsina. Los sitios proteolíticos para proteasas concretas a menudo comprenden "motivos", o patrones de secuencia, que se sabe que confieren sensibilidad a una proteasa concreta. Por tanto, por ejemplo, los motivos del sitio de catepsina incluyen FRR, un sitio de escisión por proteasa catepsina L; RR, un sitio de escisión por tripsina y catepsina B; LKM, un sitio de quimotripsina; y FF, un sitio de catepsina D. Un supuesto sitio proteolítico es una secuencia que comprende un motivo o comprende una secuencia similar a un motivo, pero que no se ha demostrado que sea objeto de digestión por la proteasa correspondiente. El procedimiento de la invención para producir una protoxina de insecto modificada comprende insertar un sitio de escisión que comprende LXQS (SEC ID Nº 1) en la protoxina de insecto. Las protoxinas de insecto modificadas o toxinas de insecto modificadas de la invención tienen un sitio de activación proteolítica que comprende el motivo LXQS (SEC ID Nº 1), más particularmente LSQS (SEC ID Nº 2), LXQSLXQS (SEC ID Nº 3) o LSQSLXQS (SEC ID Nº 4).

El sitio de activación proteolítica modificado puede reemplazar a un sitio natural dentro de una protoxina de insectos o toxina de insectos. Por ejemplo, la secuencia NGSR (SEC ID Nº 5) localizada entre el bucle de hélices alfa 3 y 4

en el dominio I de la protoxina de insecto Cry8 es sustituida por LSQS (SEC ID N° 2) o LSQSLSQS (SEC ID N° 4). De acuerdo con la presente invención, el sitio de activación proteolítica se introduce en la unión entre el N-terminal del segmento formador cristalino de la protoxina y la porción C-terminal de la protoxina que comprende la toxina de insecto activa tras la escisión. En realizaciones adicionales de la invención, se pueden introducir sitios de activación proteolítica adicionales en la porción en C terminal de la protoxina, la porción N-terminal de la protoxina o tanto en la región N-terminal y C-terminal. Asimismo, en algunas realizaciones, la escisión de la protoxina puede tener como resultado la eliminación de un péptido en N terminal, un péptido en C terminal o péptidos de las regiones tanto N terminal como C terminal de la proteína.

Adicionalmente se reconoce que las protoxinas de insecto o toxinas de insecto expresadas en una planta pueden ser susceptibles a escisión adicional por las proteasas vegetales. Con "proteasa vegetal" se quiere decir una proteasa que se encuentra de forma natural en cualquier planta de la invención. Mediante investigación previa se ha demostrado que las plantas expresan diversas proteasas, incluidas serina y cisteína proteasas. Véase, por ejemplo., Goodfellow y col., (1993) Plant Physiol. 101 :415-419; Pechan y col. (1999) Plant Mol. Biol. 40: 111-119; Lid y col. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99:5460-5465. En algunas realizaciones, la proteasa vegetal es una cisteína proteasa, por ejemplo, una proteasa de tipo cathepsina. En una realización, la cisteína proteasa es una proteasa de tipo cathepsina B. La escisión de la protoxina de insecto o toxina de insecto por una proteasa vegetal en un sitio proteolítico natural puede conducir a, por ejemplo, procesamiento, degradación o activación prematuros de la protoxina o toxina en la planta, en lugar de en el intestino del insecto donde será más eficaz. En realizaciones concretas, la incorporación de un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a una proteasa de intestino de insecto también estabiliza la protoxina o toxina de insecto en la planta. Como se usa en el presente documento, "estabiliza la toxina de insecto en la planta" significa que la incorporación del sitio de activación proteolítica protege la protoxina de insecto o toxina de insecto de, por ejemplo, el procesamiento, degradación (completa o parcial) o activación prematuros en la planta. La escisión de la protoxina de insecto o toxina de insecto en un sitio proteolítico natural por una proteasa vegetal puede también conducir a la inactivación proteolítica de la toxina. Como se usa en el presente documento, "inactivación proteolítica" indica escisión de la protoxina de insecto o toxina de insecto en un sitio proteolítico natural por una proteasa vegetal, en la que la escisión en dicho sitio reduce o elimina la actividad pesticida de la toxina de insecto resultante. En una realización, la protoxina de insecto o toxina de insecto se modifica para reemplazar un sitio proteolítico natural que es sensible a la escisión por una proteasa vegetal con un sitio de protección proteolítica. Con un "sitio de protección proteolítica" se quiere decir un sitio que no es sensible a la escisión por una proteasa vegetal endógena. La sustitución de un sitio proteolítico natural sensible a la escisión por una proteasa vegetal con un sitio de protección proteolítica protege a la protoxina de insecto o toxina de insecto de la inactivación proteolítica por la planta. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. pendiente de tramitación n° 10/746.914 titulada "Genes que codifican proteínas con actividad pesticida", presentada el 24 de diciembre de 2003 y publicada como US 2004 0091505 el 13 de mayo de 2004. La protección de una protoxina de insecto o una toxina de insecto del procesamiento, degradación o inactivación prematuros por cualquier proteasa vegetal está abarcada dentro de la presente invención.

Adicionalmente se reconoce que las protoxinas de insecto o toxinas de insecto expresadas en una planta pueden ser susceptibles a escisión por las proteasas de intestino de insecto tras la ingestión por una plaga de insectos. La escisión de una toxina de insecto activa por una proteasa de intestino de insecto puede conducir a la inactivación proteolítica de la toxina. En este contacto, "inactivación proteolítica" se refiere a la escisión de una protoxina de insecto o toxina de insecto en un sitio proteolítico por una proteasa vegetal de insecto, en la que la escisión en dicho sitio reduce o elimina la actividad pesticida de la toxina resultante. En una realización, una protoxina o toxina de insecto se modifica para reemplazar un sitio proteolítico que es sensible a la escisión por una proteasa de intestino de insecto con un sitio de protección proteolítica. En este contexto, sitio de protección proteolítica se refiere a un sitio que no es sensible a la escisión por una proteasa de intestino de insecto. La sustitución de un sitio proteolítico natural sensible a la escisión por una proteasa de intestino de insecto con un sitio de protección proteolítica protege a la protoxina de insecto o toxina de insecto de la inactivación proteolítica en el intestino de insecto. La eliminación de sitios sensibles a la proteasa puede evitar la degradación rápida de la protoxina de insecto o toxina de insecto en el intestino medio de insecto tras la ingestión, dejando que la toxina alcance intacta su diana y alcance más rápidamente una dosis insecticida dentro de la plaga de insectos. En una realización, el sitio de protección proteolítica se modifica de modo que sea insensible a la escisión por una proteasa de tipo cathepsina L de la SEC ID N° 7 o 9.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" incluye la referencia a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma mono o bicatenaria y, a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos (p. ej., ácidos nucleicos peptídicos) que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales en cuanto a que hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de un modo similar a nucleótidos naturales.

El uso de las expresiones "construcciones polinucleotídicas" o "construcciones nucleotídicas" en el presente documento no está destinado a limitar la presente invención a construcciones nucleotídicas que comprenden ADN. Los expertos en la técnica reconocerán que las construcciones nucleotídicas, en particular polinucleótidos y oligonucleótidos compuestos por ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, pueden también emplearse en los procedimientos divulgados en el presente documento. Las construcciones nucleotídicas, ácidos nucleicos y secuencias nucleotídicas de la invención abarcan adicionalmente todas las formas

complementarias de dichas construcciones, moléculas y secuencias. Además, las construcciones nucleotídicas, moléculas nucleotídicas y secuencias nucleotídicas de la presente invención abarca todas las construcciones nucleotídicas, moléculas y secuencias que se pueden emplear en los procedimientos de la presente invención para transformar las plantas, incluidas, entre otras, las compuestas por desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y combinaciones de los mismos. Dichos desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos incluyen moléculas que se producen de forma natural y análogos sintéticos. Las construcciones nucleotídicas, los ácidos nucleicos y las secuencias nucleotídicas de la invención también abarcan todas las formas de construcciones nucleotídicas incluidas, entre otras, formas monocatenarias, formas bicatenarias, orquillas y estructuras de tallo y bucle, y similares.

Como se usa en el presente documento, los términos “que codifica” o “codificado”, cuando se usan en el contexto de un ácido nucleico especificado significan que el ácido nucleico comprende la información requerida para dirigir la traducción de la secuencia nucleotídica en una proteína especificada. La información por la cual una proteína está codificada se especifica mediante el uso de codones. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias no traducidas (p. ej., intrones) dentro de las regiones traducidas del ácido nucleico o pueden carecer de dichas secuencias no traducidas intermedias (p. ej., como en ADNc).

Como se usa en el presente documento, la expresión “modificado de forma recombinante” o “sometido a ingeniería” o “modificado” indica el uso de tecnología de ADN recombinante para introducir (p.ej., mediante ingeniería) un cambio en la estructura de la proteína en base a los conocimientos del mecanismo de acción de la proteína y una consideración de los aminoácidos introducidos, delecionados o sustituidos. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una protoxina de insecto se puede someter a ingeniería para comprender una secuencia de codificación de un sitio de activación proteolítico como se describe en el presente documento en otro lugar.

Como se usa en el presente documento, “secuencia de longitud completa” en referencia a un polinucleótido especificado o su proteína codificada significa que tiene la totalidad de la secuencia de ácidos nucleicos o la totalidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia nativa. Por “secuencia nativa” se quiere decir una secuencia endógena, es decir una secuencia no sometida a ingeniería encontrada en el genoma de un organismo. Un polinucleótido de longitud completa codifica la forma de longitud completa de la proteína especificada.

Como se usa en el presente documento, el término “antisentido” usado en el contexto de la orientación de una secuencia de nucleótidos se refiere a una secuencia polinucleotídica dúplex que está operablemente unida a un promotor en una orientación en la que se transcribe la hebra antisentido. La hebra antisentido es suficientemente complementaria de un producto de transcripción endógeno tal que la traducción del producto de transcripción endógeno a menudo se inhibe. Por tanto, cuando el término “antisentido” se usa en el contexto de una secuencia de nucleótidos concreta, el término se refiere a la hebra complementaria del producto de transcripción de referencia.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como polímeros de aminoácidos naturales.

Los términos “residuo” o “residuo de aminoácido” o “aminoácido” se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido (de forma colectiva “proteína”). El aminoácido puede ser un aminoácido natural y, a menos que se limite de otro modo, puede abarcar análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de forma similar a los aminoácidos naturales.

Los polipéptidos de la invención se pueden producir a partir de un ácido nucleico divulgado en el presente documento o mediante el uso de técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, una proteína truncada de la invención se puede producir mediante expresión de un ácido nucleico recombinante de la invención en una célula huésped adecuada o, como alternativa, mediante una combinación de procedimientos ex vivo, tales como digestión y purificación de proteasa.

La invención abarca composiciones de polinucleótidos o de proteínas aisladas o sustancialmente purificadas. Un polinucleótido o proteína “aislado” o “purificado” o una porción biológicamente activa de los mismos está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con el polinucleótido o proteína como se encuentra en su ambiente natural. Por tanto, un polinucleótido o proteína aislado o purificado está sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. Óptimamente, un polipéptido “aislado” está libre de secuencias (óptimamente secuencias que codifican proteínas) que flanquean el polinucleótido de forma natural (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del polinucleótido) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el polinucleótido. Por ejemplo, en varias realizaciones, el polinucleótido aislado puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencia nucleotídica que flanquean de forma natural el polinucleótido en el ADN genómico de la célula de la que deriva el polinucleótido. Una proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tiene menos de aproximadamente %, 20%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de la

proteína contaminante. Cuando la proteína de la invención o una porción biológicamente activa de la misma se produce de forma recombinante, óptimamente el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5% o 1% (en peso seco) de los precursores químicos o sustancias químicas de interés no proteicas.

Los fragmentos y variantes de los polinucleótidos y proteínas divulgados codificados de este modo también entran dentro de la presente invención. Por "fragmento" se quiere decir una porción del polinucleótido o una porción de la secuencia de aminoácidos y, por tanto, la proteína codificada en la misma. Fragmentos de un polinucleótido puede codificar fragmentos de proteína que conservan la actividad biológica de la proteína nativa. Por tanto, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos de la protoxina de insecto pueden codificar fragmentos proteicos que se convierten en toxinas de insecto activas (es decir, poseen actividad pesticida) tras la escisión con una proteasa. Los fragmentos de una toxina de insecto pueden codificar fragmentos proteicos que se convierten en toxinas de insecto con actividad pesticida mejorada tras la escisión con una proteasa de intestino de insecto. En contraste, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos de proteasa de intestino de insecto de la invención pueden codificar fragmentos proteicos que tienen actividad proteolítica tal como se ha descrito en el presente documento y reconocen el sitio de escisión proteolítica preferido de la proteasa nativa. Como alternativa, los fragmentos de un polinucleótido que son útiles como sondas de hibridación en general no codifican fragmentos de proteínas que conservan actividad biológica. Por tanto, los fragmentos de una secuencia de nucleótidos pueden variar desde al menos aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos y hasta el polinucleótido de longitud completa que codifica los polipéptidos de la invención.

Un fragmento de un polinucleótido de la invención que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de la invención codificará al menos 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos contiguos o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína de longitud completa de la invención. Los fragmentos de una secuencia de nucleótidos que son útiles como sondas de hibridación o cebadores de PCR, en general, no necesitan codificar una porción biológicamente activa de una proteína de la invención.

Por tanto, un fragmento de un polinucleótido divulgado en el presente documento puede codificar una porción biológicamente activa de una protoxina de insecto, una toxina de insecto o una proteasa de intestino de insecto, o puede ser un fragmento que se puede usar como sonda de hibridación o cebador de PCR usando los procedimientos que se divulgan a continuación. Una porción biológicamente activa de una proteasa de intestino de insecto se puede preparar aislando una porción de uno de los polinucleótidos de proteasa de intestino de insecto, de la invención, expresando la porción codificada de la proteasa (p. ej., mediante expresión recombinante in vitro) y evaluando la actividad de la porción codificada de la proteasa de intestino de insecto. Los polinucleótidos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos de la invención comprenden al menos 16, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300 o 1.400 nucleótidos contiguos o hasta el número de nucleótidos presentes en un polinucleótido de longitud completa divulgado en el presente documento.

Con "variantes" se quiere decir secuencias sustancialmente similares. Para los polinucleótidos, una variante comprende una delección y/o adición de uno o más nucleótidos en uno o más sitios internos dentro del polinucleótido nativo y/o una sustitución de uno o más nucleótidos en uno o más sitios en el polinucleótido nativo. Como se usa en el presente documento, un polinucleótido o polipéptido "nativo" comprende una secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos natural, respectivamente. Para los polinucleótidos, variantes conservadoras incluyen las secuencias que, dada la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos de una de las protoxinas de insecto o proteasas de intestino de insecto. Las variantes alélicas naturales como estas se pueden identificar con el uso de las técnicas de biología molecular bien conocidas como, por ejemplo, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación, como se indica más adelante. Los polinucleótidos variantes también incluyen polinucleótidos derivados sintéticamente, tales como los generados mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio, pero que todavía codifican una proteína de la invención. En general, las variantes de un polinucleótido concreto de la invención tendrán una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con dicho polinucleótido concreto, determinado mediante programas de alineación de secuencia y parámetros descritos en otro lugar del presente documento.

Variantes de un polinucleótido concreto de la invención (es decir, el polinucleótido de referencia) también se puede evaluar mediante comparación del porcentaje de identidad de secuencia entre el polipéptido codificado por un polinucleótido variante y el polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Por tanto, por ejemplo, se divulga un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con un porcentaje de identidad de secuencia dado con el polipéptido de SEC ID N° 9. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos se puede calcular usando programas de alineación de secuencia y parámetros descritos en otro lugar del presente documento. Cuando cualquier par dado de polinucleótidos de la invención se evalúa mediante comparación del porcentaje de identidad de secuencia compartido por los dos polipéptidos que codifican, el porcentaje de identidad de secuencia entre los dos polipéptidos codificados es una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%.

Con proteína "variante" se quiere decir una proteína derivada de la proteína nativa mediante delección o adición de

uno o más aminoácidos en uno o más sitios internos en la proteína nativa y/o mediante sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa. Las proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, por ejemplo, la actividad proteasa como se describe en el presente documento. Dichas variantes pueden ser el resultado de, por ejemplo, polimorfismo o de manipulación humana. Las variantes biológicamente activas de una protoxina de insecto nativa o de proteasa de intestino de insecto de la invención tendrán una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con dicha secuencia de aminoácidos para la proteína, determinado mediante programas de alineación de secuencia y parámetros descritos en otro lugar del presente documento. Una variante biológicamente activa de una proteína de la invención puede diferir de la proteína en solo 1-15 residuos de aminoácidos, solo 1-10, tal como 610, solo 5, solo 4, 3, 2 o incluso 1 residuo de aminoácido.

Las proteínas de la invención pueden alterarse de diferentes modos, incluidas sustituciones, delecciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. En general, en la técnica se conocen procedimientos para dichas manipulaciones. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos y fragmentos de las proteínas protoxina o proteasa mediante mutaciones en el ADN. En la técnica se conocen procedimientos para mutagénesis y alteraciones de polinucleótidos. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel y col. (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; patente de EE.UU. n° 4.873.192; Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York) y las referencias citadas en la misma. Guías para las sustituciones adecuadas de aminoácidos que no afectan a la actividad biológica de la proteína de interés se pueden encontrar en el modelo de Dayhoff y col. (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Las sustituciones conservadoras, tales como intercambio de un aminoácido por otro con propiedades similares, pueden ser óptimas.

Por tanto, los genes y polinucleótidos de la invención incluyen secuencias naturales así como formas mutantes. Asimismo, las proteínas de la invención abarcan proteínas naturales así como variaciones y formas modificadas de las mismas. Dichas variantes continuarán poseyendo la actividad deseada. Obviamente, las mutaciones que se realizarán en el ADN que codifica la variante no deben introducir la secuencia fuera del marco de lectura y, óptimamente, no crearán regiones complementarias que podrían producir estructuras de ARNm secundario. Véase la publicación de solicitud de patente EP n° 75.444.

No se espera que las delecciones, inserciones y sustituciones de las secuencias proteicas abarcadas en el presente documento produzcan cambios radicales en las características de la proteína. No obstante, cuando es difícil predecir el efecto exacto de la sustitución, delección o inserción con antelación, el experto en la técnica apreciará que el efecto se evaluará mediante ensayos de detección selectiva de rutina. Es decir, la actividad de una protoxina o toxina de insecto se puede evaluar mediante, por ejemplo, ensayos de alimentación de insectos. Véase, por ejemplo., Marrone y col., (1985) J. Econ. Entomol. 78:290-293 y Czapla y Lang (1990) ant. Los ensayos para evaluar la actividad proteolítica de una proteasa de intestino de insecto de la invención son bien conocidos en la técnica.

Polinucleótidos y proteínas variantes también abarcan secuencias y proteínas derivadas de un procedimiento mutagénico y recombinogénico, tal como lanzadera de ADN. Con dicho procedimiento, se puede manipular una o más secuencias de codificación diferentes para crear una nueva protoxina, toxina o proteína proteasa que poseen las propiedades deseadas. De este modo, las bibliotecas de polinucleótidos recombinantes se generan a partir de una población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprenden regiones de secuencia que tiene una identidad de secuencia sustancial y pueden recombinarse de forma homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, usando este enfoque, los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés pueden lanzarse entre el gen de la invención y otros genes conocidos para obtener un nuevo gen que codifica una proteína con una propiedad de interés mejorada, Tal como una mayor K_m en el caso de una proteasa de intestino de insecto. En la técnica se conocen estrategias para dicha lanzadera de ADN. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Crameri y col., (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore y col., (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang y col., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Crameri y col. (1998) Nature 391 :288-291; y las patentes de EE.UU. n° 5.605.793 y 5.837.458.

Los polinucleótidos de la invención se pueden usar para aislar secuencias correspondientes de otros organismos, en particular otras plantas o insectos. De este modo, procedimientos tales como PCR, hibridación y similares se pueden usar para identificar dichas secuencias en base a su homología de secuencia con las secuencias expuestas en el presente documento. Las secuencias aisladas basadas en su identidad de secuencia con la totalidad de las secuencias de la protoxina de insecto, toxina o proteasa de intestino de insecto expuestas en el presente documento o con variantes y fragmentos de las mismas entran dentro de la presente invención. Dichas secuencias incluyen secuencias que son ortólogos de las secuencias divulgadas. Con "ortólogos" se quiere decir genes derivados de un gen ancestral común y que se encuentran en diferentes especies como resultado de especiación. Los genes encontrados en diferentes especies se consideran ortólogos cuando sus secuencias de nucleótidos y/o sus secuencias proteicas codificadas comparten al menos el 80%, 85%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia. A menudo, las funciones de los ortólogos a menudo están altamente conservadas entre especies. Por tanto, los polinucleótidos aislados que codifican una protoxina de insecto, toxina de insecto o una proteasa de intestino de insecto y que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias

divulgadas en el presente documento, o con variantes y fragmentos de las mismas, entran dentro de la presente invención.

En un abordaje de PCR, se pueden diseñar cebadores oligonucleotídicos para usar en reacciones de PCR para amplificar las secuencias de ADN correspondientes de ADNc o ADN genómico extraído de cualquier organismo de interés. Generalmente en la técnica se conocen procedimientos para diseñar cebadores de PCR y clonación de PCR y se divulgan en Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York). Véase también Innis y col., eds. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, New York); Innis and Gelfand, eds. (1995) *PCR Strategies* (Academic Press, New York); e Innis y Gelfand, eds. (1999) *PCR Methods Manual* (Academic Press, New York). Los procedimientos de PCR conocidos incluyen, entre otros, procedimientos que usan cebadores pareados, cebadores anidados, cebadores sencillos específicos, cebadores degenerados, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de vector, cebadores parcialmente mal apareados y similares.

En las técnicas de hibridación se usa todo o parte de un polinucleótido conocido como sonda que hibrida de forma selectiva con otros polinucleótidos correspondientes presentes en una población de fragmentos de ADN genómico clonado o fragmentos de ADNc (es decir, bibliotecas genómicas o de ADNc) de un organismo escogido. Las sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN u otros oligonucleótidos y pueden marcarse con un grupo detectable tal como ^{32}P o cualquier otro marcador detectable. Por tanto, por ejemplo, las sondas para hibridación se pueden fabricar marcando oligonucleótidos sintéticos basados en los polinucleótidos de la invención. Generalmente en la técnica se conocen procedimientos para la preparación de sondas para hibridación y para la construcción de bibliotecas de ADNc y genómicas y se divulgan en Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Por ejemplo, la totalidad de un polinucleótido de proteasa de intestino de insecto divulgado en el presente documento, o una o más porciones del mismo, se puede usar como sonda capaz de hibridar específicamente con los correspondientes polinucleótidos de proteasa de intestino de insecto y ARN mensajeros. Para conseguir una hibridación específica en diversas condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas entre secuencias de polinucleótidos de proteasa de intestino de insecto y, óptimamente, tienen una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y, más óptimamente, una longitud de al menos aproximadamente 20 nucleótidos. Dichas sondas se pueden usar para amplificar los polinucleótidos de proteasa de intestino de insecto de un organismo escogido mediante PCR. Esta técnica se puede usar para aislar secuencias de codificación adicionales a partir de un organismo deseado o como ensayo diagnóstico para determinar la presencia de secuencias de codificación en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen detección selectiva de hibridación de bibliotecas de ADN sembrado (bien placas o colonias; véase, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York)).

La hibridación de dichas secuencias se puede llevar a cabo en condiciones rigurosas. Por "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" se quiere decir condiciones en las que una sonda hibridará con su secuencia diana en un grado detectablemente superior que con otras secuencias (p. ej., al menos 2 veces sobre el basal). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias distintas. Controlando la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado, las secuencias diana que son 100% complementarias con la sonda se pueden identificar (sondaje homólogo). Como alternativa, las condiciones de rigurosidad se pueden ajustar para permitir algunos apareamientos erróneos en las secuencias de modo que se detectan grados menores de similitud (sondaje heterólogo). En general, una sonda tiene una longitud de menos de aproximadamente 1000 nucleótidos, óptimamente menos de 500 nucleótidos de longitud.

Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquéllas en las que la concentración de sales es inferior a aproximadamente 1,5M de ion Na, normalmente una concentración del ion Na (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0M a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para las sondas cortas (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para las sondas largas (p. ej., de más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Condiciones de rigurosidad baja de ejemplo incluyen hibridación con una solución tampón de 30 a 35 % de formamida, NaCl 1M, 1% de SDS (dodecilsulfato sódico) a 37 °C y un lavado en de 1X a 2X de SSC (20 x SSC= NaCl 3,0M/citrato sódico 0,3M) a una temperatura de 50 a 55 °C. Condiciones de rigurosidad moderada de ejemplo incluyen hibridación en de 40 a 45 % de formamida, NaCl 1M, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en de 0,5X a 1X de SSC a una temperatura de 55 a 60 °C. Condiciones de rigurosidad alta de ejemplo incluyen hibridación en 50 % de formamida, NaCl 1M, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en de 0,1 X SSC a una temperatura de 60 a 65 °C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de SDS. La duración de la hibridación es, en general, menor de aproximadamente 24 horas, normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas. La duración del tiempo de lavado será al menos un periodo de tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio.

Normalmente, la especificidad es función de los lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, la T_m puede

aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5\text{ }^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) - 0,61 (\% \text{ forma}) - 500/L$; en la que M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosa y citosina en el ADN, % forma es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (a la fuerza iónica y el pH definidos) a la cual el 50% de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. La T_m se reduce en aproximadamente 1 °C por cada 1 % de apareamiento erróneo; por tanto, la T_m de hibridación y/o las condiciones de lavado se pueden ajustar para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad $\geq 90\%$, la T_m se puede reducir 10 °C. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que sea 5 °C menor que el punto de fusión térmica T_m para la secuencia específica y su complementaria a una fuerza iónica y pH definidos. No obstante, las condiciones muy rigurosas pueden usar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4 °C menos que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones de rigurosidad baja pueden usar una hibridación y/o lavado a 12, 13, 14, 15, o 20 °C menos que el punto de fusión térmica (T_m). Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y de lavado y la T_m deseada, los expertos en la técnica entenderán que variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen de forma inherente. Si el grado deseado de resultados de apareamientos incorrectos en una T_m inferior a 45 °C (solución acosa) o 32 °C (solución de formamida), es óptimo incrementar la concentración de a.C. de modo que se pueda usar una temperatura superior. Se puede encontrar una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, New York); y Ausubel y col., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Véase Sambrook y col., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

Los términos siguientes se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia", y, (d) "porcentaje de identidad de secuencia."

(a) Como se usa en el presente documento, "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser una subpoblación o toda la secuencia especificada; por ejemplo, como segmento de una secuencia de ADNc de longitud completa o génica, o la secuencia completa del ADNc o génica.

(b) Como se usa en el presente documento, "ventana de comparación" hace referencia a un segmento contiguo y especificado de una secuencia de polinucleótidos, en la que la secuencia de polinucleótidos y la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de los dos polinucleótidos. En general, la ventana de comparación es de al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud y, opcionalmente, puede ser de 30, 40, 50, 100, o más largo. Los expertos en la técnica entienden que, para evitar una elevada similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia de polinucleótidos, normalmente se introduce una penalización por hueco y se resta del número de apareamientos.

Los procedimientos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Por tanto, la determinación del porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias cualquiera se puede conseguir usando un algoritmo matemático. Ejemplos no limitantes de dichos algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (1988) CABIOS 4:11-17; el algoritmo de alineación local de Smith y col. (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453; el procedimiento de alineación de búsqueda local de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-2448; el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Se pueden usar implementaciones en ordenador para la comparación de secuencias con el fin de determinar la identidad de secuencia. Dichas implementaciones incluyen, entre otras: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (Versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, and TFASTA en GCG Wisconsin Genetics Software Package, Versión 10 (disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, EE.UU.). Las alineaciones que usan estos programas se pueden realizar usando los parámetros preseleccionados. El programa CLUSTAL se describe bien en Higgins y col. (1988) Gene 73:237-244 (1988); Higgins y col., (1989) CABIOS 5:151-153; Corpet y col., (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang y col., (1992) CABIOS 8: 155-65; and Pearson y col., (1994) Meth. Mol. Biol. 24:307-331. El programa ALIGN se basa en el algoritmo de Myers y Miller (1988) ant. Con el programa LIGN se puede usar una tabla de residuo de pesos PAM 120, una penalización por la longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4 al comparar las secuencias de aminoácidos. Los programas BLAST de Altschul y col. (1990) J. Mol. Biol. 215:403 se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) ant. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud del texto= 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la invención. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud del texto= 3, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a proteína o polipéptido de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos se puede usar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) tal como se describe en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Como alternativa, se puede usar PSI-BLAST (en BLAST 2.0) para realizar una búsqueda

reiterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul col., (1997) ant. Al usar BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, se pueden usar los parámetros preseleccionados de los respectivos programas (p. ej., BLASTN para secuencias de nucleótidos, BLASTX para proteínas). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov. La alineación también se puede realizar manualmente mediante inspección. A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencia que se proporcionan en el presente documento se refieren al valor obtenido usando GAP, versión 10, con los parámetros siguientes: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando GAP Weight de 50 y un Length Weight de 3, y la matriz de puntuación nws gapdna.cmp; % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos usando GAP Weight de 8 y un Length Weight de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente del mismo. Por "programa equivalente" se quiere decir cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genera una alineación que tiene apareamientos de nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con la alineación correspondiente generada por GAP, versión 10.

GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453, para encontrar la alineación de dos secuencias completas que maximiza el número de apareamientos y minimiza el número de huecos. GAP considera todas las alineaciones posibles y las posiciones de los huecos, y crea la alineación con el mayor número de bases apareadas y menos huecos. Permite la provisión de una penalización por creación de hueco y una penalización por extensión de hueco en unidades de bases apareadas. GAP debe aprovechar el número de apareamiento con penalización por creación de hueco por cada hueco que inserta. Si se escoge una penalización por extensión de hueco mayor a cero, GAP debe, además, aprovechar cada hueco insertado de la longitud del hueco por la penalización por extensión de hueco. Los valores preseleccionados de penalización por creación de hueco y los valores de penalización por extensión de hueco en la versión 10 del GCG Wisconsin Genetics Software Package para las secuencias proteicas son 8 y 2, respectivamente. Para las secuencias nucleotídicas, la penalización por creación de hueco preseleccionada es 50, mientras que la penalización por extensión de hueco preseleccionada es 3. Las penalizaciones por creación de hueco y por extensión de hueco se pueden expresar como un número entero seleccionado del grupo de números enteros que consiste en de 0 a 200. Por tanto, por ejemplo, las penalizaciones por creación de hueco y por extensión de hueco pueden ser de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 o mayor.

GAP presenta un miembro de la familia de mejores alineaciones. Puede haber muchos miembros de esta familia, pero ningún otro miembro tiene una calidad mejor. GAP muestra cuatro figuras para las alineaciones: Calidad, Proporción, Identidad y Similitud. La calidad es la métrica maximizada con el fin de alinear las secuencias. La Proporción es la calidad dividida por el número de bases en el segmento más corto. El Porcentaje de Identidad es el porcentaje de los símbolos que de verdad coinciden. El Porcentaje de Similitud es el porcentaje de los símbolos que son similares. Los símbolos que atraviesan los huecos se ignoran. Se puntúa una similitud cuando el valor de la matriz de puntuación para un par de símbolos es superior o igual a 0,50, el umbral de similitud. La matriz de puntuación usada en la versión 10 del GCG Wisconsin Genetics Software Package es BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

(c) Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos hace referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación especificada. Cuando el porcentaje de identidad de secuencia se usa en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de residuos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos, en las que los residuos de aminoácidos se sustituyen por otros residuos de aminoácidos con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobicidad) y, por tanto, no modifican las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en las sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de la secuencia se puede ajustar hacia arriba para corregir según la naturaleza conservadora de la sustitución. Las secuencias que difieren en dichas sustituciones conservadoras se dice que tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los expertos en la técnica conocen bien los medios para efectuar este ajuste. Normalmente, esto implica puntuar una sustitución conservadora como apareamiento parcial en lugar de completo, de modo que aumenta el porcentaje de identidad de secuencia. Por tanto, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservadora se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservadora se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se calcula, por ejemplo, según se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

(d) Como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntico o residuo de aminoácido en ambas secuencias, para dar el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

Con el uso del término "polinucleótido" no se pretende limitar la presente invención a polinucleótidos que

comprenden ADN. Los expertos en la técnica reconocerán que los polinucleótidos pueden comprender ribonucleótidos y combinaciones de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. Dichos desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos incluyen moléculas que se producen de forma natural y análogos sintéticos. Los polinucleótidos de la invención también abarcan todas las formas de secuencias, incluidas, entre otras, formas monocatenarias, formas bicatenarias, orquillas y estructuras de tallo y bucle, y similares.

Las secuencias de polinucleótidos de la protoxina de insecto y la toxina de insecto de la invención se pueden proporcionar en casetes de expresión para la expresión en la planta de interés. El casete incluirá secuencias reguladoras en 5' y 3' unidas operablemente a un polinucleótido de la invención. "Operablemente unido" quiere decir un enlace funcional entre dos o más elementos. Por ejemplo, un enlace operable entre un polinucleótido de interés y una secuencia reguladora (es decir, un promotor) es un enlace funcional que permite la expresión del polinucleótido de interés. Los elementos unidos operablemente pueden ser contiguos o no contiguos. Cuando se usa para hacer referencia a la unión de dos regiones codificadoras de proteína, con operablemente unido se quiere decir que las regiones codificadoras están en el mismo marco de lectura. Adicionalmente, el casete puede contener al menos un gen adicional para cotransformar en el organismo. Como alternativa, el(los) gene(s) adicional(es) se pueden proporcionar sobre muchos casetes de expresión. Dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción y/o sitios de recombinación para la inserción del polinucleótido de la protoxina de insecto o la proteasa de intestino de insecto bajo la regulación de la transcripción de las regiones reguladoras. El casete de expresión puede además contener genes marcadores seleccionables.

El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de inicio de la transcripción y la traducción (es decir, un promotor), un polinucleótido de la invención y una región de terminación de la transcripción y la traducción (es decir, una región de terminación) funcional en plantas. Las regiones reguladoras (es decir, promotores, regiones de regulación de la transcripción y regiones terminación de la traducción) y/o el polinucleótido de la invención puede ser nativo/análogo al de la célula huésped o entre sí. Como alternativa, las regiones reguladoras y/o el polinucleótido de la invención pueden ser heterólogas a las de la célula huésped o entre sí. Como se usa en el presente documento, "heterólogo" en referencia a una secuencia es una secuencia que se origina de una especie extraña o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificada con respecto a su forma nativa en la composición y/o el locus genómico por la deliberada intervención humana. Por ejemplo, un promotor operablemente unido a un polinucleótido heterólogo procede de una especie diferente de la especie de la que se derivó el polinucleótido o, si es de la misma especie o de una análoga, una o ambas están sustancialmente modificadas con respecto a su forma original y/o el locus genómico, o el promotor no es el promotor nativo para el polinucleótido unido operablemente. Como se usa en el presente documento, un gen quimérico comprende una secuencia codificadora unida operablemente a una región de inicio de la transcripción que es heteróloga a la secuencia de codificación. Aunque puede ser óptimo expresar las secuencias que usan promotores heterólogos, se pueden usar las secuencias del promotor nativo.

La región de terminación puede ser nativa con la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa con el polinucleótido unido operablemente, puede ser nativa con el huésped vegetal o puede derivar de otra fuente (es decir, extraña o heteróloga al promotor, el polinucleótido de interés, el huésped vegetal o cualquier combinación de los mismos). Existen regiones de terminación convenientes procedentes del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tal como las regiones de terminación de octopina sintasa y nopalina sintasa. Véase, también Guerineau y col. (1991) Mol. Gen. Genet. 262: 141-144; Proudfoot (1991) Cell 64:671-674; Sanfacon y col. (1991) Genes Dev. 5:141-149; Mogen y col. (1990) Plant Cell 2:1261-1272; Munroe y col. (1990) Gene 91:151-158; Ballas y col. (1989) Nucleic Acids Res. 17:7891-7903; y Joshi y col. (1987) Nucleic Acids Res. 15:9627-9639.

Cuando sea adecuado, los polinucleótidos se pueden optimizar para incrementar la expresión en la planta transformada. Es decir, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando codones preferidos de la planta para mejorar la expresión. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11, una discusión del uso de codones preferidos del huésped. Se dispone de procedimientos en la técnica para sintetizar los genes preferidos de la planta. Véase, *por ejemplo*, las patentes de EE.UU. n° 5.380.831 y 5.436.391, y Murray y col. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

Se conocen modificaciones adicionales de la secuencia para potenciar la expresión génica en un huésped celular. Éstas incluyen la eliminación de las secuencias que codifican señales de poliadenilación falsas, señales del sitio de corte y empalme exón-intrón, repeticiones similares a transposones y otras de estas secuencia bien caracterizadas que pueden ser perjudiciales para la expresión génica. El contenido de G-C de la secuencia se puede ajustar a niveles medios para un huésped celular dado, calculado mediante referencia a genes conocidos expresados en la célula del huésped. Cuando sea posible, la secuencia se modifica para evitar las estructuras de ARNm secundarias en orquilla.

Los casetes de expresión pueden además contener secuencias líder en 5'. Dichas secuencias líder pueden actuar potenciando la traducción. Los líderes de la traducción se conocen en la técnica e incluyen: Líderes de picornavirus, por ejemplo líder de EMCV (región no codificadora en 5' de encefalomiocarditis) (Elroy-Stein y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6126-6130); líderes de potivirus, por ejemplo líder TEVR (virus del grabado del tabaco) (Gallie y col. (1995) Gene 165(2):233-238), líder de MDMV (virus del mosaico enano del maíz) (Virology 154:9-20), y proteína

de unión de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (BiP) (Macejak y col., (1991) Nature 353:90-94); líder no traducido del ARNm de la proteína de revestimiento del virus de mosaico de la alfalfa (ARN 4 de AMV) (Jobling y col., (1987) Nature 325:622-625); líder del virus del mosaico del tabaco (TMV) (Gallie y col., (1989) en Molecular Biology of RNA, ed. Cech (Liss, New York), pp. 237-256); y líder del virus del moteado clorótico del maíz (MCMV) (Lommel y col. (1991) Virology 81 :382-385). Véase también Della-Cioppa y col. (1987) Plant Physiol. 84:965-968.

Al preparar el casete de expresión, los diversos fragmentos de ADN se pueden manipular para proporcionar las secuencias de ADN en la orientación adecuada y, según sea adecuado, en el marco de lectura apropiado. Para este fin se pueden emplear adaptadores o enlazadores para unir los fragmentos de ADN o pueden estar implicadas otras manipulaciones para proporcionar los sitios de restricción convenientes, eliminación de ADN superfluo, eliminación de sitios de restricción o similares. Con este fin se pueden usar mutagénesis in vitro, reparación de cebadores, restricción, hibridación, repetición de sustituciones, por ejemplo transiciones y transversiones.

En general, el casete de expresión también comprenderá un gen marcador seleccionable para la selección de células transformadas. Los genes marcadores seleccionables se usan para la selección de células o tejidos transformados. Los genes marcadores incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos, tales como las que codifican la neomicina fosfotransferasa II (NEO) y la higromicina fosfotransferasa (HPT), así como genes que confieren resistencia a compuestos herbicidas, tales como glufosinato amónico, bromoxinilo, imidazolinonas y 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D). Otros marcadores seleccionables incluyen marcadores fenotípicos, tales como β -galactosidasa y proteínas fluorescentes, tales como la proteína fluorescente verde (GFP) (Su y col., (2004) Biotechnol. Bioeng. 85:610-9 y Fetter y col., (2004) Plant Cell 16:215-28), proteína fluorescente cian (CYP) (Bolte y col. (2004) J. Cell Science 117:943-54 y Kato y col. (2002) Plant Physiol 129:913-42), y proteína fluorescente amarilla (PhiYFP_{TM} de Evrogen, véase, Bolte y col. (2004) J. Cell Science 117:943-54). Para marcadores seleccionables adicionales, véase, en general, Yarranton (1992) Curro Opin. Biotech 3:506-511; Christopherson y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6314-6318; Yao y col. (1992) Cell 71:63-72; Reznikoff (1992) Mol. Microbiol. 6:2419-2422; Barkley y col. (1980) en The Operon, pp. 177-220; Hu y col. (1987) Cell 48:555-566; Brown y col. (1987) Cell 49:603-612; Figge y col. (1988) Cell 52: 713-722; Deuschle y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5400-5404; Fuerst y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2549-2553; Deuschle y col. (1990) Science 248:480-483; Gossen (1993) PhD. Thesis, University of Heidelberg; Reines y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1917-1921; Labow y col. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:3343-3356; Zambretti y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3952-3956; Baim y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5072-5076; Wyborski y col. (1991) Nucleic Acids Res. 19:4647-4653; Hillenand-Wissman (1989) Topics Mol. Struc. Biol. 10:143-162; Degenkolb y col. (1991) Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1591-1595; Kleinschmidt y col., (1988) Biochemistry 27: 1094-1104; Bonin (1993) Ph.D. Thesis, University of Heidelberg; Gossen y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551; Oliva y col. (1992) Antimicrob. Agents Chemother. 36:913-919; Hlavka y col. (1985) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 78 (Springer-Verlag, Berlín); Gill y col. (1988) Nature 334:721-724.

No se pretende que la lista anterior de genes de marcadores seleccionables sea limitante. En la presente invención se puede usar cualquier gen marcador seleccionable.

En la práctica de la invención se puede usar una serie de promotores. Los promotores se pueden seleccionar en base al resultado deseado. Es decir, los ácidos nucleicos se pueden combinar con promotores constitutivos, preferidos de tejido o de otro tipo, para la expresión en plantas. Dichos promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, el promotor del núcleo del promotor R_{syn}7 y otros promotores constitutivos divulgados en el documento WO 99/43838 y la patente de EE.UU. nº 6,072,050; el promotor del núcleo de CaMV 35S (Odell y col. (1985) Nature 313:810-812); actina de arroz (McElroy y col. (1990) Plant Cell 2:163-171); ubiquitina (Christensen y col. (1989) Plant Mol. Biol. 12:619-632 y Christensen y col. (1992) Plant Mol. Biol. 18:675-689; pEMU (Last y col. (1991) Theor. Appl. Genet. 81 :581-588); MAS (Velten y col. (1984) EMBO J. 3:2723-2730); promotor de ALS (patente de EE.UU. nº 5.659.026), y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; 5.608.142; y 6.177.611.

En general, será beneficioso expresar el gen desde un promotor inducible, en particular desde un promotor inducible por patógenos. Dichos promotores incluyen aquéllos de proteínas relacionadas con la patogenia (proteínas PR), que se inducen tras infección por un patógeno; por ejemplo proteínas PR, proteínas SAR, beta-1,3-glucanasa, quitinasa etc. Véase, por ejemplo, Redolfi y col. (1983) Neth. J. Plant Pathol. 89:245-254; Uknes y col. (1992) Plant Cell 4:645-656; y Van Loon (1985) Plant Mol. Virol. 4: 111-116. Véase también el documento WO 99/43819.

De interés son los promotores que se expresan localmente en o cerca del sitio de la infección por patógenos. Véase, por ejemplo, Marneau y col. (1987) Plant Mol. Biol. 9:335-342; Matton y col. (1989) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-331; Somsisch y col. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2427-2430; Somsisch y col. (1988) Mol. Gen. Genet. 2:93-98; y Yang (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14972-14977. Véase también, Chen y col. (1996) Plant J. 10:955-966; Zhang y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :2507-2511; Warner y col. (1993) Plant J. 3:191-201; Siebertz y col. (1989) Plant Cell 1:961-968; patente de EE.UU. Nº 5.750.386 (inducible por nematodos); y las referencias citadas en los mismos. De interés particular es el promotor inducible del gen PR_{ms} del maíz, cuya expresión es inducida por el patógeno *Fusarium moniliforme* (véase, por ejemplo, Cordero y col. (1992) Physiol. Mol. Plant Path. 41: 189-200).

Adicionalmente, dado que los patógenos encuentran la entrada en las plantas a través de heridas o daños producidos por insectos, un promotor inducible por heridas se puede usar en las construcciones de la invención. Dichos promotores inducibles por heridas incluyen el gen del inhibidor de la proteinasa de la patata (pin II) (Ryan (1990) Ann. Rev. Phytopath. 28:425-449; Duan y col. (1996) Nature Biotechnology 14:494-498); *wun1* y *wun2*, patente de EE.UU. nº 5.428.148; *win1* y *win2* (Stanford y col. (1989) Mol. Gen. Genet. 215:200-208); *sistemina* (McGurl y col. (1992) Science 225:1570-1573); *WIP1* (Rohmeier y col. (1993) Plant Mol. Biol. 22:783-792; Eckelkamp y col. (1993) FEBS Letters 323:73-76); *gen MPI* (Corderok y col. (1994) Plant J. 6(2): 141-150).

Se pueden usar promotores regulados por sustancias químicas para modular la expresión de un gen en una planta mediante la aplicación de un regulador químico exógeno. Dependiendo del objetivo, el promotor puede ser un promotor inducible por sustancias químicas, en el que la aplicación de la sustancia química induce la expresión del gen, o un promotor represible por sustancias químicas, en el que la aplicación de la sustancia química reprime la expresión del gen. Los promotores inducibles por sustancias químicas se conocen en la técnica e incluyen, entre otros, el promotor *In2-2* del maíz que se activa mediante un fitoprotector del herbicida bencenosulfonamida, el promotor *GST* del maíz, que se activa por los compuestos electrofílicos hidrófobos que se usan como herbicidas preemergentes y el promotor *PR-1a* del tabaco, que se activa por ácido salicílico. Otros promotores regulados por sustancias químicas de interés incluyen promotores de respuesta a esteroides (véase, por ejemplo, el promotor inducible por glucocorticoides en Schena y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1 0421-1 0425 y McNellis y col. (1998) Plant J. 14(2):247-257) y promotores inducibles por tetraciclina y represibles por tetraciclina (véase, por ejemplo, Gatz y col. (1991) Mol. Gen. Genet. 227:229-237, y las patentes de EE.UU. nº 5.814.618 y 5.789.156).

Se pueden usar promotores preferidos de tejido dirigidos a la expresión de protoxina de insecto modificada potenciada dentro de un tejido vegetal concreto. Los promotores preferidos de tejido incluyen Yamamoto y col. (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kawamata y col. (1997) Plant Cell Physiol. 38(7):792-803; Hansen y col. (1997) Mol. Gen. Genet. 254(3):337-343; Russell y col. (1997) Transgenic Res. 6(2): 157-168; Rinehart y col. (1996) Plant Physiol. 112(3):1331-1341; Van Camp y col. (1996) Plant Physiol. 112(2):525-535; Canevascini y col. (1996) Plant Physiol. 112(2):513-524; Yamamoto y col. (1994) Plant Cell Physiol. 35(5):773-778; Lam (1994) Results Probl. Cell Differ. 20: 181-196; Orozco y col. (1993) Plant Mol Biol. 23 (6):1129-1138; Matsuoka y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(20):9586-9590; y Guevara-Garcia y col. (1993) Plant J. 4(3):495-505. Dichos promotores se pueden modificar, en caso necesario, para debilitar la expresión.

En la técnica se conocen promotores preferidos de hoja. Véase, por ejemplo, Yamamoto y col. (1997) Plant J. 12(2):255-265; Kwon y col. (1994) Plant Physiol. 105:357-67; Yamamoto y col. (1994) Plant Cell Physiol. 35(5):773-778; Gotor y col. (1993) Plant J. 3:509-18; Orozco y col. (1993) Plant Mol. Biol. 23(6): 1129-1138; y Matsuoka y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(20):9586-9590.

En realizaciones concretas, las protoxinas de insecto modificadas o las toxinas de insecto modificadas se expresan de forma selectiva en raíces de plantas, en las que es probable que se produzcan daños relacionados con el insecto. Se conocen promotores preferidos de raíz y se pueden seleccionar de los muchos disponibles en la literatura y aislar de novo a partir de varias especies compatibles. Véase, por ejemplo, Hire y col. (1992) Plant Mol. Biol. 20(2):207-218 (gen de la glutamina sintetasa específica de la raíz de la soja); Keller y Baumgartner (1991) Plant Cell 3(10): 1051-1061 (elemento de control específico de la raíz en el gen *GRP 1.8* de la judía francesa); Sanger y col. (1990) Plant Mol. Biol. 14(3):433-443 (promotor específico de la raíz para el gen de la manopina sintetasa (MAS) de *Agrobacterium tumefaciens*); y Miao y col. (1991) Plant Cell 3(1):11-22 (clon de ADN de longitud completa que codifica la glutamina sintetasa (GS), que se expresa en raíces y nódulos radiculares de la soja). Véase también Bogusz y col. (1990) Plant Cell 2(7):633-641, en el que se describen dos promotores específicos de la raíz aislados de los genes de hemoglobina de la no legumbre fijadora de nitrógeno *Parasponia andersonii* y la no legumbre no fijadora de nitrógeno *Trema tomentosa*. Los promotores de estos genes se unieron en un gen indicador de β -glucuronidasa y se introdujeron en la no legumbre *Nicotiana tabacum* y en la legumbre *Lotus corniculatus*, y, en ambos casos, se conservó la actividad de promotor específico de la raíz. Leach y Aoyagi (1991) describen su análisis de los promotores de los genes inductores de la raíz de expresión alta *rolC* y *rolD* de *Agrobacterium rhizogenes* (véase Plant Science (Limerick) 79(1):69-76). concluyeron que en estos promotores el potenciador y los determinantes de ADN preferidos de tejido están disociados. Teeri y col. (1989) usaron fusión de genes a *lacZ* para mostrar que el gen de ADN de *Agrobacterium T* que codifica la octopina sintasa es especialmente activo en la epidermis de la punta de la raíz y que el gen *TR2'* es específico de la raíz en la planta intacta y es estimulado por los daños en el tejido foliar, una combinación de características especialmente deseable para uso con un gen insecticida o larvicida (véase EMBO J. 8(2):343-350). El gen *TR1'* condensado a *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) mostró características similares. Promotores adicionales preferidos de la raíz incluyen el promotor génico *VfEN-OD-GRP3* (Kuster y col. (1995) Plant Mol. Biol. 29(4):759-772); y el promotor *rolB* (Capana y col. (1994) Plant Mol. Biol. 25(4):681-691. Véase también las patentes de EE.UU. nº 5.837.876; 5.750.386; 5.633.363; 5.459.252; 5.401.836; 5.110.732; y 5.023.179. Otros promotores preferidos de la raíz de interés se divulgan en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/022.111, publicada como US 2006 0005275 el 5 de enero de 2006 y titulada "Promotor de metalotioneína del maíz", presentada el 22 de diciembre de 2004 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/022,449, publicada como US 2006/00052 74 el 5 de enero de 2006 titulada "Promotor 2 de metalotioneína del maíz y procedimientos de uso," presentada el 22 de diciembre de 2004.

Los promotores "preferidos de semillas" incluyen promotores "específicos de semilla" (los promotores activos durante el desarrollo de las semillas, tales como promotores de proteínas de almacenamiento de semillas), así como promotores "de germinación de semillas" (los promotores activos durante la germinación de las semillas). Véase Thompson y col., (1989) BioEssays 10:108. Dichos promotores preferidos de las semillas incluyen, entre otros, Cim1 (mensaje inducido por citocinina); cZ19B1 (zeína de 19 kDa del maíz); milpa (mio-inositol-1-fosfato sintasa) (véase el documento WO 00/11177 y la patente de EE.UU. nº 6.225.529; incorporada en el presente documento por referencia). La gamma-zeína es un promotor específico de endospermas. La globulina 1 (Glb-1) es un promotor representativo específico del embrión. Para dicotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, entre otros, β -faseolina de judía, napina, β -conglucina, lectina de soja, cruciferita y similares. Para monocotiledóneas, los promotores específicos de semillas incluyen, entre otros, zeína del maíz de 15 kDa, zeína del maíz de 22 kDa, zeína del maíz de 27 kDa, gamma-zeína, cera, shrunken 1, shrunken 2, globulina 1, etc. Véase también el documento WO 00/12733, en el que se divulgan promotores preferidos de semillas de los genes end1 y end2.

Cuando se desea una expresión de niveles bajos se usarán promotores débiles. En general, con "promotor débil" se quiere decir un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificadora a un nivel bajo. Por nivel bajo se quiere decir niveles de aproximadamente 1/1000 transcritos a aproximadamente 1/100.000 transcritos a aproximadamente 1/500.000 transcritos. Como alternativa, se reconoce que los promotores débiles también abarcan promotores que se expresan únicamente en unas pocas células y no en otras, para dar un nivel bajo total de expresión. Cuando un promotor se expresa a niveles inaceptablemente altos, las porciones de la secuencia promotora se pueden delecionar o modificar para disminuir los niveles de expresión.

Dichos promotores constitutivos débiles incluyen, por ejemplo, el promotor del núcleo del promotor Rsyn7 (documento WO 99/43838 y la patente de EE.UU. nº 6.072.050), el promotor del núcleo de CaMV 35S y similares. Otros promotores constitutivos incluyen, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.608.149; 5.608.144; 5.604.121; 5.569.597; 5.466.785; 5.399.680; 5.268.463; y 5.608.142. Véase también la patente de EE.UU. nº 6.177.611.

Los procedimientos de la invención implican introducción de un polipéptido o polinucleótido en una planta. Con "introducir" se quiere decir presentar a la planta el polipéptido o polinucleótido de un modo tal que la secuencia obtenga acceso al interior de una célula de la planta. Los procedimientos de la invención no dependen de un procedimiento concreto para introducir una secuencia en una planta, sólo que el polinucleótido o polipéptido obtiene acceso al interior de al menos una célula de la planta. En la técnica se conocen procedimientos para introducir polinucleótido o polipéptidos en las plantas, incluidos, entre otros, procedimientos de transformación estable, procedimientos de transformación transitoria y procedimientos mediados por virus.

Con "transformación estable" se quiere decir que la construcción de nucleótidos introducida en una planta se integra en el genoma de la planta y es capaz de que se herede en la progenie de la misma. Con "transformación transitoria" se quiere decir que un polinucleótido se introduce en la planta y no se integra en el genoma de la planta o un polipéptido se introduce en una planta.

Los protocolos de transformación, además de los protocolos para introducir polipéptidos o secuencias de polinucleótidos en plantas, pueden variar en función del tipo de planta o célula vegetal, es decir monocotiledóneas o dicotiledóneas, dirigido para la transformación. Procedimientos adecuados de introducción de polipéptidos y polinucleótidos en células vegetales incluyen microinyección (Crossway y col. (1986) Biotechniques 4:320-334), electroporación (Riggs y col. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602-5606, transformación mediada por *Agrobacterium* (patente de EE.UU. nº 5.563.055 y patente de EE.UU. nº 5.981.840), transferencia directa de genes (Paszowski y col. (1984) EMBO J. 3:2717-2722) y aceleración de partículas balística (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.945.050; la patente de EE.UU. nº 5.879.918; la patente de EE.UU. nº 5.886.244; y 5.932.782; Tomes y col. (1995) en Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlín); McCabe y col. (1988) Bio-technology 6:923-926; y transformación Lec1 (WO 00/28058). Véase también Weissinger y col. (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477; Sanford y col. (1987) Particulate Science and Technology 5:27-37 (cebolla); Christou y col. (1988) Plant Physiol. 87:671-674 (soja); McCabe y col. (1988) BiolTechnology 6:923-926 (soja); Finer y McMullen (1991) In Vitro Cell Dev. Biol. 27P: 175-182 (soja); Singh y col. (1998) Theor. Appl. Genet. 96:319-324 (soja); Datta y col. (1990) Biotechnology 8:736-740 (arroz) Klein y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4305-4309 (maíz); Klein y col. (1988) Biotechnology 6:559-563 (maíz); las patentes de EE.UU. nº 5.240.855; 5.322.783; y 5.324.646; Klein y col. (1988) Plant Physiol. 91 :440-444 (maíz); Fromm y col. (1990) Biotechnology 8:833-839 (maíz); Hooykaas-Van Slogteren y col. (1984) Nature (London) 311 :763-764; Patentes de EE.UU. nº 5.736.369 (cereales); Bytebier y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:5345-5349; (Liliaceae); De Wet y col. (1985) en The Experimental Manipulation of Ovule Tissues, ed. Chapman y col. (Longman, New York), pp. 197-209 (polen); Kaeppler y col. (1990) Plant Cell Reports 9:415-418 y Kaeppler y col. (1992) Theor. Appl. Genet. 84:560-566 (transformación mediada por whisker); D'Halluin y col. (1992) Plant Cell 4: 1495-1505 (electroporación); Li y col. (1993) Plant Cell Reports 12:250-255 y Christou y Ford (1995) Annals of Botany 75:407-413 (arroz); Osjoda y col. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750 (maíz a través de *Agrobacterium tumefaciens*).

En realizaciones específicas, las secuencias de protoxina de insecto o de toxina de insecto de la invención se

pueden proporcionar a una planta usando una diversidad de procedimientos de transformación transitoria. Dichos procedimientos de transformación transitoria incluyen, entre otros, la introducción de la protoxina de insecto o de la toxina de insecto, o variantes y fragmentos de las mismas, directamente en la planta o la introducción de un transcrito de proteína en la planta. Dichos procedimientos incluyen por ejemplo, la microinyección o bombardeo de partículas. Véase, *por ejemplo*, Crossway y col. (1986) Mol Gen. Genet. 202:179-185; Nomura y col. (1986) Plant Sci. 44:53-58; Hepler y col. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2176-2180; y Hush y col. (1994) J. Cell Science 107:775-784. Como alternativa, el polinucleótido de la protoxina de insecto o la toxina de insecto se pueden transformar de forma transitoria en la planta usando técnicas conocidas en la técnica. Dichas técnicas incluyen el sistema de vectores virales y la precipitación del polinucleótido de un modo que impida la posterior liberación del ADN. Por tanto, se puede producir transcripción del ADN unido a partículas, pero la frecuencia con la que se libera para integrarse en el genoma se reduce considerablemente. Dichos procedimientos incluyen el uso de partículas recubiertas con polietilimina (PEI; Sigma #P3143).

En otras realizaciones, el polinucleótido de la invención se puede introducir en plantas poniendo en contacto las plantas con un virus o ácidos nucleicos virales. En general, dichos procedimientos implican incorporar una construcción de nucleótidos de la invención en una molécula de ADN o ARN viral. Se reconoce que la protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada de la invención pueden sintetizarse inicialmente como parte de una poliproteína viral, que, después, se puede procesar mediante proteólisis *in vivo* o *in vitro* para producir la proteína recombinante deseada. Además, se reconoce que los promotores de la invención también abarcan promotores usados para la transcripción mediante ARN polimerasas virales. En la técnica se conocen procedimientos para introducir polinucleótidos en plantas y expresar una proteína codificada en los mismos, con la participación de moléculas de ARN o ADN virales. Véase, *por ejemplo*, las patentes de EE.UU. nº 5.889.191, 5.889.190, 5.866.785, 5.589.367, 5.316.931, y Porta y col. (1996) Molecular Biotechnology 5:209-221.

En la técnica se conocen procedimientos para la inserción dirigida de un polinucleótido en una localización específica en el genoma de la planta. En una realización, la inserción del polinucleótido en una localización genómica deseada se consigue usando un sistema de recombinación específica de sitio. Véase, *por ejemplo*, los documentos W099/25821, W099/25854, W099/25840, W099/25855 y W099/25853. En resumen, el polinucleótido de la invención puede estar contenido en un casete de transferencia flanqueado por dos sitios de recombinación no recombinogénicos. El casete de transferencia se introduce en una planta en cuyo genoma se ha incorporado de forma estable un sitio diana que está flanqueado por dos sitios de recombinación no recombinogénicos que corresponden a los sitios del casete de transferencia. Se proporciona una recombinasa adecuada y el casete de transferencia se integra en el sitio diana. El polinucleótido de interés queda de este modo integrado en una posición específica del cromosoma en el genoma de la planta.

Las células que se han transformado pueden crecer en plantas de acuerdo con los modos convencionales. Véase, *por ejemplo*, McCormick y col. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84. A continuación, estas plantas pueden crecer y polinizarse con la misma cepa transformada o con diferentes cepas y la progenia resultante tendrá la expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada identificada. Se pueden cultivar dos o más generaciones para garantizar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene de forma estable y se hereda, y, después, se ha conseguido las semillas cosechadas para garantizar la expresión de la característica fenotípica deseada. De este modo, la presente invención proporciona semillas transformadas (también denominadas "semillas transgénicas") que tienen un polinucleótido de la invención, *por ejemplo* un casete de expresión de la invención, incorporado de forma estable en su genoma.

En ciertas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención se pueden aplicar con cualquier combinación de secuencias de polinucleótidos de interés con el fin de crear plantas con un rasgo deseado. Un rasgo, como se usa en el presente documento, se refiere al fenotipo derivado de una secuencia o grupos de secuencias concretos. *Por ejemplo*, los polinucleótidos de la presente invención se pueden aplicar con cualquier otro polinucleótido que codifica polipéptidos que tienen actividad pesticida y/o insecticida, tal como otras proteínas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* (descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.366.892; 5.747.450; 5.737.514; 5.723.756; 5.593.881; y Geiser y col. (1986) Gene 48:109), lectinas (Van Damme y col. (1994) Plant Mol. Biol. 24:825), pentina (descrita en la patente de EE.UU. nº 5.981.722). Las combinaciones generadas también pueden incluir múltiples copias de uno cualquiera de los polinucleótidos de interés. Los polinucleótidos de la presente invención se pueden aplicar también con cualquier otro gen o combinación de genes para producir plantas con diversas combinaciones de rasgos, incluidos, entre otros, rasgos deseables para alimentación animal, tales como genes de niveles elevados de aceites (p. ej., la patente de EE.UU. nº 6,232,529); aminoácidos equilibrados (p. ej., hordotioninas (patentes de EE.UU. nº 5.990.389; 5.885.801; 5.885.802; y 5.703.409); cebada rica en lisina (Williamson y col. (1987) Eur. J. Biochem. 165:99-106; y el documento WO 98/20122) y proteínas ricas en metionina (Pedersen y col. (1986) J. Biol. Chem. 261:6279; Kirihaara y col. (1988) Gene 71:359; and Musumura y col. (1989) Plant Mol. Biol. 12:123)); incremento de la digestibilidad (p. ej., proteínas de almacenamiento modificadas (solicitud de EE.UU. nº de serie 10/053.410, presentada el 7 de noviembre de 2001); y tioredoxinas (solicitud de EE.UU. nº de serie 10/005.429, presentada el 3 de diciembre de 2001)).

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden aplicar también con rasgos deseables para la resistencia a la enfermedad o al herbicida (p. ej., genes de destoxificación de fumonisina (patente de EE.UU. nº 5.792.931); genes

de avirulencia o de resistencia a la enfermedad (Jones y col. (1994) Science 266:789; Martin y col. (1993) Science 262: 1432; Mindrinos y col. (1994) Cell 78: 1089); mutantes de acetolactato sintasa (ALS) que conducen a la resistencia al herbicida tal como las mutaciones S4 y/o Hra; inhibidores de la glutamina sintasa tales como fosfinotricina o basta (p. ej., gen bar); y resistencia a glifosato (gen EPSPS)) y rasgos deseables para el procesamiento o productos de procesado tales como niveles altos de aceite (p. ej., patente de EE.UU. n° 6.232.529); aceites modificados (p. ej., genes de ácido graso desaturasa (patente de EE.UU. n° 5.952.544; documento WO 94/11516)); almidones modificados (p. ej., ADPG piro-fosforilasas (AGPasa), sintasas de almidón (SS), enzimas de ramificación de almidón (SBE), y enzimas de desramificación de almidón (SDBE)); y polímeros o bioplásticos (p. ej., patente de EE.UU. n° 5.602.321; beta-ketotiolasa, polihidroxibutirato sintasa y acetoacetil-GoA reductasa (Schubert y col. (1988) J. Bacteriol. 170:5837-5847) facilitan la expresión de polihidroxi-alcanoatos (PHA)). Asimismo se podrían combinar los polinucleótidos de la presente invención con polinucleótidos que proporcionan rasgos agronómicos, tales como esterilidad masculina (p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.593.210), fuerza del tallo, tiempo de floración o rasgos de tecnología de transformación, tales como la regulación del ciclo celular o la dirección a genes (p. ej., los documentos WO 99/61619, WO 00/17364 y WO 99/25821).

Estas combinaciones apiladas se pueden crear por cualquier procedimiento, incluidos, entre otros, cultivo cruzado de plantas por cualquier metodología convencional o TopCross o transformación genética. Si las secuencias se apilan mediante transformación genética de las plantas, las secuencias de polinucleótidos de interés se pueden combinar en cualquier momento y en cualquier orden. Por ejemplo, una planta transgénica que comprende uno o más rasgos deseados se puede usar como diana para introducir otros rasgos mediante transformación posterior. Los rasgos se pueden introducir de forma simultánea en un protocolo de co-transformación con los polinucleótidos de interés proporcionados por cualquier combinación de casetes de transformación. Por ejemplo, si se introducen dos secuencias, las dos secuencias pueden estar contenidas en casetes de transformación distintos (trans) u obtenidas en el mismo casete de transformación (cis). La expresión de las secuencias puede estar dirigida por el mismo promotor o por diferentes promotores. En ciertos casos, puede ser deseable introducir un casete de transformación que suprime la expresión del polinucleótido de interés. Esto se puede combinar con cualquier combinación de otros casetes de supresión o casetes de sobreexpresión para generar la combinación deseada de rasgos en la planta. Además, se reconoce que las secuencias de polinucleótidos se pueden apilar en una localización genómica deseada usando un sistema de recombinación específica de sitio. Véase, por ejemplo, los documentos W099/25821, W099/25854, W099/25840, W099/25855 y W099/25853.

El cultivo de pedigrí se inicia con el cruzamiento de dos genotipos, tales como una línea de élite de interés y otra línea pura de élite que tiene una o más características deseables (es decir, que tiene incorporado de forma estable un polinucleótido de la invención, que tiene una actividad modulada y/o un nivel del polinucleótido de la invención), que complementa la línea de élite de interés. Si los dos padres originales no proporcionan todas las características deseadas se pueden incluir otras fuentes en la población en cultivo. En el procedimiento de pedigrí, las plantas superiores se autosiembran y seleccionan en generaciones filiales sucesivas. En las generaciones filiales que crecen, el estado de heterocigoto da lugar a líneas homogéneas como resultado de la autopolinización y selección. Normalmente, en el procedimiento de cultivo de pedigrí, se ponen en práctica cinco o más generaciones filiales sucesivas de autosembrado y selección: F1 → F2; F2 → F3; F3 → F4; F4 → F5; etc. Después de una cantidad suficiente de endogamia, las generaciones filiales sucesivas servirán para incrementar las semillas de la línea pura desarrollada. En realizaciones específicas, la línea pura comprende alelos homocigóticos en aproximadamente el 95 % o más de sus loci.

Además de usarlas para crear una conversión retrocruzada, el retrocruzamiento también se puede usar en combinación con el cultivo de pedigrí para modificar una línea de élite de interés y un híbrido que se fabrica usando la línea de élite modificada. Como se ha tratado anteriormente, el retrocruzamiento se puede usar para transferir uno o más rasgos específicamente deseados de una línea, el donante parental, a una línea pura denominada padre recurrente, que tiene buenas características agrónomas pero que carece del rasgo o rasgos deseados. No obstante se puede usar el mismo procedimiento para mover la progenia hacia el genotipo del padre recurrente pero, al mismo tiempo, conserva muchos componentes del padre no recurrente, deteniendo el retrocruzamiento en un estadio prematuro y prosiguiendo con el autosembrado y la selección. Por ejemplo, se crea una F1, tal como un híbrido comercial. Este híbrido comercial se puede retrocruzar con una de sus líneas parentales para crear BC1 o BC2. La progenie se autosiembra y se selecciona de modo que la línea pura recién desarrollada tiene muchas de las características del padre recurrente y, todavía, varias de las características deseadas del padre no recurrente. Este enfoque equilibra el valor y las fuerzas del padre recurrente para usar en nuevos híbridos y cultivos.

Por tanto, una realización de la presente invención es un procedimiento de efectuar una conversión de retrocruzamiento de una línea pura de maíz de interés, que comprende las etapas de cruzar una planta de línea pura de maíz de interés con una planta donante que comprende un gen mutante o transgen que confiere un rasgo deseado (es decir, expresión de una protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada), seleccionando una progenie F1 que comprende el gen mutante o transgen que confiere el rasgo deseado y retrocruzando la planta progenie F1 seleccionada con la planta de la línea pura de maíz de interés. El procedimiento puede además comprender la etapa de obtener un perfil de marcador molecular de la línea pura de maíz de interés y usar el perfil de marcador molecular para seleccionar una planta progenie con el rasgo deseado y el perfil de marcador molecular de la línea pura de interés. Del mismo modo, este procedimiento puede usarse para producir una semilla híbrida F1

añadiendo una etapa final de cruzamiento de la conversión del rasgo deseado de la línea pura de maíz de interés con una planta de maíz diferente para crear una semilla de maíz híbrido F1 que comprende un gen mutante o transgen que confiere un rasgo deseado.

La selección recurrente es un procedimiento usado en un programa de cultivo de plantas para mejorar una población de plantas. El procedimiento conlleva la polinización cruzada de plantas individuales entre sí para formar progenie. La progenie se cultiva y la progenie superior se selecciona según una serie de procedimientos de selección, que incluyen plantas individuales, progenie mitad hermana, progenie hermana, progenie autosembrada y cruzamiento superior. La progenie seleccionada sufre polinización cruzada entre sí para formar progenie para otra población. Esta población se siembra y, de nuevo, las plantas superiores se seleccionan para polinización cruzada entre sí. La selección recurrente es un proceso cíclico y, por tanto, se puede repetir tantas veces como se desee. El objetivo de la selección recurrente es mejorar los rasgos de una población. Después, la población mejorada se puede usar como fuente de material de cultivo para obtener líneas puras para usar en híbridos o como padres para un cultivo sintético. Un cultivo sintético es la progenie resultante formada mediante entrecruzamiento de varias líneas puras seleccionadas.

La selección en masa es una técnica útil cuando se usa junto con selección potenciada con marcadores moleculares. En la selección en masa, las semillas de individuos se seleccionan en base al fenotipo y/o el genotipo. Estas semillas seleccionadas se acumulan y usan para cultivar la siguiente generación. La selección en masa requiere cultivar una población de plantas en un volumen de terreno que permita la autopolinización de las plantas, cosechar las semillas en masa y, después, usar una muestra de las semillas cosechadas en masa para plantar la generación siguiente. En lugar de autopolinización, se podría usar polinización directa como parte del programa de cultivo.

El cultivo de mutación es uno de los muchos procedimientos que podrían usarse para introducir nuevos rasgos en una línea de élite. Las mutaciones que se producen de forma espontánea o se inducen de forma artificial pueden ser fuentes útiles de variabilidad para un agricultor de plantas. El objetivo de la mutagénesis artificial es incrementar la tasa de mutación para una característica deseada. Las tasas de mutación se pueden incrementar mediante muchos medios diferentes, incluidos temperatura, almacenamiento prolongado de semillas, condiciones de cultivo tisular, radiación, como rayos X, rayos gamma (p. ej., cobalto 60 o cesio 137), neutrones (producto de la fisión nuclear con uranio 235 en un reactor atómico), radiación beta (emitida por radioisótopos tales como fósforo 32 o carbono 14), o radiación ultravioleta (preferentemente de 2500 a 2900 nm) o mutágenos químicos (tales como análogos básicos (5-bromo-uracilo), compuestos relacionados (8-etoxi-cafeína), antibióticos (estreptonigrina), agentes alquilantes (mostazas de azufre, mostazas de nitrógeno, epóxidos, etilenaminas, sulfatos, sulfonatos, sulfonas, lactonas), azida, hidroxilamina, ácido nitroso o acridinas. Una vez observado el rasgo deseado mediante mutagénesis, el rasgo se puede incorporar después en el germoplasma existente mediante técnicas de cultivo tradicionales, tales como retrocruzamiento. Los detalles del cultivo de mutación se pueden encontrar en Fehr (1993) *Principals of Cultivar Development* (Macmillan Publishing Company), cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia. Además, las mutaciones creadas en otras líneas se pueden usar para producir una conversión de retrocruzamiento de líneas de élite que comprende dichas mutaciones.

Como se usa en el presente documento, el término planta incluye células vegetales, protoplastos vegetales, cultivos de tejido de células vegetales de los que se pueden regenerar las plantas, callos de plantas, gripos de plantas y células vegetales que están intactas en plantas o partes de plantas, tales como embriones, polen, óvulos, semillas, hojas, flores, ramas, frutos, granos, espigas, mazorcas, cáscaras, tallos, raíces, ápices de la raíz, anteras y similares. Con grano se quiere decir la semilla madura producida por cultivadores comerciales con fines distintos al crecimiento o reproducción de las especies. En el alcance de la invención también se incluyen progenie, variantes y mutantes de las plantas regeneradas, con la condición de que estas partes comprendan los polinucleótidos introducidos.

La invención también abarca plantas transformadas o transgénicas que comprenden al menos una secuencia de nucleótidos de la invención. Óptimamente, la planta transforma de forma estable con una construcción de polinucleótidos que comprende al menos una secuencia de nucleótidos de la invención unida de forma operable a un promotor que dirige la expresión en una célula vegetal. Como se usa en el presente documento, las expresiones "planta transformada" y "planta transgénica" se refieren a una planta que comprende dentro de su genoma un polinucleótido heterólogo. En general, el polinucleótido heterólogo está integrado de forma estable dentro del genoma de una planta transgénica o transformada, de modo que el polinucleótido pasa a las siguientes generaciones. El polinucleótido heterólogo puede estar integrado en el genoma solo o como parte de un casete de expresión recombinante.

Debe entenderse que, como se usa en el presente documento, el término "transgénico" incluye cualquier célula, línea celular, callo, tejido, parte de planta o parte cuyo genotipo se ha alterado con la presencia de ácido nucleico heterólogo que incluye dichos transgénicos inicialmente alterados, así como los creados mediante cruzamientos sexuales o propagación asexual a partir del transgénico inicial. El término "transgénico", como se usa en el presente documento, no abarca la alteración del genoma (cromosómico o extracromosómico) mediante procedimientos de cultivo de plantas convencionales o mediante acontecimientos naturales tales como fertilización cruzada aleatoria,

infección viral no recombinante, transformación bacteriana no recombinante, transposición no recombinante o mutación espontánea.

La presente invención se puede usar para transformación y protección de cualquier especie de planta, incluidas, entre otras, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Ejemplos de especies de plantas de interés incluyen, entre otros, maíz (*Zea mays*), *Brassica sp* (p. ej., *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*), particularmente las especies de *Brassica* útiles como fuentes de aceite de semilla, alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), mijo (p. ej., mijo perla (*Pennisetum glaucum*), mijo común (*Panicum miliaceum*), mijo cola de zorra (*Setaria italica*), mijo africano (*Eleusine coracana*)), girasol (*Helianthus annuus*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata (*Solanum tuberosum*), cacahuets (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium barbadense*, *Gossypium hirsutum*), boniato (*Ipomoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Ananas comosus*), árboles cítricos (*Citrus spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), banana (*Musa spp.*), aguacate (*Persea americana*), parra (*Ficus casica*), guayava (*Psidium guajava*), mango (*Mangifera indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardos (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendras (*Prunus amygdalus*), remolachas azucareras (*Beta vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum spp.*), avenas, cebada, vegetales, plantas ornamentales y coníferas.

Los vegetales incluyen tomates (*Lycopersicon esculentum*), lechuga (p. ej., *Lactuca sativa*), judías verdes (*Phaseolus vulgaris*), frijoles de lima (*Phaseolus limensis*), guisantes (*Lathyrus spp.*), y miembros del género *Cucumis*, tales como pepino (*C. sativus*), melón cantalupo (*C. cantalupensis*) y melón de almizcle (*C. melo*). Las plantas ornamentales incluyen azalea (*Rhododendron spp.*), hidrangea (*Macrophylla hydrangea*), hibisco (*Hibiscus rosasanensis*), rosas (*Rosa spp.*), tulipanes (*Tulipa spp.*), narcisos (*Narcissus spp.*), petunias (*Petunia hybrida*), claveles (*Dianthus caryophyllus*), poinsetia (*Euphorbia pulcherrima*) y crisantemo.

Las coníferas que se pueden emplear en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, pinos tales como pino taeda (*Pinus taeda*), pino de raya vertical (*Pinus elliotii*), pino ponderosa (*Pinus ponderosa*), pino costero (*Pinus contorta*), y pino Monterey (*Pinus radiata*); abeto de Douglas (*Pseudotsuga menziesii*); Tsuga occidental (*Tsuga canadensis*); picea de Sitka (*Picea glauca*); secuoya (*Sequoia sempervirens*); abetos verdaderos tales como abeto púrpura (*Abies amabilis*) y abeto balsámico (*Abies balsamea*); y cedros, tales como el cedro rojo occidental (*Thuja plicata*) y el cedro amarillo de Alaska (*Chamaecyparis nootkatensis*). En realizaciones específicas, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, algodón, cártamo, cacahuete, sorgo, trigo, mijo, tabaco etc.). En otras realizaciones, las plantas de maíz y de soja son óptimas, y en otras realizaciones, las plantas de maíz son óptimas.

Otras plantas de interés incluyen plantas de grano que proporcionan semillas de interés, plantas de semilla de aceite y plantas leguminosas. Las semillas de interés incluyen semillas de grano, tales como maíz, trigo, cebada, arroz, sorgo, centeno etc. Las plantas de semilla de aceite incluyen algodón, soja, cártamo, girasol, *Brassica*, maíz, alfalfa, palma, coco etc. Las plantas leguminosas incluyen judías y guisantes. Judías incluyen garrofin, alholva, soja, alubias, caupí, mostaza, judía de lima, habas, lentejas, garbanzos etc.

Adicionalmente se proporcionan composiciones que comprenden una protoxina de insecto aislada o una toxina de insecto aislada que tiene al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a una proteasa de intestino de insecto. En la presente invención se puede formular una proteína protoxina de insecto modificada aislada o una toxina de insecto modificada con un vehículo aceptable en una composición o formulación de protoxina o toxina que es, por ejemplo, una suspensión, una solución, una emulsión, un polvo para espolvorear, un gránulo dispersable, un polvo humectable y un concentrado emulsionable, un aerosol, un gránulo impregnado, un adyuvante, una pasta recubrible, además de encapsulaciones en, por ejemplo, sustancias poliméricas.

Dichas composiciones divulgadas anteriormente se pueden obtener mediante la adición de un agente de superficie activa, un vehículo inerte, un conservante, un humectante, un estimulante de la alimentación, un atrayente, un agente de encapsulación, un aglutinante, un emulsionante, un pigmento, un protector de UV, un tampón, un agente de flujo o fertilizantes, donantes de micronutrientes u otras preparaciones que influyen sobre el crecimiento de la planta. Uno o más productos agroquímicos incluidos, entre otros, herbicidas, insecticidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas, acaricidas, reguladores del crecimiento de plantas, auxiliares de cosecha y fertilizantes, se pueden combinar con vehículos, tensioactivos o adyuvantes empleados habitualmente en la técnica de formulación u otros componentes para facilitar la manipulación y aplicación del producto para plagas diana concretas. Vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponder a las sustancias habitualmente empleadas en la tecnología de la formulación, por ejemplo sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes de humectación, agentes de adherencia, espesantes, aglutinantes o fertilizantes. Normalmente, los ingredientes activos de la presente invención se aplican en forma de composiciones y se pueden aplicar al área o planta de cultivo que se va a tratar. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención se pueden aplicar a granos en la preparación o durante el almacenamiento en contenedores de granos o silos etc. Las composiciones de la presente invención se pueden aplicar de forma simultánea o sucesiva con otros compuestos. Procedimientos de aplicar un ingrediente activo de la presente invención o una composición

agroquímica de la presente invención que contiene al menos una de las proteínas protoxina o toxina modificadas de la presente invención incluyen, entre otras, aplicación foliar, recubrimiento de semillas y aplicación en el terreno. El número de aplicaciones y la frecuencia de aplicación dependen de la intensidad de la infestación por la correspondiente plaga.

Agentes de superficie activa adecuados incluyen, entre otros, compuestos aniónicos, tales como carboxilato de, por ejemplo, un metal; carboxilato de un ácido graso de cadena larga; un N-acilsarcosinato; mono o diésteres de ácido fosfórico con etoxilatos de alcohol graso o sales de dichos ésteres; sulfatos de alcohol graso tales como dodecilsulfato sódico, octadecilsulfato sódico o cetilsulfato sódico; sulfatos de alcohol graso etoxilado; sulfatos de alquilfenol etoxilado; sulfonatos de lignina; sulfonatos de petróleo; sulfonatos de alquilarilo tales como sulfonatos de alquilbenceno o sulfonatos de alquilnaftaleno inferior, por ejemplo sulfonato de butilnaftaleno; sales de condensados sulfonados de naftaleno-formaldehído; sales de condensados sulfonados de fenol-formaldehído; sulfonatos más complejos tales como los sulfonatos de amida, por ejemplo el producto de condensación sulfonado de ácido oleico y N-metil taurina; o los sulfosuccinatos de dialquilo, por ejemplo el sulfonato sódico o succinato de dioctilo. Agentes no iónicos incluyen los productos de condensación de ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, amidas de ácidos grasos o fenoles grasos alquil o alquénil sustituidos con óxido de etileno, ésteres grasos de éteres de alcohol polihídrico, por ejemplo ésteres de ácido graso sorbitano, productos de la condensación de dichos ésteres con óxido de etileno, por ejemplo ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano, copolímeros de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno, glicoles acetilénicos tales como 2,4,7,9-tetraetil-5-decín-4,7-diol, o glicoles acetilénicos etoxilados. Ejemplos de un agente de superficie activa catiónico incluyen, por ejemplo, una mono, di o poliamina alifática tal como un acetato, naftenato u oleato; o amina que contiene oxígeno tal como un óxido de amina de polioxietilentalquilamina, una amina unida a amida preparada mediante la condensación de un ácido carboxílico con una di o poliamina; o una sal de amonio cuaternaria.

Ejemplos de materiales inertes incluyen, entre otros, minerales inorgánicos tales como caolín, filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos o materiales botánicos, tales como corcho, mazorcas de maíz en polvo, cáscaras de cacahuete, cáscaras de arroz y cáscaras de nuez.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en una forma adecuada para aplicación directa o como concentrado de la composición primaria que requiere dilución con una cantidad adecuada de agua u otro diluyente antes de la aplicación. La concentración de la protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada variará en función de la naturaleza de la formulación concreta, específicamente si es un concentrado o se va a usar directamente. La composición contiene de 1 a 98 % de un vehículo inerte sólido o líquido y de 0 a 50 %, preferentemente de 0,1 a 50 % de un tensioactivo. Estas composiciones se administrarán en la proporción indicada para el producto comercial, preferentemente aproximadamente 0,0045 kg-2,25 kg por 4.046,8 m² cuando están en forma seca y a aproximadamente 0,0045 kg-4m⁵ kg por 4.046,8 m² cuando están en forma líquida.

En otra realización, las composiciones de la invención se pueden tratar antes de la formulación para prolongar la actividad pesticida cuando se aplica al entorno de una plaga diana siempre que el pretratamiento no sea perjudicial para la actividad. Dicho tratamiento puede ser por medios químicos y/o físicos, siempre que el tratamiento no afecte de forma perjudicial a las propiedades de la(s) composición(es). Ejemplos de reactivos químicos incluyen, entre otros, agentes de halogenación; aldehídos tales como formaldehído y glutaraldehído; antiinfecciosos tales como cloruro de ceftirán; alcoholes, tales como isopropanol y etanol; y fijadores histológicos, tales como fijador de Bouin y fijador de Helly (véase, por ejemplo, Humason (1967) Animal Tissue Techniques (W.H. Freeman and Co.).

Las composiciones y formulaciones de protoxina modificada y toxina modificada de la invención se pueden aplicar al ambiente de una plaga de insectos, mediante, por ejemplo, pulverización, atomización, espolvoreado, dispersión, recubrimiento o vertido, introduciéndolas en el interior o en el terreno, introduciéndolas en el agua de irrigación, mediante tratamiento de la semilla o aplicación general o espolvoreado en el momento que la plaga ha comenzado a aparecer o antes de la aparición de las plagas como medida de protección. Por ejemplo, una proteína de protoxina de insecto modificada y toxina de insecto modificada de la invención puede mezclarse con el grano para proteger al grano durante el almacenamiento. En general, es importante obtener un buen control de las plagas en las primeras etapas del crecimiento de la planta, ya que este es el momento en el que la planta puede recibir los daños más graves. Las composiciones de la invención pueden contener de forma conveniente otro insecticida si se piensa que es necesario. En una realización de la invención, la composición se aplica directamente en el terreno, en el momento del plantado, en forma granular de una composición de un vehículo. Otra realización es una forma granular de una composición que comprende un agroquímico tal como, por ejemplo, un herbicida, un insecticida, un fertilizante o un vehículo inerte.

Las composiciones de la invención encuentran utilidad en la protección de plantas, semillas y productos de plantas de diversos modos. Por ejemplo, las composiciones se pueden usar en un procedimiento que implica introducir una cantidad eficaz de la composición de la protoxina de insecto modificada o toxina de insecto modificada en el ambiente de la plaga mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en pulverización, espolvoreado, transmisión o recubrimiento de semillas. Sin pretender limitarse a un mecanismo concreto, en una realización una plaga de insectos ingiere una composición de protoxina de insecto modificada y la protoxina de insecto es escindida por una proteasa presente en el intestino de insecto. La escisión de la protoxina de insecto

produce una toxina de insecto activa en el intestino de insecto, que a su vez afecta a la plaga de insectos. En otras realizaciones, una composición de toxina de insecto modificada se aplica en el ambiente de una plaga de insectos y es ingerida después por una plaga de insectos. La toxina de insecto modificada es escindida después por una proteasa de intestino de insecto para producir una toxina de insecto en el intestino del insecto que muestra mejor actividad pesticida con respecto a la correspondiente toxina de insecto que carece del sitio de activación proteolítica modificado.

Antes de que el material de propagación de plantas (frutos, tubérculos, bulbos, cormo, granos, semillas), especialmente las semillas, se vendan como producto comercial, se tratan habitualmente 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 adicionales, o adyuvantes estimuladores de la aplicación de uso habitual en la técnica de la formulación para proporcionar protección contra los daños causados por plagas de bacterias, hongos o animales. Con el fin de tratar la semilla, el recubrimiento protector se puede aplicar a las semillas impregnando los tubérculos o los granos con una formulación líquida o recubriéndolas con una formulación combinada seca o húmeda. Además, en casos especiales, son posibles otros procedimientos de aplicación a plantas, por ejemplo tratamiento dirigido a las yemas o al fruto.

La semilla de la planta de la invención que comprende una molécula de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína protoxina modificada o toxina modificada de la invención se puede tratar con un recubrimiento protector de la semilla que comprende un compuesto de tratamiento de semillas, tales como, por ejemplo, captán, carboxina, tiram, metalaxilo, pirimifos-metilo y otros de uso habitual en el tratamiento de semillas. En una realización dentro del alcance de la invención, un recubrimiento protector de la semilla que comprende una composición pesticida de la invención se usa sola o en combinación con uno de los recubrimientos protectores de la semilla de uso habitual en el tratamiento de semillas.

Los procedimientos y composiciones de la presente invención pueden ser eficaces contra varias plagas. Para los fines de la presente invención, las plagas incluyen, entre otras, insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros, patógenos protozoos, distomas hepáticos parásitos de animales etc. Plagas de interés concreto son plagas de insectos, particularmente plagas de insectos que producen daños significativos en las plantas agrícolas.

Las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados de los órdenes coleópteros, dípteros, himenópteros, lepidópteros, flirápteros, homópteros, hemípteros, ortópteros, tisanópteros, dermápteros, isópteros, anopluros, sifonápteros, tricópteros etc., particularmente coleópteros y lepidópteros. Plagas de insectos de la invención para los cultivos principales incluyen: Maíz: *Ostrinia nubilalis*, perforador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador grisiento; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Diatraea grandiosella*, perforador del maíz del sudoeste; *Elasmopalpus lignosellus*, gusano picador; *Diatraea saccharalis*, taladrador del tallo; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz occidental; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz del norte; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; *Melanotus spp.*, gusanos alambre; *Cyclocephala borealis*, escarabajo enmascarado del norte (escarabajo blanco); *Cyclocephala immaculata*, escarabajo enmascarado del sur (escarabajo blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, pulgilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, áfido de la hoja del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, áfido de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinches; *Melanopus femurrubrum*, saltamontes de pata roja; *Meanopus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz; *Agromyza parvicornis*, minadora mancha del maíz; *Anaphothrips obscurus*, trips de hierba; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, ácaros araña con dos manchas; Sorgo: *Chilo partellus*, taladrador del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador del cuello del maíz; *Feltia subterranea*, cortador pequeño; *Phyllophaga crinita*, escarabajo blanco; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus spp.*, lombrices; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Chaetocnema pulicaria*, pulgilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, áfido de la hoja del maíz; *Sipha flava*, áfido amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquito del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro araña carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro araña con dos manchas; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, gusano soldado; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador del cuello del maíz; *Agrotis orthogonia*, gusano cortador occidental; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador del cuello del maíz; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Hypera punctata*, clover leaf weevil; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; áfido del trigo de Rusia; *Schizaphis graminum*, escarabajo verde; *Macrosiphum avenae*, áfido del grano inglés; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de pata roja; *Melanoplus differentialis*, saltamontes; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hess; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito del trigo; *Meromyza americana*, gusano del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca de sierra del tallo del trigo; *Aceria tulipae*, ácaro enrollador de la hoja del trigo; Girasol: *Suleima helianthana*, polilla de la yema del girasol; *Homoeosoma electelum*, polilla del girasol; *zygogramma exclinationis*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasiptera murtfeldtiana*, mosquito de la semilla del girasol; Algodón: *Heliothis virescens*, gusano bellotero; *Helicoverpa zea*, gusano del algodón; *Spodoptera exigua*, gusano soldado de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, lagarta rosada; *Anthonomus grandis*, picudo; *Aphis gossypii*, áfido del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltana del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca con bandas de color en las alas; *Lygus lineolaris*, chinche opaca;

Melanoplus femurrubrum, saltamontes de pata roja; *Melanoplus differentialis*, saltamontes; *Thrips tabaci*, trip de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trip del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro araña carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro araña con dos manchas; Arroz: *Diatraea saccharalis*, taladrador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Colaspis brunnea*, colaseis de la uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, rice gorgojo acuático del arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, saltahoja del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche verde; Soja: *Pseudoplusia includens*, gusano de la soja; *Anticarsia gemmatilis*, oruga de las leguminosas; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, taladrador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador grasiento; *Spodoptera exigua*, gardama; *Heliothis virescens*, gusano de la yema del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo de la alubia mejicana; *Myzus persicae*, áfido del melocotón verde; *Empoasca fabae*, saltahoja de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche verde; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de pata roja; *Melanoplus differentialis*, saltamontes; *Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz; *Sericothrips variabilis*, trip de soja; *Thrips tabaci*, trip de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, ácaro araña de la fresa; *Tetranychus urticae*, ácaro araña con dos manchas; Cebada: *Ostrinia nubilalis*, taladrador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador grasiento; *Schizaphis graminum*, escarabajo verde; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche verde; *Euschistus servus*, chinche marrón; *Delia platura*, gusano de la semilla del maíz; *Mayetiola destructor*, mosca de Hess; *Petrobia latens*, ácaro del trigo marrón; Colza: *Brevicoryne brassicae*, áfido de la col; *Phyllotreta cruciferae*, pulguilla; *Mamestra configurata*, gusano soldado Bertha; *Plutella xylostella*, polilla de las coles; *Delia ssp.*, gusanos de la raíz.

Nematodos incluyen nematodos parásitos tales como nematodos de la raíz-nudo, quistes y lesiones, incluidos *Heterodera spp.*, *Meloidogyne spp.*, y *Globodera spp.*; particularmente miembros de los nematodos de quistes, incluidos, entre otros, *Heterodera glycines* (nematodos de los quistes de soja); *Heterodera schachtii* (nematodos de los quistes de la remolacha); *Heterodera avenae* (nematodos de los quistes de cereales); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (nematodos de los quistes de la patata). Los nematodos de las lesiones incluyen *Pratylenchus spp.*

El artículo “un”, “uno” como se usan en el presente documentose refieren a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Preparación y secuenciación de bibliotecas de ADNc de intestinos medios del gusano de la raíz del maíz occidental (sólo con fines de referencia)

Intestinos medios de 50 gusanos de la raíz del maíz occidental (WCRW) 3er INSTAR (*Diabrotica virgifera virgifera*) se diseccionaron y recogieron directamente en nitrógeno líquido. Se preparó ARN total mediante homogeneización tisular en nitrógeno líquido usando un mortero, seguido de lisis celular en presencia de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Para la construcción de la biblioteca de ADNc, el ARN poliA(+) se purificó a partir del ARN total en una columna de afinidad de oligo(dT)-celulosa usando el kit para purificación de ARNm (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), de acuerdo con el protocolo del kit. La síntesis de la primera hebra de ADNc usando Superscript II (Invitrogen) y la posterior síntesis de la segunda hebra, adición de ligador y clonación direccional en los sitios EcoRI y XhoI de pBlueScript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA) se realizaron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit Stratagene cDNA (Stratagene). El ADNc se purificó usando una columna para ADNc (Invitrogen) inmediatamente antes de la unión en el vector.

La secuenciación de los clones de la biblioteca de ADNc se llevó a cabo usando el kit de reacción ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready con la ADN polimerasa FS AmpliTaq Perkin Elmer, Boston, MA) y se analizó en un secuenciador de ADN automático ABI Modelo 373.

Las secuencias resultantes de aproximadamente 7000 clones se compararon con secuencias nucleotídicas o peptídicas conocidas en las bases de datos GenBank y Peptide Sequence usando los programas BLASTN o BLASTP.

El análisis de la secuencia de estas EST indicó que las proteasas predominantes en el intestino medio de WCRW eran cisteína proteasas pertenecientes a la familia de las cathepsinas (Tabla 1). En términos de abundancia relativa, la cathepsina L era la proteasa cathepsina fundamental, seguida de la cathepsina B y la cathepsina D. Los miembros de la cathepsina L constituían más del 83 % de las secuencias de cathepsina encontradas en los clones secuenciados. El análisis de los grupos reveló que dos miembros de esta familia, iwm2s.pk017.h1 0 (en lo sucesivo “h10”; SEC ID N° 6 (secuencia de nucleótidos; SEC ID N° 7 (secuencia de aminoácidos)) y iwm2s.pk015.c9 (en lo sucesivo “c9”; SEC ID N° 8 (secuencia de nucleótidos); juntos forman el 80 % de las secuencias de cathepsina L y el 46 % de todas las secuencias de cathepsina encontradas en la secuencia de la biblioteca. También se identificó tripsina en las

secuencias del intestino medio, pero representó menos del 2 % de las proteasas del intestino medio.

Tabla 1: Distribución de las proteasas en EST del intestino medio de WCR

Proteasa	% de proteasa representada en la biblioteca de ADNc
Catepsina L	82,1
Catepsina b	10,6
Catepsina D	4,5
Tripsina	1,9
Quimotripsina	0

Ejemplo 2: Expresión recombinante de las proteasas h10 (SEC ID N° 7) y c9 (SEC ID N° 9) (sólo con fines de referencia)

Las dos catepsinas más abundantes, representadas por h10 (SEC ID N° 7) y c9 (SEC ID N° 9), se secuenciaron completamente para obtener genes de longitud completa. La secuencia de aminoácidos prevista indicó que estas proteínas tenían una longitud de 315 y 314 aminoácidos, respectivamente. h10 es 100% idéntica a una cisteína proteasa recientemente aislada de CRW (Brown y col. (2004) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34(4):305-320), y c9 es 79% idéntica a otra cisteína proteasa de CRW aislada por Brown y col. Como cabía esperar, h10 y c9 contienen un péptido señal y una región propéptido inmediatamente antes de la proteasa madura.

Con el fin de caracterizar los sitios de escisión reconocidos por las dos proteasas de tipo catepsina L, tanto c9 como h10 se expresaron usando el kit de expresión EasySelect™ Pichia Expression Kit (Invitrogen).

Las secuencias de codificación de h10 y c9 se amplificaron por PCR con la polimerasa de alta fidelidad de platino (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando los cebadores:

h10 directo: CGACTCGAGAAAAGAAATCTAGGTGCCTICGAAAAATGG (SEC ID N° 14)
h10 inverso: CCATATATGCGGCCGCTACAATTIAGGGTAAGAGTICATG (SEC ID N° 15)
C9 directo: CGACTCGAGAAAAGAAATTIATCTGCCTTIGAGCAATGG (SEC ID N° 16)
C9 inverso: CCTATATIAGCGGCCGCTACAACCTIGGGTAAGAGTIC (SEC ID N° 17)

Los cebadores directos (drt) se diseñaron para corresponder a la secuencia que codifica el comienzo de la región propeptídica prevista e incluyeron una secuencia señal parcial del factor de apareamiento α y un sitio de escisión Kex2 antes de la secuencia propeptídica. Esta combinación aseguraría que una vez clonada en el vector de expresión de Pichia pPICZ α A (Invitrogen) se reconstituiría la secuencia señal completa del factor de apareamiento α y la catepsina recombinante se secretaría en el medio de crecimiento y, después, se eliminaría mediante la proteasa Kex2. En los cebadores directos e inversos se incluyeron sitios de restricción adicionales para XhoI y NotI (subrayados en las secuencias anteriores) para facilitar las etapas de clonación posteriores. Los fragmentos amplificados se diseñaron con XhoI y NotI y se clonaron en pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA) para confirmar la secuencia antes de subclonar en los mismos sitios de restricción en pPICZ α A para la expresión.

Los plásmidos resultantes pPICZ α -c9 y pPICZ α -h10, se transformaron en células de *Pichia pastoris* X-33 competentes usando el kit de transformación Pichia EasyComp™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del kit. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar YPDS (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, 2 % de dextrosa, sorbitol 1M, 2 % de agar) que contienen Zeocin™ (100 μ g/ml). Se realizó un análisis de la expresión a escala pequeña de 5 a 10 transformantes resistentes a Zeocin™ para evaluar la producción de catepsina c9 y h10 recombinante. Los transformantes individuales se inocularon y cultivaron durante la noche a 30 °C en 25 ml de medio BMGY (1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, fosfato potásico 100 mM, pH 6, 1,34 % de base de nitrógeno de levadura (YNB), 4 x 10⁻⁵ % de biotina, 1 % de glicerol). La expresión se indujo recogiendo las células mediante centrifugación a 3000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente, decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento celular en medio BMMY (B,GY- 1 % de glicerol + 0,5 % de metanol) a una DO₆₀₀ de 1,0. Los cultivos resultantes se incubaron a 30 °C en un incubador con agitación. La inducción se mantuvo durante un periodo de 96 horas mediante la adición del 100 % de metanol hasta un 0,5 % de la concentración final cada 24 horas.

El sobrenadante de cada cultivo se recogió sedimentando las células y transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo y almacenando a -80 °C. La expresión proteica de c9 y h10 se analizó mediante SDS-PAGE con tinción de Coomassie. El SDS-PAGE indicó que c9 y h10 estaban siendo expresados y secretados en el medio de cultivo en su forma propeptídica en base a sus tamaños de peso molecular previstos de 33 kDa. El análisis de la secuencia de aminoácidos en N terminal confirmó que las bandas de 33 kDa correspondían a los propéptidos. La reducción del pH de neutro a ácido (Ph 4,5) tuvo como resultado el autoprocesamiento del propéptido en su forma madura de 22 kDa, lo que demuestra que c9 y h10 se expresaban funcionalmente en *Pichia pastoris*. El análisis de la secuencia de

aminoácidos en N terminal confirmó que la banda de 22 kDa representaba la forma madura. Mediante el análisis de la secuencia se observó algún autoprocesamiento diferencial entre el propéptido y el péptido maduro.

Ejemplo 3: Caracterización funcional de las catepsinas c9 y h10 sobre sustratos peptídicos sintéticos (sólo con fines de referencia)

La caracterización funcional adicional de c9 y h10 se realizó comparando las actividades contra los sustratos peptídicos cromogénicos Pyr-Phe-Leu-pNA y Bz-L-Arg-pNA (Peptides International, Louisville, KY). Los ensayos se realizaron de acuerdo con Kouzuma y col., (1996) J. Biochem 119: 1106-1113 en fosfato sódico 100 mM (pH 6,5), KCl 0,3M, EDTA 0,1 M y 100% de DMSO 1 mM con 500 μ M del sustrato peptídico. A 100 μ l de la solución de reacción que contiene Pyr-Phe-Leu-pNA o Bz-L-Arg-pNA se añadió 1 μ l de pro-c9 o pro-h10 bruto y 1 μ l de c9 y h10 activados en bruto, para determinar la especificidad del sustrato. Los sobrenadantes de una muestra no inducida se usaron como controles para eliminar los posibles efectos de la contaminación con proteasa de *Pichia*. Las reacciones se dejaron progresar durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se midió la absorbancia a 410 nm. Estos estudios demostraron que ambas formas (pro y madura) de ambas enzimas tienen una especificidad por Pyr-Phe-Leu-pNA. En contraste, el sustrato Bz-L-Arg-pNA, que es susceptible a la escisión por la catepsina B y la catepsina H, no fue hidrolizado ni por c9 ni por h10. Esta escisión diferencial confirma que tanto c9 como h10 son proteasas de tipo catepsina L. No se observó actividad con el sobrenadante de la muestra sin inducir. Posteriormente se descubrió que la capacidad de las procatepsinas para hidrolizar Pyr-Phe-Leu-pNA era el resultado del autoprocesamiento en la proteasa madura como resultado del pH ligeramente ácido (pH 6,5) del tampón de reacción. Tanto c9 como h10 fueron completamente inhibidas por E64, un inhibidor general de las proteasas catepsina.

Ejemplo 4: Purificación de c9 y h10 de los sobrenadantes de los cultivos de *Pichia* (sólo con fines de referencia)

Los medios de sobrenadantes de cultivos a escala pequeña de transformantes que expresan c9 o h10 (véase el Ejemplo 2) se diluyeron a 1:4 con tampón de carbonato sódico 50 mM (pH 10). Se realizó HPLC en la muestra usando un Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) con un cartucho HiTrap Q XL Cartridge (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se realizó un gradiente escalonado con Tampón A (Tris HCl 50 mM, pH 8,0) y Tampón B (Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 1M) en condiciones de carga (0% de Tampón B), 10 % de B, 20 % de B, 30 % de B, 40 % de B y 100 % de B, a un caudal de 0,7 ml/min. Material de fluido (FT) y cada etapa se recogió a medida que eluía de la columna en base a la absorbancia de UV. A partir de la capacidad de las fracciones para hidrolizar el sustrato peptídico sintético, h10 eluyó en la carga, muestras de 10 % y 20 % de B y c9 eluyó en la carga, muestras de 20 % y 30 % de B. El SDS-PAGE se usó para visualizar c9 y h10 en cada una de las muestras.

2,5 ml de cada etapa activa se concentraron 50 veces cargando las muestras sobre un filtro Millipore Centricon 3 kD MWCO (corte del peso molecular) (Millipore Corporation, Billerica, MA) y centrifugando a 7500 x g durante 2 horas a 4 °C. Esto tuvo como resultado la concentración del volumen restante sobre el filtro hasta aproximadamente 200 μ l. Después se añadieron 200 μ l de H₂O y el Centricon se centrifugó hasta un volumen final de ~50 μ l restante. La presencia de c9 y h10 en las etapas activas se confirmó mediante su capacidad para hidrolizar Pyr-Phe-Leu-pNA y el análisis de la secuencia de aminoácidos en N-terminal.

Ejemplo 5: Digestión de proteínas mediante proteasas catepsina c9 y h10 purificadas

β -caseína y κ -caseína (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y angiogenina (Bachem, 3700 Horizon Drive, King of Prussia, PA, USA) se digirieron con c9 y h10 purificadas para identificar posibles sitios de reconocimiento de escisión para estas dos catepsinas del gusano de la raíz del maíz occidental. Se realizaron ciclos de tiempo de escisión en tampón de proteólisis (fosfato sódico 100 mM (pH 6,5), KCl 0,3M, EDTA 0,1M y 100 % DE DMSO 1 mM) a 25 °C y las reacciones se pararon mediante la adición del inhibidor E-64 (3 μ l DE E-64 10Mm en 100 μ l del volumen de reacción). Los productos de la digestión se separaron mediante SDS-PAGE o se usaron para la CL-espectrometría de masas para identificar los sitios de escisión dentro de los sustratos de proteína/péptido de prueba. En el caso de SDS-PAGE, las digestiones se realizaron en geles de poliacrilamida al 10 % NuPage (Invitrogen) y los productos de la digestión se transfirieron a la membrana de PVDF de acuerdo con las instrucciones suministradas por las membranas ProBlott™ (Applied Biosystems Inc.). Las bandas de proteína se visualizaron mediante tinción de la membrana de transferencia con Ponceau S y las bandas visibles se cortaron para el análisis de la secuencia en N-terminal. Cuando se usó CL-espectrometría de masas, se inyectaron 20 μ l de los 100 μ l del volumen de reacción del digesto en la columna de HPLC Magic 2002 Microbore HPLC (Michrom Bioresources Inc., Auburn, CA) con una columna Magic C18 (150 mm x 1 mm; 200 Angstrom, perla de 5 μ m) unida a un espectrómetro de masas Micromass (Micromass, Beverly, MA) para obtener la información de la masa en los fragmentos de digestión. Los 80 μ l restantes de material se inyectaron en la Magic 2002 Microbore HPLC, y los picos se recogieron para la secuenciación de N-terminal.

El ciclo de tiempo de la digestión de β -caseína con c9 mostró un producto de digestión principal de ~19 kD (indicado con una cabeza de flecha negra) a los 2 minutos de la adición de la enzima. Tras 10 minutos, se observaron dos productos de digestión principales correspondientes al fragmento de 19 kD (de 2 minutos) y un nuevo fragmento de

16 kD. También se observaron fragmentos minoritarios adicionales a los 10 minutos que fueron más abundantes a los 30 minutos, indicativo de una escisión progresiva de los fragmentos de 19 kD y 16 kD en fragmentos más pequeños (indicados por cabezas de flecha de color gris). El análisis de la secuencia en N-terminal de los fragmentos de 19 kD y 16 kD correspondió al extremo N conocido de la β -caseína (p. ej., RELEELNVP; SEC ID N° 18), indicativo de una escisión en C-terminal por c9. El aislamiento mediante HPCL de los productos de digestión y el posterior análisis de la secuencia en N-terminal identificaron los sitios de escisión primarios y secundarios después de la Ser166 (LS/QS; SEC ID N° 2) y Leu140 (LL/QS; SEC ID N° 19) respectivamente. Se observaron sitios de escisión adicionales para β -caseína. La preferencia de un residuo hidrofóbico en la posición P₂' es consistente con los sitios de escisión conocidos de las proteasas catépsina L y, en este caso, se desvió hacia Leu (L) (es decir, 5 de 6 apariciones). En todos los casos, se observó una preferencia por un residuo polar en la posición P₁' siendo la Gln (Q) el más prevalente (4 de 6 apariciones).

La κ -caseína también se digirió con c9 y h10 y se determinó la especificidad del sitio de reconocimiento mediante los mismos procedimientos usados para β -caseína. En el caso de la κ -caseína se observaron sitios de escisión mayoritarios detectables tras Ser54, Asp62, Ser125, y Meta127. De nuevo, se observó una preferencia por el residuo hidrofóbico en la posición P₂' que era, principalmente, Leu (3 de 4 apariciones). En base a la información disponible sobre los sitios de escisión de β and κ caseína, parecía haber una fuerte desviación hacia Leu en la posición P₂' y un residuo de Gln en la posición P₁'. Dado que los sitios de escisión tanto primarios como secundarios en β -caseína contenían Gln-Ser en las posiciones P₁' y P₂', era probable que la Ser fuera una buena candidata para la posición P₃'. Por tanto, la secuencia Leu-X-Gln-Ser (LXQS; X= cualquier aminoácido; SEC ID N° 2) se escogió como secuencia de escisión reconocida por las catépsinas c9 y h10 del gusano de la raíz del maíz occidental.

Se descubrió que un péptido, angiogenina, disponible en (3700 Horizon Drive, King of Prussia, PA), contenía una secuencia con LDQS (SEC ID N° 20) adecuada al motivo LXQS (SEC ID N° 1) definido anteriormente. La angiogenina se sometió a escisión por c9 en tampón de proteólisis (véase anteriormente) durante 30 o 60 minutos a 25 °C y la reacción se terminó mediante la adición de E64. La identidad de los productos de escisión se aclaró mediante CL-EM en base a los pesos moleculares previstos a partir de la secuencia de la angiogenina. Se realizó el análisis de la secuencia N-terminal para confirmar los datos de CL-EM. Los resultados demostraron que, tras 30 minutos, se detectaron dos pares distintos de productos de escisión que correspondían a la escisión inmediatamente en N-terminal de Leu8 o de Gln10. Los tamaños relativos de los picos indicaron que la escisión en Gln10 (LD/QS; SEC ID N° 20) era el sitio de escisión primario preferido. Tras la digestión durante 60 minutos, los tamaños de los picos correspondientes a ambos productos de escisión aumentaron con LD/QS como la secuencia de reconocimiento de escisión preferencial. Esto demostró que c9 reconoce de forma eficaz el sitio de escisión LXQS (SEC ID N° 1).

Ejemplo 6. Incorporación de LXOS en el sitio de activación de Cry8 y demostración de que Cry8 se activa y es insecticida tras la ingestión por el gusano de la raíz del gusano del maíz occidental

Se sabe que varias proteínas Cry de Bt requieren una etapa de "activación" para la actividad insecticida en coleópteros. Esta etapa de activación está en forma de una muesca entre la hélice 3 y la hélice 4 en el dominio 1 que tiene como resultado un cambio conformacional que conduce a la inserción del dominio 1 (conducida por la hélice 4) en la membrana. No obstante, los dos polipéptidos creados por la escisión permanecen asociados en condiciones no desnaturalizantes. Como se demuestra en la solicitud de patente de EE.UU. n° 10/606.320 titulada "Genes que codifican proteínas con actividad pesticida" presentada el 25 de junio de 2003 y publicado como US 2004 0091505 el 13 de mayo de 2004, una proteína Cry8 modificada con la secuencia FRRG (SEC ID N° 21) o FRRG (SEC ID N° 22) insertada en el aminoácido 162 en la secuencia de la proteína Cry8 nativa da la proteína insecticida sin el requisito de activación por tripsina antes de la ingestión por el insecto. La funcionalidad del motivo LXQS (SEC ID N° 1) se analizó sustituyendo un motivo LXQS doble (p. ej., LXQSLXQS; SEC ID N° 3) en lugar de FRRGFRRG (SEC ID N° 23) en el mutante K05 de Cry8Bb1 (SEC ID N° 24 (secuencia de nucleótidos), SEC ID N° 25 (secuencia de aminoácidos)). En este caso se escogió la Ser para el residuo X (p. ej., LSQS; SEC ID N° 2) dado que el sitio de escisión principal en la β -caseína contenía una Ser en la posición P₁'. La protoxina Cry8Bb1 modificada resultante se denominó ISC-1 (SEC ID N° 26 (secuencia de nucleótidos); SEC ID N° 27 (secuencia de aminoácidos)).

Los resultados del bioensayo con larvas neonatas del gusano de la raíz del maíz occidental se realizaron con 1 mg/ml de mutantes K04 de Cry8Bb1 (SEC ID N° 28) e ISC-1 para comparar su actividad insecticida. Cry8Bb1-K04 contiene FRRGFRRG (SEC ID N° 23) en el aminoácido 162 y anteriormente se ha demostrado que es activa a 1 mg/ml sin la necesidad de una etapa de pre-tripsinización para activar la Cry8. Los resultados de los bioensayos mostrados en la Tabla 2 indican que la secuencia LSQSLSQS (SEC ID N° 4) es reconocida por las proteasas digestivas del gusano de la raíz del algodón occidental. La actividad insecticida es comparable con la de Cry8Bb1-K04. Además, los supervivientes de las larvas tratadas con ISC-1 estaban intensamente atontados en comparación con los supervivientes de Cry8Bb1-K04.

Tabla 2. Resultados del bioensayo de Cry8Bb1-K04 en comparación con ISC-1.	Porcentaje de mortalidad
Muestra (1 mg/ml)	
Cry8 K04	47 % (ms*)
ISC-1	43 % (ss**)
*supervivientes moderadamente atontados	
**supervivientes intensamente atontados	

Ejemplo 7: Resistencia del motivo a la escisión mediante digestibilidad con serina proteasas

Con el fin de confirmar que el motivo de tipo catepsina LSQSLSQS (SEC ID N° 4) no era susceptible a las serina proteasas (p. ej., tripsina y quimotripsina) se produjeron polipéptidos de 88 kDa de Cry8Bb1-KOS (SEC ID N° 25) y Cry8Bb1-ISC-1 (SEC ID N° 27). Cry8Bb1-KOS tiene el motivo FRGFRRG (SEC ID N° 23) en el bucle de activación que anteriormente se había mostrado que era escindido por ambas serina proteasas. Se demostró que Cry8Bb1-K05 era activa en bioensayos contra WCRW, SCRW y CPB sin activación previa con tripsina. Cry8Bb1-ISC-1 tiene el nuevo motivo de proteasa de tipo catepsina LSQSLSQS (SEC ID N° 4). Cinco microgramos de proteína de cada polipéptido se incubaron con 1/50 (P/P) de tripsina y quimotripsina a temperatura ambiente durante 72 horas. Después se realizó el análisis SDS-PAGE. Como cabía esperar, los resultados mostraron que Cry8Bb1-K05 se escindía dentro del bucle entre la hélice 3 y 4 del dominio 1 de la molécula de la toxina para generar un polipéptido de 55 kDa. La escisión del bucle de activación entre las hélices 3 y 4 se confirmó mediante secuenciación en N-terminal. En contraste con ello, el polipéptido de 88 kDa Cry8Bb1-ISC-1 no se escindió dentro del bucle de activación para generar el polipéptido de 55 kDa.

El mismo experimento se repitió usando jugo de intestino medio de WCRW de proteasas purificadas. Los datos indicaron que ambas moléculas de toxina eran escindidas por una proteasa presente en el jugo de intestino medio de WCRW para producir el polipéptido de 55 kDa.

Bioensayos

Los polipéptidos de 88 kDa de Cry8Bb1-K05 y Cry8Bb1-ISC-1 se analizaron después para determinar la actividad contra WCRW, SCRW y CPB. Ambas toxinas tenían una actividad significativa contra los tres insectos. Estos bioensayos confirman que el polipéptido de 88 kDa de Cry8Bb1-ISC-1 era tan activo como el polipéptido de 88 kDa de Cry8Bb1-K05.

En resumen, la activación del bucle es crítica para la actividad de la toxina. Los experimentos anteriores demuestran que el polipéptido de 88 kDa de Cry8Bb1-ISC-1 es una serina proteasa resistente pero sigue siendo activada por el jugo de intestino medio de un insecto coleóptero. Por tanto, el nuevo motivo LSQSLSQS (SEC ID N° 4) es específico de insectos.

Ejemplo 8: Transformación y Regeneración de plantas transgénicas

Embriones de maíz inmaduros de plantas donantes de invernadero se bombardean con un plásmido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la protoxina Cry8Bb1 modificada de ISC-1 descrita en el presente documento en el Ejemplo 6 (SEC ID N° 26) unida operablemente al promotor de la ubiquitina y el gen marcador seleccionable PAT (Wohleben y col. (1988) Gene 70:25-37), que confiere resistencia al herbicida bialafos. Como alternativa, el gen marcador seleccionable se proporciona en un plásmido aparte. La transformación se realiza del siguiente modo. Después se exponen las recetas de los medios.

Preparación del tejido diana

Las espigas se limpian y se esteriliza la superficie con lejía Clorox al 30 % más 0,5 % de detergente micro durante 20 minutos y se aclara dos veces con agua estéril. Los embriones inmaduros se extirpan y se colocan con el eje del embrión hacia abajo (SCUTELLUM hacia arriba), 25 embriones por placa, en medio 560Y durante 4 horas y, después, se alinean dentro de la zona diana de 2m5 cm en preparación del bombardeo.

Se fabrica un vector plasmídico que comprende la secuencia de nucleótidos de la protoxina Cry8 modificada unida operablemente al promotor de la ubiquitina. Este ADN plasmídico más el ADN plasmídico que contiene un marcador seleccionable PAT se precipita sobre sedimentos de tungsteno de 1,1 µm (diámetro medio) usando un procedimiento de precipitación en CaCl₂ del siguiente modo: Se prepararon 100 µl de partículas de tungsteno en agua; 10 µl (1 µg) de ADN en tampón tris EDTA (1 µg de ADN total); 100 µl de CaCl₂ 2,5M y 10 µl de espermidina

0,1M.

Cada reactivo se añade secuencialmente a la suspensión de partículas de tungsteno, manteniéndola en el agitador vórtex de múltiples tubos. La mezcla final se sometió a ultrasonidos brevemente y se dejó incubar en agitación constante en vórtex durante 10 minutos. Después del periodo de precipitación, los tubos se centrifugaron brevemente, se retiró el líquido con 500 ml de etanol al 100% y se centrifugaron durante 30 segundos. De nuevo se retiró el líquido y se añadieron 105 µl de etanol al 100% al sedimento de partículas de tungsteno final. Para el bombardeo con pistola de partículas, las partículas de tungsteno/ADN se sometieron brevemente a ultrasonidos y se colocaron 10 µl sobre el centro de cada macrovehículo y se dejó secar aproximadamente 2 minutos antes del bombardeo.

Las placas de muestra se bombardearon al nivel 4 en una pistola de partículas. Todas las muestras reciben un único disparo a 4,4 MPa y se extrajo un total de diez alícuotas de cada tubo de ADN /partículas preparado.

Tras el bombardeo, los embriones se mantuvieron en medio 560Y durante 2 días, después se transfirieron al medio de selección 560R que contiene 3 mg/litro de bialafos y se subcultivaron cada 2 semanas. Después de aproximadamente 10 semanas de selección, los clones de callos resistentes a la selección se transfirieron a medio 288 J para iniciar la regeneración de la planta. Tras la maduración del embrión somático (2-4 semanas), los embriones somáticos bien desarrollados se transfirieron al medio para germinación y se transfirieron al cuarto de cultivo con luz. Aproximadamente 7-10 días después, las plántulas en desarrollo se transfirieron al medio 272V sin hormonas en tubos de 7-10 días hasta que las plántulas estaban bien establecidas. Después, las plantas se transfirieron a insertos en platillos (equivalente a maceta de 6,35 cm) que contienen terrenos de sembrado y se cultivaron durante 1 semana en una cámara de crecimiento, después se cultivaron 1-2 semanas adicionales en el invernadero, después se transfirieron a 600 macetas clásicas (6 litros) y se cultivaron hasta la madurez. Las plantas se monitorizaron y puntuaron según la expresión de la protoxina Cry8 modificada mediante ensayos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, inmunoensayos y transferencia de tipo western.

Análisis de plantas de maíz transgénico

Las plantas de maíz transgénico para la expresión de la protoxina Cry8 modificada se analizan para determinar la resistencia al WCRW usando los bioensayos estándar conocidos en la técnica. dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, bioensayos de escisión de raíz y bioensayos de planta entera. Véase, *por ejemplo*, la publicación de patente de EE.UU. nº US 2003/0120054 y la publicación internacional nº WO 03/018810.

El medio de bombardeo (560 Y) comprende sales basales N6 4,0 g/l (SIGMA C-1416), mezcla de vitamina Ericsson 1,0 ml/l (1000X SIGMA-1511), tiamina HCl 0,5 mg/ml, sacarosa 120,0 g/l, 1,0 mg/l de 2,4-D y L-prolina 2,88 g/l (hasta un volumen con H₂O desionizada tras el ajuste al pH 5,8 con KOH); 2,0 g/l de gelrite (añadido después de llevar al volumen con H₂O desionizada) y 8,5 mg/l de nitrato de plata (añadido después de esterilizar el medio y enfriar hasta la temperatura ambiente). El medio de selección (560R) comprende sales basales N6 4,0 g/l (SIGMA C-1416), mezcla de vitamina Ericsson 1,0 ml/l (1000X SIGMA-1511), tiamina HCl 0,5 mg/ml, sacarosa 30,0 g/l y 2,0 mg/l de 2,4-D (llevado hasta un volumen con H₂O desionizada tras el ajuste al pH 5,8 con KOH); 3,0 g/l de gelrite (añadido después de llevar al volumen con H₂O desionizada) y 0,85 mg/l de nitrato de plata y 3,0 mg/l de bialafos (ambos añadidos después de esterilizar el medio y enfriar hasta la temperatura ambiente).

El medio para regeneración de plantas (288J) comprende 4,3 g/l de sales MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de solución madre de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,03 g/l de tiamina HCl, 0,10 g/l de piridoxina HCl y 0,40 g/l de glicina llevados hasta un volumen con H₂O desionizada depurada (Murashige y Skoog (1962) *Physiol. Plant.* 15:473), 100 mg/l de mioinositol, 0,5 mg/l de zeatina, 60 g/l de sacarosa y 1,0 ml/l de ácido abscísico 0,1 mM (llevado hasta un volumen con H₂O desionizada depurada después de ajustar a un pH 5,6);

3,0 g/l de Gelrite (añadido después de llevar hasta el volumen con H₂O desionizada); y 1,0 mg/ml de ácido indolacético y 3,0 mg/l de bialafos (añadido después de esterilizar el medio y enfriar hasta 60 °C). El medio sin hormonas (272V) comprende 4,3 g/l de sales MS (GIBCO 11117-074), 5,0 ml/l de solución madre de vitaminas MS (0,100 g de ácido nicotínico, 0,03 g/l de tiamina HCl, 0,10 g/l de piridoxina HCl y 0,40 g/l de glicina llevados hasta un volumen con H₂O desionizada depurada) 0,1 g/ml de mioinositol y 40,0 g/l sacarosa (llevados hasta el volumen con H₂O desionizada después de ajustar hasta un pH de 5,6); y 6 g/l de agar bacto (añadido después de llevar al volumen con H₂O desionizada) esterilizado y enfriado hasta 60 °C.

Ejemplo 9: Transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*-

Para la transformación del maíz mediada por *Agrobacterium* con la protoxina Cry8 modificada del Ejemplo 7, se emplea el procedimiento de Zhao (patente de EE.UU. 5,981,840 y publicación de patente internacional nº WO 98/32326). Brevemente, se aislaron embriones inmaduros de maíz y los embriones se pusieron en contacto con una suspensión de *Agrobacterium* en la que las bacterias eran capaces de transferir la protoxina Cry8 modificada a al menos una célula de al menos uno de los embriones inmaduros (etapa 1: etapa de infección). En esta etapa, los embriones inmaduros se sumergieron en una suspensión de *Agrobacterium* para el inicio de la inoculación. Los embriones se co-cultivan durante un tiempo con *Agrobacterium* (etapa 2: etapa co-cultivo). Los embriones

inmaduros se cultivaron en medio sólido después de la etapa de infección. Tras este periodo de co-cultivo se contempla una etapa “de descanso” opcional. En esta etapa de descanso, los embriones se incubaron en presencia de al menos un antibiótico conocido que inhibe el crecimiento de *Agrobacterium* sin la adición de un agente selectivo para los transformantes de plantas (etapa 3: etapa de descanso). Los embriones inmaduros se cultivaron en medio sólido con antibiótico, pero sin un agente de selección, para la eliminación de *Agrobacterium* y durante una fase de descanso para las células infectadas. A continuación, los embriones inoculados se cultivaron en medio que contiene un agente selectivo y se recuperaron los callos transformados en crecimiento (etapa 4: Etapa de selección). Los embriones inmaduros se cultivaron en medio sólido con un agente selectivo que tuvo como resultado el crecimiento selectivo de las células transformadas. A continuación, los callos se regeneraron en plantas (etapa 5: etapa de regeneración) y los callos cultivados en medio selectivo se cultivaron en medio sólido para regenerar las plantas. Las plantas de maíz transgénico positivas para la expresión de la protoxina Cry8Bb1 modificada se analizaron para determinar la resistencia a WCRW, como se ha descrito en el ejemplo 7.

Ejemplo 10: Transformación de embriones de soja

Embriones de soja se bombardean con un plásmido que contiene la protoxina Cry8 modificada del Ejemplo 7 unida operablemente al promotor de la ubiquitina del siguiente modo: Para inducir embriones somáticos, cotiledones, diseccionados de 3-5 mm de longitud de semillas inmaduras de superficie esterilizada del cultivo de soja A2872, se cultivan en luz u oscuridad a 26 °C en un medio agar adecuado durante de seis a diez semanas. Los embriones somáticos productores de embriones secundarios se extirpan y se introducen en un medio líquido adecuado. Después de la selección repetida de grupos de embriones somáticos que se multiplicaron en la etapa globular del embrión, las suspensiones se mantienen como se describe a continuación.

Los cultivos de suspensión embrionaria de soja se pueden mantener en medio líquido de 35 ml en un agitador rotatorio, a 150 rpm, a 26 °C con luz fluorescente en un programa de 16:8 horas de día/noche. Los cultivos se subcultivan cada dos semanas mediante inoculación a aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de medio líquido.

A continuación, los cultivos de suspensión embrionaria de soja se pueden transformar mediante el procedimiento de bombardeo con pistola de partículas (Klein y col. (1987) Nature (London) 327:70-73, patente de EE.UU. nº 4.945.050).

Un gen marcador seleccionable que se puede usar para facilitar la transformación de soja es un transgen compuesto por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell y col. (1985) Nature 313:810-812); el gen de la higromicina fosfotransferasa del plásmido pJR225 (de *E. coli*; Gritz y col. (1983) Gene 25: 179-188), y la región 3' del gen de la nopalina sintasa del ADN-T del plásmido Ri de *Agrobacterium tumefaciens*. El casete de expresión que comprende la protoxina Cry8 modificada unida operablemente al promotor de la ubiquitina se puede aislar como fragmento de restricción. Después, este fragmento se puede insertar en un sitio de restricción único del vector portador del gen marcador.

A 50 µl de una suspensión de partículas de oro 60 mg/ml de 1 µm se añaden (en orden): 5 µl de ADN (1 µg/µl), 20 µl de espermidina (0,1M) y 50 µl de CaCl₂ (2,5M). La preparación de las partículas se agita después durante tres minutos, se centrifugan en una microfuga durante 10 segundos y se retira el sobrenadante. Las partículas recubiertas con ADN se lavan después una vez en 400 µl de etanol al 70 % y se resuspenden en 40 µl de etanol anhidro. La suspensión de ADB/partícula se puede someter a ultrasonidos tres veces durante un segundo cada vez. Después, cinco microlitros de las partículas de oro recubiertas con ADN se cargan en cada macroplaca transportadora.

Aproximadamente 300-400 mg de un cultivo de suspensión de dos semanas se introducen en una placa petri de 60 x15 mm vacía y el líquido residual se retira del tejido con una pipeta. Para cada experimento de transformación normalmente se bombardean aproximadamente 5-10 placas de tejido. La presión de rotura de la membrana se fija a 7,5 MPa y la cámara se evacua hasta un vacío de 71 cm de mercurio. El tejido se coloca a aproximadamente 8,9 cm de la malla de retención y se bombardea tres veces. Tras el bombardeo, el tejido se puede dividir por la mitad y volver a colocar en líquido y cultivar como se ha descrito anteriormente.

De cinco a siete días después del bombardeo, el medio líquido se puede intercambiar con medio fresco y de once a doce días después del bombardeo con medio fresco que contiene 50 mg/ml de higromicina. Este medio selectivo se puede refrescar semanalmente. De siete a ocho semanas después del bombardeo se puede observar tejido verde transformado en crecimiento en grupos embrionarios necróticos no transformados. El tejido verde aislado se retira e inocula en matraces individuales para generar nuevos cultivos de suspensión embrionarios transformados y clonalmente propagados. Cada línea nueva se puede tratar como un acontecimiento de transformación independiente. Estas suspensiones se pueden subcultivar después y mantener como grupos de embriones inmaduros o regenerar en plantas enteras mediante maduración y germinación de embriones somáticos individuales.

Ejemplo 11: Transformación de embriones de sojaCondiciones del cultivo

Cultivos de suspensión embrionarios de soja (cv. Jack) se mantienen en 35 ml de medio líquido SB196 (véase las recetas más adelante) en un agitador rotatorio, a 150 rpm, a 26 °C con luces fluorescentes blancas frías en un fotoperiodo de 16:8 horas de día/oscuridad a una intensidad de luz de 60-85 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$. Los cultivos se subcultivan cada 7 días a dos semanas mediante inoculación de aproximadamente 35 mg de tejido en 35 ml de medio líquido fresco SB196 (el intervalo del subcultivo preferido es cada 7 días).

Los cultivos de suspensión embrionaria de soja se transforman con los plásmidos y los fragmentos de ADN descritos en los ejemplos siguientes mediante el procedimiento de bombardeo con pistola de partículas (Klein y col. (1987) Nature, 327:70).

Inicio del cultivo de suspensión embrionario de soja

Los cultivos de soja se inician dos veces al mes con 5-7 días entre cada inicio.

Las vainas con semillas inmaduras de plantas de soja disponibles 45-55 días después de plantar se escogen, retiran de sus cáscaras y colocan en una caja magenta esterilizada. Las semillas de soja se esterilizan agitándolas durante 15 minutos e una solución de Clorox al 5 % con 1 gota de jabón de marfil (95 ml de agua destilada autoclavada más 5 ml de Clorox y 1 gota de jabón). Mezcla bien. Las semillas se lavan usando 2 frascos de 1 litro de agua destilada estéril y las de menos de 4 mm se colocan en portaobjetos para microscopio individuales. El extremo pequeño de las semillas se corta y los cotiledones se sacan mediante presión del recubrimiento de la semilla. Los cotiledones se transfieren a placas que contienen medio SB1 (25-30 cotiledones por placa). Las placas se envuelven con cinta de fibra y se almacenan durante 8 semanas. Después de este tiempo, los embriones secundarios se cortan y se introducen en medio líquido SB196 durante 7 días.

Preparación de ADN para bombardeo

Para el bombardeo se usa un plásmido intacto o un fragmento de plásmido con ADN que contiene los genes de interés y el gen marcador seleccionable. El ADN del plásmido para el bombardeo se preparan de forma rutinaria y se purifican usando el procedimiento descrito en Promega™ Protocols and Applications Guide, Second Edition (página 106). Los fragmentos de los plásmidos que contienen la protoxina Cry8 modificada del ejemplo 7 unida operablemente al promotor de ubiquitina mediante aislamiento en gel de los plásmidos sometidos a digestión doble. En cada caso, 100 μg del ADN del plásmido se digieren en 0,5 ml de la mezcla enzimática específica que es adecuada para el plásmido de interés. Los fragmentos de ADN resultantes se separan mediante electroforesis en gel en 1 % de gel de agarosa SeaPlaque GTG (agarosa (BioWhittaker Molecular Applications) y los fragmentos de ADN que contienen la protoxina Cry8 modificada del Ejemplo 7 se cortan del gel de agarosa. El ADN se purifica del agar usando el GEL como enzima de digestión siguiendo el protocolo del fabricante.

Un alícuota de 50 μl de agua destilada estéril que contiene 3 mg de partículas de oro (3 mg de oro) se añaden a 5 μl de una solución de ADN de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (bien plásmido intacto o fragmento de ADN preparado con se ha descrito anteriormente, 50 μl de CaCl_2 2,5M y 20 μl de espermidina 0,1M. La mezcla se agita 3 minutos al nivel 3 de un agitador vórtex y se centrifuga durante 10 segundos en una microfuga de mesa. Después de lavar con 400 μl de etanol al 100 %, el sedimento se suspende mediante ultrasonidos en 40 μl de etanol al 100 %- Se dispensan cinco μl de suspensión de ADN en cada placa del disco del instrumento Biolistic PDS1000/HE. Cada alícuota de 5 μl contiene aproximadamente 0,375 mg de oro por bombardeo (es decir, por disco).

Preparación del tejido y bombardeo con ADN

Aproximadamente 150-200 mg de los cultivos en suspensión embrionaria de 7 días se introducen en una placa petri vacía estéril de 60 x 15 mm y la placa se cubre con una malla de plástico. El tejido se bombardea con 1 o 2 disparos por placa con la presión de rotura de la membrana fijada a 7,5 MPa y la cámara se evacua hasta un vacío de 711,20 mm de mercurio. El tejido se coloca a aproximadamente 8,9 cm de la pantalla de retención/detención.

Selección de los embriones transformados

Los embriones transformados se seleccionaron usando higromicina (cuando se usó el gen de higromicina fosfotransferasa, HPT, como marcador de selección) o clorosulfurón (cuando se usó como marcador de selección el gen de la acetolactato sintasa, ALS).

Selección en higromicina (HPT)

Tras el bombardeo, el tejido se coloca en medio SB196 fresco y se cultiva como se ha descrito anteriormente. Seis

días después del bombardeo se cambia el medio SB196 por SB196 fresco que contiene un agente de selección de 30 mg/l de higromicina. El medio de selección se refresca semanalmente. De cuatro a seis semanas después de la selección se puede observar tejido verde transformado en crecimiento en grupos embrionarios necróticos no transformados. El tejido verde aislado se retira e inocula en placas de múltiples pocillos para generar nuevos cultivos de suspensión embrionarios transformados y clonalmente propagados.

Selección en clorosulfón (ALS)

Tras el bombardeo, el tejido se divide entre 2 matraces con medio SB196 fresco y se cultiva como se ha descrito anteriormente. De seis a siete días después del bombardeo se cambia el medio SB196 por SB196 fresco que contiene un agente de selección de 100 ng/l de clorosulfurón. El medio de selección se refresca semanalmente. De cuatro a seis semanas después de la selección se puede observar tejido verde transformado en crecimiento en grupos embrionarios necróticos no transformados. El tejido verde aislado se retira e inocula en placas de múltiples pocillos que contienen SB196 para generar nuevos cultivos de suspensión embrionarios transformados y clonalmente propagados.

Regeneración de embriones somáticos de soja en plantas

Con el fin de obtener plantas enteras de cultivos de suspensión embrionarios, el tejido se debe regenerar.

Maduración del embrión

Los embriones se cultivan durante 4-6 semanas a 26 °C en SB196 en luz blanca fluorescente fría (Phillips cool white Econowatt F40/CW/RS/EW) y bulbos Agro (Phillips F40 Agro) (40 vatios) en un fotoperiodo de 16:8 horas con intensidad de luz 90-120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$. Después de este tiempo, los grupos de embriones se introducen en un medio de agar sólido, SB166, durante 1-2 semanas. Después, los grupos se subcultivan en medio SB103 durante 3 semanas. Durante este periodo, los embriones individuales se pueden extraer de los grupos y someter a detección selectiva según el fenotipo deseado. Cabe destacar que cualquier fenotipo detectable resultante de la expresión de los genes de interés podría someterse a detección selectiva en esta etapa.

Dsecación y germinación del embrión

Los embriones individuales maduros se desecan introduciéndolos en una placa petri pequeña y vacía (35 x 10 mm) durante aproximadamente 4-7 días. Las placas se sellan con cinta de fibra (creando una cámara de humedad pequeña). Los embriones desecados se siembran en medio SB71-4, en el que se deja germinar en las mismas condiciones de cultivo descritas anteriormente. Las plántulas germinadas se retiran del medio de germinación y se lavan exhaustivamente con agua, y después se siembran en Redi-Earth en una bandeja de 24 celdas cubierta con una bóveda de plástico transparente. Tras 2 semanas se retira la bóveda y las plantas se endurecen durante otra semana. Si las plántulas parecían duras, se transplantan a una maceta de 25 cm de Redi-Earth con hasta 3 plántulas por maceta. Tras de 10 a 16 semanas se recogen las semillas maduras, se trituran y se analizan las proteínas.

Recetas de medios

Medio líquido de proliferación 58196 -FN Lite (por litro)

MS FeEDTA -100x Reserva 1	10 ml
MS Sulfato -100x Reserva 2	10 ml
FN Lite Haluros -100x Reserva 3	10 ml
FN Lite P,B,Mo -100x Reserva 4	10 ml
Vitaminas B5 (1 ml/l)	1,0 ml
2,4-D (concentración final 10 mg/l)	1,0 ml
KNO ₃	2,83 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,463 g
Asparagina	1,0 g
Sacarosa (1 %)	10 g
pH 5,8	

Soluciones madre FN Lite

Reserva nº		1.000 ml	500 ml
1)	MS Fe EDTA Reserva 100x		
	Na ₂ EDTA*	3.724 g	1.862 g
	FeSO ₄ -7H ₂ O	2.784 g	1.392 g
	*Añadir primero disolvente en un frasco oscuro en agitación		
2)	MS Sulfato -100x Reserva		
	MgSO ₄ -7H ₂ O	37,0 g	18,5 g
	MnSO ₄ -7H ₂ O	1,69 g	0,845 g
	ZnSO ₄ -7H ₂ O	0,86g	0,43 g
	CuSO ₄ -5H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
3)	FN Lite Haluros -100x Reserva		
	CaCl ₂ -2H ₂ O	30,0 g	15,0 g
	KI	0,083 g	0,0715 g
	CaCl ₂ -6H ₂ O	0,0025 g	0,00125 g
4)	FN Lite P, B, Mo 100 x Reserva		
	KH ₂ PO ₄	18,5 g	9,25 g
	H ₃ BO ₃	0,62 g	0,31 g
	Na ₂ MoO ₄ -2H ₂ O	0,025 g	0,0125 g

5 Medio sólido SB1 (por litro) comprende: 1 paquete. Sales MS (Gibcol BRL –Nº cat. 11117-066); 1 ml de vitaminas B5 1000X reserva; 31m5 g de sacarosa; 2 ml de 2,4-D (concentración final 20mg/l); pH 5,7; y 8 g de agar TC.

10 Medio sólido SB166 (por litro) comprende: 1 paquete. Sales MS (Gibcol BRL –Nº cat. 11117-066); 1 ml de vitaminas B5 1000X reserva; 60 g de maltosa; 750 mg de MgCl₂ hexahidrato; 5 g de carbón activado; pH 7,5 y 2 g de gertite.

15 Medio sólido SB103(por litro) comprende: 1 paquete. Sales MS (Gibco/BRL –nº cat. 11117-066); 1 ml de vitaminas B5 100 X reserva;60 g de maltosa; 750 mg de MgCl₂ hexahidrato; pH 7,5 y 2 g de gertite

Medio sólido SB 71-4 (por litro) comprende: 1 frasco de sales B5 de Gamborg con sacarosa (Gibco/BRL – nº de cat. 21153-036); pH 5,7; y 5 g de agar TC.

20 Se obtiene una reserva de 2,4-D preparada a partir de Phytotech, nº cat. D 295, la concentración es de 1 mg/ml

Reserva de vitaminas B5 (por 100 ml) que se almacena en alícuotas a -20 °C comprende: 10 g de mioinositol; 100 mg de ácido nicotínico; 100 mg de piridoxina HCl y 1 g de tiamina. Si la solución no se disuelve lo bastante rápido, aplíquese un nivel bajo de calor mediante el plato caliente de agitación. La reserva de clorosulfurón comprende 1 mg/ml en hidróxido amónico 0,01N.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pioneer Hi-Bred International, Inc. E. I. DuPont De Nemours & Company

5 <120> Secuencias de reconocimiento de proteasa específicas de insecto

<130> 1993-PCT

<150> 60/688,635

10 <151> 2005-06-08

<150> 60/722,787

<151> 2005-09-30

15 <160> 28

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

20 <211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Sitio proteolítico

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa =Cualquier aminoácido

30 <400> 1

Leu Xaa Gln Ser
1 .

35

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sitio proteolítico

45 <400> 2

Leu Ser Gln Ser
1

50 <210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Sitio proteolítico

<221> VARIANTE

<222> 2,6

60 <223> Xaa =Cualquier aminoácido

<400> 3

ES 2 368 499 T3

Leu Xaa Gln Ser Leu Xaa Gln Ser
1 5

5 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sitio proteolítico

<400> 4

Leu Ser Gln Ser Leu Ser Gln Ser
1 5

15 <210> 5
<211> 4
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de aminoácidos localizada entre las hélices alfa 3 y 4 del dominio 1 de la toxina Cry8Bb1

25 <400> 5

Asn Gly Ser Arg
1

30 <210> 6
<211> 1035
<212> ADN
<213> Diabrotica virgifera virgifera

35 <400> 6
gaaaaatcag aatgaagctg ttcacccctt ccgctgccct tattgtggcc acaagtgcc 60
atctaggtgc cttcgaaaaa tggaccagt ttaaggcaac ccataacaaa tcttacaacg 120
ttattgaaga caaacttcgt ttcgctgttt tccaagacaa cctcaaaaaa atcgaggaa 180
acaatgctaa atacgaaagt ggagaagaaa cctactactt ggctgttaac aaattcgccg 240
attggtccag cgtgaattc caagctatgt tggcccgtca gatggctaac aagcccaaac 300
aatcctttat tgcaaaacac gtagccgatc ccaatgtcca agctgtagaa gaagttgatt 360
ggagagatag tgccgttttg ggagtc aaag atcaaggaca gtgtggatca tgctgggctt 420
tcagtaccac cggatccctc gaaggtcaac tcgccatcca caaaaatcaa cgtgttcctc 480
tcagtgaaca agaattggta gactgtgaca catcaagaaa tgctgggtgt aacggagggt 540
tgatgacaga tgcccttaac tatgttaaac gccatggtct ctctccgaa tctcaatatg 600
catacaccgg cagagatgat cgctgcaaga atgttgagaa caaaccactc tctccatta 660
gtggctacgt agaacttgaa acaactgaag atgcaactgc gtccgctgtt gctagcgtag 720
gtccagtttc catcgctgtt gatgctgata catggcaatt atacggagggt ggacttttca 780
acaacaaaaa ctgtagaacc aacctcaatc acggtgttct tgctgttgga tacactaaag 840
atgcattcat tgtcaagaac tcatggggaa ctgctggggg tgaacaaggt tacatcagag 900
ttgcccggtg tgaaaacttg tgtggtatta acctcatgaa ctcttaccct aaattgtaaa 960
tgatttaatg caaatgaaac accaaataga attcaaaaat aaagataaat aaaaaactaa 1020
aaaaaaaaaa aaaaaa 1035

<212> PRT
40 <213> Diabrotica virgifera virgifera

<400> 7

```

Met Lys Leu Phe Ile Leu Ala Ala Ala Leu Ile Val Ala Thr Ser Ala
 1           5           10           15
Asn Leu Gly Ala Phe Glu Lys Trp Thr Ser Phe Lys Ala Thr His Asn
          20           25           30
Lys Ser Tyr Asn Val Ile Glu Asp Lys Leu Arg Phe Ala Val Phe Gln
          35           40           45
Asp Asn Leu Lys Lys Ile Glu His Asn Ala Lys Tyr Glu Ser Gly
          50           55           60
Glu Glu Thr Tyr Tyr Leu Ala Val Asn Lys Phe Ala Asp Trp Ser Ser
65           70           75           80
Ala Glu Phe Gln Ala Met Leu Ala Arg Gln Met Ala Asn Lys Pro Lys
          85           90           95
Gln Ser Phe Ile Ala Lys His Val Ala Asp Pro Asn Val Gln Ala Val
          100          105          110
Glu Glu Val Asp Trp Arg Asp Ser Ala Val Leu Gly Val Lys Asp Gln
          115          120          125
Gly Gln Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Thr Thr Gly Ser Leu Glu
130          135          140
Gly Gln Leu Ala Ile His Lys Asn Gln Arg Val Pro Leu Ser Glu Gln
145          150          155          160
Glu Leu Val Asp Cys Asp Thr Ser Arg Asn Ala Gly Cys Asn Gly Gly
          165          170          175
Leu Met Thr Asp Ala Phe Asn Tyr Val Lys Arg His Gly Leu Ser Ser
          180          185          190
Glu Ser Gln Tyr Ala Tyr Thr Gly Arg Asp Asp Arg Cys Lys Asn Val
          195          200          205
Glu Asn Lys Pro Leu Ser Ser Ile Ser Gly Tyr Val Glu Leu Glu Thr
210          215          220
Thr Glu Asp Ala Leu Ala Ser Ala Val Ala Ser Val Gly Pro Val Ser
225          230          235          240
Ile Ala Val Asp Ala Asp Thr Trp Gln Leu Tyr Gly Gly Gly Leu Phe
          245          250          255
Asn Asn Lys Asn Cys Arg Thr Asn Leu Asn His Gly Val Leu Ala Val
          260          265          270
Gly Tyr Thr Lys Asp Ala Phe Ile Val Lys Asn Ser Trp Gly Thr Ser
          275          280          285
Trp Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Val Ala Arg Gly Glu Asn Leu Cys
290          295          300
Gly Ile Asn Leu Met Asn Ser Tyr Pro Lys Leu
305          310          315

```

- 5 <210> 8
 <211> 1034
 <212> DNA
 <213> *Diabrotica virgifera virgifera*

10 <400> 8

```

tttttagtgag agaaaaactca aaatgaagct gttaattcta gccgccaccc tcattgtggc 60
cataaatgcc aatttatctg cctttgagca atggaccagt tttaaggcaa cacacaacaa 120
attttacaac gttattgagg acaaacttcg ttttgctgtt ttccaagaga atctccgcaa 180
aatcgacgca cacaatgcta aatacgaaaa gggagaagaa acctactaca tggctgttaa 240
caaattcgcc gatttgtcca gcgcagaatt ccaagccatg ttggaccgtc agatggctaa 300
caagccaaaa caatccttca ttgcaaaaca cgtagtcgat cccaatgtcc aagctgtaga 360
agaagttgat tggagagaaa gtgctgtttt gggagtcaaa gatcaaggac agtgtggatc 420
atgctgggct ttcagtacca ccgatccct cgaaggtcaa ctcgccatcc acaaaaatca 480
acgtgttcct ctcagtgaac aagaattggt agactgtgat aaggtaaacy atggttgtga 540

```

```

cggagggtttg atgacagatg ccttctttta tattgaacat catgggtcttt catcagaaga 600
acaatacccc tatacaggcg tagatgggtca ttgcaatcat gtaaaagaca aacaagtctc 660
ttcgaatcagt gggtacgtcg aacttgatga aactgaaagt gctctagctg atgctctcgc 720
taatgttggg ccagtgtcaa tagctgtcga agctgataca tggcaattct attcaggtgg 780
agttttcaac aataaaaatt gtggagacgc tcttaaccac ggtgttcttg ctgtgggata 840
cactaaagat gtcttcatcg ttaaaaactc atgggggaaca ggctgggggtg aacaagggtta 900
catcagagtt gcccggtgga gcaacttatg tggattatac ctcatgaact cttaccccaa 960
gttgtagata acagttaatg aaaagtgata tatttataat aataaatgat ataaattaca 1020
aaaaaaaaaa aaaa

```

<210> 9

<211>314

<212> PRT

5 <213> Diabrotica virgifera virgifera

<400> 9

```

Met Lys Leu Leu Ile Leu Ala Ala Thr Leu Ile Val Ala Ile Asn Ala
1      5      10
Asn Leu Ser Ala Phe Glu Gln Trp Thr Ser Phe Lys Ala Thr His Asn
20     25     30
Lys Phe Tyr Asn Val Ile Glu Asp Lys Leu Arg Phe Ala Val Phe Gln
35     40     45
Glu Asn Leu Arg Lys Ile Asp Ala His Asn Ala Lys Tyr Glu Lys Gly
50     55     60
Glu Glu Thr Tyr Tyr Met Ala Val Asn Lys Phe Ala Asp Trp Ser Ser
65     70     75
Ala Glu Phe Gln Ala Met Leu Asp Arg Gln Met Ala Asn Lys Pro Lys
85     90     95
Gln Ser Phe Ile Ala Lys His Val Val Asp Pro Asn Val Gln Ala Val
100    105    110
Glu Glu Val Asp Trp Arg Glu Ser Ala Val Leu Gly Val Lys Asp Gln
115    120    125
Gly Gln Cys Gly Ser Cys Trp Ala Phe Ser Thr Thr Gly Ser Leu Glu
130    135    140
Gly Gln Leu Ala Ile His Lys Asn Gln Arg Val Pro Leu Ser Glu Gln
145    150    155
Glu Leu Val Asp Cys Asp Lys Val Asn Asp Gly Cys Asp Gly Gly Leu
165    170    175
Met Thr Asp Ala Phe Phe Tyr Ile Glu His His Gly Leu Ser Ser Glu
180    185    190
Glu Gln Tyr Pro Tyr Thr Gly Val Asp Gly His Cys Asn His Val Lys
195    200    205
Asp Lys Gln Val Ser Ser Ile Ser Gly Tyr Val Glu Leu Asp Glu Thr
210    215    220
Glu Ser Ala Leu Ala Asp Ala Leu Ala Asn Val Gly Pro Val Ser Ile
225    230    235
Ala Val Glu Ala Asp Thr Trp Gln Phe Tyr Ser Gly Gly Val Phe Asn
245    250    255
Asn Lys Asn Cys Gly Asp Ala Leu Asn His Gly Val Leu Ala Val Gly
260    265    270
Tyr Thr Lys Asp Val Phe Ile Val Lys Asn Ser Trp Gly Thr Gly Trp
275    280    285
Gly Glu Gln Gly Tyr Ile Arg Val Ala Arg Gly Ser Asn Leu Cys Gly
290    295    300
Ile Asn Leu Met Asn Ser Tyr Pro Lys Leu
305    310

```

10

<210> 10

<211> 3621

<212> ADN

<213> Bacillus thuringiensis

15

<400> 10

atgagtccaa	ataatcaaaa	tgaatatgaa	attatagatg	cgacaccttc	tactttctgta	60
tccaatgatt	ctaacagata	ccctttttgcg	aatgagccaa	caaatgcgct	acaaaatatg	120
gattataaag	attattttaa	aatgtctgcg	ggaaatgcta	gtgaataccc	tggttcacct	180
gaagtacttg	ttagcggaca	agatgcagct	aaggccgcaa	ttgatatagt	aggtaaatta	240
ctatcagggt	taggggtccc	atttggtggg	cgatagtgga	gtctttatac	tcaacttatt	300
gatattctgt	ggccttcagg	ggaaaagagt	caatgggaaa	tttttatgga	acaagtagaa	360
gaactcatta	atcaaaaaat	agcagaatat	gcaaggaata	aagcgctttc	ggaattagaa	420
ggattaggta	ataattacca	attatatcta	actgcgcttg	aagaatggga	agaaaatcca	480
aatggttcaa	gagccttacg	agatgtgcca	aatcgatttg	aaatcctgga	tagttttatt	540
acgcaatata	tgccatcttt	tagagtgcga	aattttgaag	taccattcct	tactgtatat	600
gcaatggcag	ccaaccttca	tttactgtta	ttaaaggacg	cgtcaatttt	tggaagaaga	660
tggggatggt	caacaactac	tattaataac	tattatgatc	gtcaaatgaa	acttactgca	720
gaatattctg	atcactgtgt	aaagtgggtat	gaaactgggt	tagcaaaatt	aaaaggcacg	780
agcgctaaac	aatgggttga	ctataaccaa	ttccgtagag	aaatgacact	ggcggtttta	840
gatgttgttg	cattattccc	aaattatgac	acacgcacgt	acccaatgga	aacgaaagca	900
caactaacaa	gggaagtata	tacagatcca	ctgggcgcgg	taaacgtgtc	ttcaattggt	960
tcctgggatg	acaaagcacc	ttcttttcgga	gtgatagaat	catccgttat	tcgaccaccc	1020
catgtatttg	attatataac	gggactcaca	gtgtatacac	aatcaagaag	catttcttcc	1080
gctcgctata	taagacattg	ggctgggtcat	caataaagct	accatcgtgt	cagtaggggt	1140
agtaatcttc	aacaaatgta	tggaactaat	caaatcttac	acagcactag	tacctttgat	1200
tttacgaatt	atgatattta	caagactcta	tcaaaggatg	cagtactcct	tgatattggt	1260
tacctggtt	atacgtatat	attttttgga	atgccagaag	tcgagttttt	catggtaaac	1320
caattgaata	ataccagaaa	gacgttaaag	tataatccag	tttccaaaga	tattatagcg	1380
agtacaagag	attcgggaatt	agaattacct	ccagaaactt	cagatcaacc	aaattatgag	1440
tcatatagcc	atagattatg	tcatatcaca	agtattcccg	cgacgggtaa	cactaccgga	1500
ttagtacctg	tattttcttg	gacacatcga	agtgcagatt	taaaacaatac	aatatatattca	1560
gataaaatca	ctcaaattcc	ggccgttaaa	tggtgggata	atttaccgtt	tgttccagtg	1620
gtaaaaggag	caggacatac	aggaggggat	ttattacagt	ataatagaag	tactggttct	1680
gtaggaacct	tatttctagc	tcgatatggc	ctagcattag	aaaaagcagg	gaaatatcgt	1740
gtaagactga	gatatgctac	tgatgcagat	attgtattgc	atgtaaacga	tgctcagatt	1800
cagatgccaa	aaacaatgaa	cccagggtgag	gatctgacat	ctaaaacttt	taaagttgca	1860
gatgctatca	caacattaaa	tttagcaaca	gatagtctgc	tagcattgaa	acataattta	1920
ggtgaagacc	ctaattcaac	attatctggt	atagttttacg	ttgaccgaat	cgaattcatc	1980
ccagtagatg	agacatatga	agcggaaaca	gatttagaag	cagcgaagaa	agcagtgaat	2040
gccttgttta	cgaatacaaaa	agatggctta	cgaccaggcg	taacggatta	tgaagtgaat	2100
caagcggcaa	acttagtgga	atgcctatcg	gatgatttgt	atccaaatga	aaaacgattg	2160
ttatttgatg	cagtgaagaa	ggcaaaacgc	ctcagtgaag	cacgtaattt	gcttcaagat	2220
ccagatttcc	aagagataaa	tggaagaaat	ggctggacgg	caagtacggg	aattgagggt	2280
atagaagggg	atgctttatt	caaaggcgct	tatctacgcc	taccagggtg	gagagaaata	2340
gatacggaaa	cgtatccaac	gtatctgtat	caaaaagtag	aggaagggtg	attaaaacca	2400
tacacaagat	atagattgag	agggtttgtc	ggaagcagtc	aaggattgga	aattttcaca	2460
attcgtcatc	aaacgaaccg	aattgtaaaa	aatgtaccgg	atgatttgct	gccagatgta	2520
tctcctgtta	actcggatgg	tagtatcaat	cgatgcagcg	aacaaaagta	tgtgaatagc	2580
cgtttagaag	tagaaaaccg	ttctggtgaa	gcgcgatgag	tctctattcc	tattgatata	2640
ggtgaaatcg	attacaatga	aaatgcagga	atatgggttg	gatttaagat	tacggaccca	2700
gagggatatg	caacactcgg	aaacctagaa	ttggtcgaag	agggaccttt	atcaggagac	2760
gcattagaac	gcttgcaaa	agaagaacaa	cagtggaaag	ttcaaatgac	aagaagacgt	2820
gaagaaacag	atagaaggta	tatggcatcg	aaacaagcgg	tagatcggtt	atatgccgat	2880
tatcaggatc	agcaactgaa	tcctgatgta	gagattacag	atcttactgc	ggcccaagat	2940
ctgatacagt	ccatttcctta	cgtatataac	gaaatgttcc	cagaaatacc	agggatgaac	3000
tatacgaagt	ttacagaatt	aacagatcga	ctccaacaag	cgtggagttt	gtatgatcag	3060
cgaaatgcc	taccaaatgg	tgattttcga	aatgggttaa	gtaattggaa	tgcaacgcct	3120
ggcgtagaag	tacaacaaat	caatcataca	tctgtccttg	tgattccaaa	ctgggatgag	3180
caagtttcgc	aacagtttac	agttcaaccg	aatcaaagat	atgtgttacg	agttactgcg	3240
agaaaagaag	gggtaggaaa	tgatatagta	agtatccgtg	atggtggaaa	tcaaacagaa	3300
acgcttactt	ttagtgaag	cgattatgat	acaaatggaa	tgtataatac	gcaagtgtcc	3360
aatacaaatg	gatataacac	aaataatgcg	tataatacac	aagcatcgag	tacaaacgga	3420
tataacgcaa	ataatatgta	taatacgcga	gcacgcgaata	caaacggata	taacacaaat	3480

agtggtgtaca atgatcaaac cggctatatc acaaaaacag tgacattcat cccgtataca 3540
 gatcaaagt ggattgagat gagtgagaca gaaggtacat tctatataga aagtgtagaa 3600
 ttgattgtag acgtagagta a. 3621

<210> 11

<211> 1206

5 <212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 11

Met	Ser	Pro	Asn	Asn	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Ile	Ile	Asp	Ala	Thr	Pro		
1				5					10					15			
Ser	Thr	Ser	Val	Ser	Asn	Asp	Ser	Asn	Arg	Tyr	Pro	Phe	Ala	Asn	Glu		
			20					25					30				
Pro	Thr	Asn	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Lys	Met		
		35					40					45					
Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Ser	Glu	Tyr	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Val	Leu	Val		
50						55					60						
Ser	Gly	Gln	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Ile	Val	Gly	Lys	Leu		
65				70						75					80		
Leu	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Val	Gly	Pro	Ile	Val	Ser	Leu	Tyr		
				85					90					95			
Thr	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Leu	Trp	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ser	Gln	Trp		
			100					105					110				
Glu	Ile	Phe	Met	Glu	Gln	Val	Glu	Glu	Leu	Ile	Asn	Gln	Lys	Ile	Ala		
		115					120					125					
Glu	Tyr	Ala	Arg	Asn	Lys	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn		
130						135					140						
Asn	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Glu	Trp	Glu	Glu	Asn	Pro		
145					150					155					160		
Asn	Gly	Ser	Arg	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Asn	Arg	Phe	Glu	Ile	Leu		
				165					170					175			
Asp	Ser	Leu	Phe	Thr	Gln	Tyr	Met	Pro	Ser	Phe	Arg	Val	Thr	Asn	Phe		
			180					185					190				
Glu	Val	Pro	Phe	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	Met	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu		
		195					200					205					
Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Gly	Glu	Glu	Trp	Gly	Trp	Ser		
210						215					220						
Thr	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Met	Lys	Leu	Thr	Ala		
225					230					235					240		
Glu	Tyr	Ser	Asp	His	Cys	Val	Lys	Trp	Tyr	Glu	Thr	Gly	Leu	Ala	Lys		
				245					250					255			
Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Lys	Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg		
			260					265					270				
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Asn		
		275					280					285					
Tyr	Asp	Thr	Arg	Thr	Tyr	Pro	Met	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Leu	Thr	Arg		
290						295					300						
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Gly		
305					310					315					320		
Ser	Trp	Tyr	Asp	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	Glu	Ser	Ser	Val		
				325					330					335			
Ile	Arg	Pro	Pro	His	Val	Phe	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu	Thr	Val	Tyr		
			340					345					350				
Thr	Gln	Ser	Arg	Ser	Ile	Ser	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	His	Trp	Ala		
		355					360					365					
Gly	His	Gln	Ile	Ser	Tyr	His	Arg	Val	Ser	Arg	Gly	Ser	Asn	Leu	Gln		
370						375					380						
Gln	Met	Tyr	Gly	Thr	Asn	Gln	Asn	Leu	His	Ser	Thr	Ser	Thr	Phe	Asp		
385					390					395					400		

Phe	Thr	Asn	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Leu
				405					410					415	
Leu	Asp	Ile	Val	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ile	Phe	Phe	Gly	Met	Pro
			420						425					430	
Glu	Val	Glu	Phe	Phe	Met	Val	Asn	Gln	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Thr
		435						440					445		
Leu	Lys	Tyr	Asn	Pro	Val	Ser	Lys	Asp	Ile	Ile	Ala	Ser	Thr	Arg	Asp
	450					455					460				
Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	Ser	Asp	Gln	Pro	Asn	Tyr	Glu
465					470					475					480
Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His	Ile	Thr	Ser	Ile	Pro	Ala	Thr	Gly
			485						490					495	
Asn	Thr	Thr	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala
			500						505					510	
Asp	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	Tyr	Ser	Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Ala
		515					520					525			
Val	Lys	Cys	Trp	Asp	Asn	Leu	Pro	Phe	Val	Pro	Val	Val	Lys	Gly	Pro
	530					535					540				
Gly	His	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asn	Arg	Ser	Thr	Gly	Ser
545					550					555					560
Val	Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Ala	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ala	Leu	Glu	Lys	Ala
			565						570					575	
Gly	Lys	Tyr	Arg	Val	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ala	Thr	Asp	Ala	Asp	Ile	Val
			580						585					590	
Leu	His	Val	Asn	Asp	Ala	Gln	Ile	Gln	Met	Pro	Lys	Thr	Met	Asn	Pro
		595					600					605			
Gly	Glu	Asp	Leu	Thr	Ser	Lys	Thr	Phe	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Ile	Thr
	610					615					620				
Thr	Leu	Asn	Leu	Ala	Thr	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Leu	Lys	His	Asn	Leu
625					630					635					640
Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Ser	Thr	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Tyr	Val	Asp	Arg
			645						650					655	
Ile	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Glu	Ala	Glu	Gln	Asp	Leu
		660						665					670		
Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Asp
		675					680					685			
Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Asp	Tyr	Glu	Val	Asn	Gln	Ala	Ala	Asn
	690					695					700				
Leu	Val	Glu	Cys	Leu	Ser	Asp	Asp	Leu	Tyr	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Leu
705					710					715					720
Leu	Phe	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Arg	Asn
			725						730					735	
Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Asp	Phe	Gln	Glu	Ile	Asn	Gly	Glu	Asn	Gly	Trp
		740						745					750		
Thr	Ala	Ser	Thr	Gly	Ile	Glu	Val	Ile	Glu	Gly	Asp	Ala	Leu	Phe	Lys
		755					760					765			
Gly	Arg	Tyr	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Thr	Glu	Thr
	770					775					780				
Tyr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Gln	Lys	Val	Glu	Glu	Gly	Val	Leu	Lys	Pro
785					790					795					800
Tyr	Thr	Arg	Tyr	Arg	Leu	Arg	Gly	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Gln	Gly	Leu
			805						810					815	
Glu	Ile	Phe	Thr	Ile	Arg	His	Gln	Thr	Asn	Arg	Ile	Val	Lys	Asn	Val
		820						825					830		
Pro	Asp	Asp	Leu	Leu	Pro	Asp	Val	Ser	Pro	Val	Asn	Ser	Asp	Gly	Ser
		835					840					845			
Ile	Asn	Arg	Cys	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Val	Asn	Ser	Arg	Leu	Glu	Val
	850					855					860				
Glu	Asn	Arg	Ser	Gly	Glu	Ala	His	Glu	Phe	Ser	Ile	Pro	Ile	Asp	Thr
865					870					875					880

Gly Glu Ile Asp Tyr Asn Glu Asn Ala Gly Ile Trp Val Gly Phe Lys
885 890 895
Ile Thr Asp Pro Glu Gly Tyr Ala Thr Leu Gly Asn Leu Glu Leu Val
900 905 910
Glu Glu Gly Pro Leu Ser Gly Asp Ala Leu Glu Arg Leu Gln Arg Glu
915 920 925
Glu Gln Gln Trp Lys Ile Gln Met Thr Arg Arg Arg Glu Glu Thr Asp
930 935 940
Arg Arg Tyr Met Ala Ser Lys Gln Ala Val Asp Arg Leu Tyr Ala Asp
945 950 955 960
Tyr Gln Asp Gln Gln Leu Asn Pro Asp Val Glu Ile Thr Asp Leu Thr
965 970 975
Ala Ala Gln Asp Leu Ile Gln Ser Ile Pro Tyr Val Tyr Asn Glu Met
980 985 990
Phe Pro Glu Ile Pro Gly Met Asn Tyr Thr Lys Phe Thr Glu Leu Thr
995 1000 1005
Asp Arg Leu Gln Gln Ala Trp Ser Leu Tyr Asp Gln Arg Asn Ala Ile
1010 1015 1020
Pro Asn Gly Asp Phe Arg Asn Gly Leu Ser Asn Trp Asn Ala Thr Pro
1025 1030 1035 1040
Gly Val Glu Val Gln Gln Ile Asn His Thr Ser Val Leu Val Ile Pro
1045 1050 1055
Asn Trp Asp Glu Gln Val Ser Gln Gln Phe Thr Val Gln Pro Asn Gln
1060 1065 1070
Arg Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Glu Gly Val Gly Asn Gly
1075 1080 1085
Tyr Val Ser Ile Arg Asp Gly Gly Asn Gln Thr Glu Thr Leu Thr Phe
1090 1095 1100
Ser Ala Ser Asp Tyr Asp Thr Asn Gly Met Tyr Asn Thr Gln Val Ser
1105 1110 1115 1120
Asn Thr Asn Gly Tyr Asn Thr Asn Asn Ala Tyr Asn Thr Gln Ala Ser
1125 1130 1135
Ser Thr Asn Gly Tyr Asn Ala Asn Asn Met Tyr Asn Thr Gln Ala Ser
1140 1145 1150
Asn Thr Asn Gly Tyr Asn Thr Asn Ser Val Tyr Asn Asp Gln Thr Gly
1155 1160 1165
Tyr Ile Thr Lys Thr Val Thr Phe Ile Pro Tyr Thr Asp Gln Met Trp
1170 1175 1180
Ile Glu Met Ser Glu Thr Glu Gly Thr Phe Tyr Ile Glu Ser Val Glu
1185 1190 1195 1200
Leu Ile Val Asp Val Glu
1205

<210> 12
<211> 3633
5 <212> ADN
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 12

atgagtccaa ataatacaaaa tgaatatgaa attatagatg cgacaccttc tactttctgta 60
tccaatgatt ctaacagata ccctttttgcg aatgagccaa caaatgcgct acaaaatatg 120
gattataaaag attattttaa aatgtctgcg ggaaatgcta gtgaataccc tggttcacct 180
gaagtacttg ttagcggaca agatgcagct aaggccgcaa ttgatatagt aggtaaatta 240
ctatcagggt taggggtccc atttgttggg ccgatagtga gtctttatac tcaacttatt 300
gatattctgt ggccttcagg gcaaaagagt caatgggaga tttttatgga acaagtagaa 360
gaactcataa atcaaaaaat agcagaatat gcaaggaata aagcgctttc ggaattagaa 420
ggattaggta ataattacca attatatcta actgcgcttg aagaatggaa agaaaatcca 480
aatgggtcaa gagccttacg agatgtgoga aatcgatttg aaatcctgga tagttttattt 540
acgcaataca tgccatcttt toagagtga aattttgaag taccattcct tacagtatat 600
acacaggcag ccaaccttca tttactgtta ttaaaggacg cttcaatttt tggagaagaa 660

10

```

tggggatggt ctacaaccac tattaataac tattatgatc gtcaaatgaa acttactgca 720
gaatattctg atcactgtgt aaagtggat gaaactgggt tagcaaaatt aaaaggcacg 780
agcgctaaac aatgggtcga ctataaccaa ttccgtagag aaatgacact gacggtttta 840
gatgttggtt cattattccc aaattatgac acacgcacgt acccaatgga aacgaaagca 900
caactaacia ggggaagtata tacagatcca ctgggcgcgg taaacgtgtc ttcaattggt 960
tcctgggtatg acaaagcacc ttctttcgga gtgatagaat catccgttat tcgaccaccc 1020
catgtatttg attatataac gggactcaca gtgtatacac aatcaagaag catttcttcc 1080
gctcgctata taagacattg ggctgggtcat caaataagct atcatcggtat ttttagtgat 1140
aatattataa aacagatgta tggaaactaat caaaatctac acagcactag tacctttgat 1200
tttacgaatt atgatattta caagacgtta tcaaaagatg cgggtgctcct tgatattggt 1260
tttctgggtt atacgtatat attttttggga atgccagaag tcgagttttt catggttaaac 1320
caattgaata ataccagaaa gacgttaaag tataatccgg tttccaaaga tattatagcg 1380
gggacaagag attcggaatt agaattacct ccagaaactt cagatcaacc aaattatgag 1440
tcatatagcc atagattatg tcatatcaca agtattcccg cgacgggttc aactaccgga 1500
ttagtacctg tattttcttg gacacatcgg agtgccgatc ttataaatgc agttcattca 1560
gataaaatta ctacagattcc ggctgtaaag gtttctgatt tggctccctc tataacagga 1620
gggccaaaata atccgttgt atcgggtcct ggatttacag ggggggggat aataaaagta 1680
ataagaaatg gagtaattat atcacatatg cgtgttaaaa tttcagacat taacaaaaga 1740
tatagtatga ggattcggta tgcttccgct aataatactg aattttatat aaatccttct 1800
gaagaaaacg ttaaattctca cgctcaaaaa actatgaata gaggtgaagc ttttaacatat 1860
aataaattta attatgcgac tttgccccct attaaattta cgacaaccga acctttcatt 1920
actctagggg ctatatttga agcgggaagac tttcttgga ttgaagctta tatagaccga 1980
atcgaattta tcccagtaga tgagacatat gaagcggaac aagattttaga agcagcgaag 2040
aaagcagtga atgccttggt tacgaataca aaagatggct tacgaccagg cgtaaccgat 2100
tatgaagtga atcaagcggc aaacttagtg gaatgcctat cggatgattt gtatccaaat 2160
gaaaaacgat tgttatttga tgcagtgaga gaggcaaaac gcctcagtga ggcacgtaat 2220
ttgcttcaag atccagattt ccaagagata aatggagaaa atggctggac ggcaagtacg 2280
ggaattgagg ttatagaagg ggaatgcttta ttcaaagggc gttatctacg cctaccaggt 2340
gcgagagaaa tagatacggg aacgtatcca acgtatctgt atcaaaaagt agagggaagt 2400
gtattaaaaa catacacaag atatagattg agagggtttg tcggaagcag tcaaggattg 2460
gaaattttca caattcgtca tcaaacgaac cgaattgtaa aaaatgtacc ggaatgattg 2520
ctgccagatg tatctcctgt taactcggat gtagtatca atcgatgcag cgaacaaaag 2580
tatgtgaata gccgttttaga agtagaaaaa cgttctggtg aagcgcgatga gttctctatt 2640
cctattgata caggtgaaat cgattacaat gaaaatgcag gaatatgggt tggatttaag 2700
attacggacc cagaggggata tgcaacactc ggaaacctag aattggtcga agagggacct 2760
ttatcaggag acgcattaga acgcttgcaa agagaagaac aacagtggaa gattcaaatg 2820
acaagaagac gtgaagaaac agatagaagg tatatggcat cgaaacaagc ggtagatcgt 2880
ttatatgccg attatcagga tcagcaactg aatcctgatg tagagattac agatcttact 2940
gcggcccaag atctgatata gtccattcct tacgtatata acgaaatggt ccagaaaata 3000
ccagggatga actatacgaa gtttacagaa ttaacagatc gactccaaca agcgtggagt 3060
ttgtatgatc agcgaaatgc cataccaaat ggtgattttc gaaatgggtt aagtaattgg 3120
aatgcaacgc ctggcgtaga agtacaacaa atcaatcata catctgtcct tgtgattcca 3180
aactgggatg agcaagtttc gcaacagttt acagttcaac cgaatcaaag atatgtgta 3240
cgagttactg cgagaaaaga aggggtagga aatggatatg taagtatccg tgatggtgga 3300
aatcaaacag aaacgcttac ttttagtgca agcgattatg atacaaatgg aatgtataat 3360
acgcaagtgt ccaatacaaa tggatataac acaaataatg cgtataatac acaagcatcg 3420
agtacaaacg gatataacgc aaataatatg tataatacgc aagcatcgaa tacaacgga 3480
tataacacaa atagtgtgta caatgatcaa accggctata tcacaaaaac agtgacattc 3540
atcccgata cagatcaaat gtggattgag atgagtgaga cagaaggtag attctatata 3600
gaaagtgtag aattgattgt agacgtagag taa 3633

```

<210> 13

<211>1210

<212> PRT

5 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 13

```

Met Ser Pro Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Thr Pro
1           5           10           15
Ser Thr Ser Val Ser Asn Asp Ser Asn Arg Tyr Pro Phe Ala Asn Glu
                20           25           30

```

ES 2 368 499 T3

Pro	Thr	Asn	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Lys	Met
		35					40					45			
Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Ser	Glu	Tyr	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Val	Leu	Val
	50					55					60				
Ser	Gly	Gln	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Ile	Val	Gly	Lys	Leu
	65				70					75					80
Leu	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Val	Gly	Pro	Ile	Val	Ser	Leu	Tyr
			85						90					95	
Thr	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Leu	Trp	Pro	Ser	Gly	Gln	Lys	Ser	Gln	Trp
			100					105						110	
Glu	Ile	Phe	Met	Glu	Gln	Val	Glu	Glu	Leu	Ile	Asn	Gln	Lys	Ile	Ala
		115					120					125			
Glu	Tyr	Ala	Arg	Asn	Lys	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn
	130					135					140				
Asn	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Glu	Trp	Lys	Glu	Asn	Pro
	145				150					155					160
Asn	Gly	Ser	Arg	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Asn	Arg	Phe	Glu	Ile	Leu
			165					170						175	
Asp	Ser	Leu	Phe	Thr	Gln	Tyr	Met	Pro	Ser	Phe	Arg	Val	Thr	Asn	Phe
			180					185					190		
Glu	Val	Pro	Phe	Leu	Thr	Val	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	His	Leu
		195					200					205			
Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Gly	Glu	Glu	Trp	Gly	Trp	Ser
	210					215					220				
Thr	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Met	Lys	Leu	Thr	Ala
	225				230					235					240
Glu	Tyr	Ser	Asp	His	Cys	Val	Lys	Trp	Tyr	Glu	Thr	Gly	Leu	Ala	Lys
			245					250						255	
Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Lys	Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	Asn	Gln	Phe	Arg
		260						265					270		
Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	Leu	Phe	Pro	Asn
		275					280					285			
Tyr	Asp	Thr	Arg	Thr	Tyr	Pro	Met	Glu	Thr	Lys	Ala	Gln	Leu	Thr	Arg
	290					295					300				
Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Gly
	305				310					315					320
Ser	Trp	Tyr	Asp	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	Glu	Ser	Ser	Val
			325						330					335	
Ile	Arg	Pro	Pro	His	Val	Phe	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu	Thr	Val	Tyr
			340					345					350		
Thr	Gln	Ser	Arg	Ser	Ile	Ser	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	His	Trp	Ala
		355					360					365			
Gly	His	Gln	Ile	Ser	Tyr	His	Arg	Ile	Phe	Ser	Asp	Asn	Ile	Ile	Lys
	370					375					380				
Gln	Met	Tyr	Gly	Thr	Asn	Gln	Asn	Leu	His	Ser	Thr	Ser	Thr	Phe	Asp
	385				390					395					400
Phe	Thr	Asn	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser	Lys	Asp	Ala	Val	Leu
			405						410					415	
Leu	Asp	Ile	Val	Phe	Pro	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ile	Phe	Phe	Gly	Met	Pro
			420					425					430		
Glu	Val	Glu	Phe	Phe	Met	Val	Asn	Gln	Leu	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Thr
		435					440					445			
Leu	Lys	Tyr	Asn	Pro	Val	Ser	Lys	Asp	Ile	Ile	Ala	Gly	Thr	Arg	Asp
	450					455					460				
Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Glu	Thr	Ser	Asp	Gln	Pro	Asn	Tyr	Glu	
	465				470				475					480	
Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His	Ile	Thr	Ser	Ile	Pro	Ala	Thr	Gly
			485						490					495	
Ser	Thr	Thr	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala
			500					505					510		

Asp	Leu	Ile	Asn	Ala	Val	His	Ser	Asp	Lys	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Val
		515					520					525			
Val	Lys	Val	Ser	Asp	Leu	Ala	Pro	Ser	Ile	Thr	Gly	Gly	Pro	Asn	Asn
	530					535					540				
Thr	Val	Val	Ser	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Gly	Ile	Ile	Lys	Val
545				550					555						560
Ile	Arg	Asn	Gly	Val	Ile	Ile	Ser	His	Met	Arg	Val	Lys	Ile	Ser	Asp
			565					570						575	
Ile	Asn	Lys	Glu	Tyr	Ser	Met	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Ala	Asn	Asn
			580					585					590		
Thr	Glu	Phe	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Glu	Glu	Asn	Val	Lys	Ser	His	Ala
		595				600						605			
Gln	Lys	Thr	Met	Asn	Arg	Gly	Glu	Ala	Leu	Thr	Tyr	Asn	Lys	Phe	Asn
	610					615						620			
Tyr	Ala	Thr	Leu	Pro	Pro	Ile	Lys	Phe	Thr	Thr	Thr	Glu	Pro	Phe	Ile
625				630					635						640
Thr	Leu	Gly	Ala	Ile	Phe	Glu	Ala	Glu	Asp	Phe	Leu	Gly	Ile	Glu	Ala
				645				650						655	
Tyr	Ile	Asp	Arg	Ile	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Glu	Ala
		660						665					670		
Glu	Gln	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr
		675					680					685			
Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	Val	Thr	Asp	Tyr	Glu	Val	Asn
	690					695					700				
Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	Val	Glu	Cys	Leu	Ser	Asp	Asp	Leu	Tyr	Pro	Asn
705				710					715						720
Glu	Lys	Arg	Leu	Leu	Phe	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	Ala	Lys	Arg	Leu	Ser
			725					730						735	
Glu	Ala	Arg	Asn	Leu	Leu	Gln	Asp	Pro	Asp	Phe	Gln	Glu	Ile	Asn	Gly
			740					745					750		
Glu	Asn	Gly	Trp	Thr	Ala	Ser	Thr	Gly	Ile	Glu	Val	Ile	Glu	Gly	Asp
		755					760					765			
Ala	Leu	Phe	Lys	Gly	Arg	Tyr	Leu	Arg	Leu	Pro	Gly	Ala	Arg	Glu	Ile
	770					775					780				
Asp	Thr	Glu	Thr	Tyr	Pro	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Gln	Lys	Val	Glu	Glu	Gly
785				790					795						800
Val	Leu	Lys	Pro	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Arg	Leu	Arg	Gly	Phe	Val	Gly	Ser
			805					810						815	
Ser	Gln	Gly	Leu	Glu	Ile	Phe	Thr	Ile	Arg	His	Gln	Thr	Asn	Arg	Ile
			820					825					830		
Val	Lys	Asn	Val	Pro	Asp	Asp	Leu	Leu	Pro	Asp	Val	Ser	Pro	Val	Asn
		835					840					845			
Ser	Asp	Gly	Ser	Ile	Asn	Arg	Cys	Ser	Glu	Gln	Lys	Tyr	Val	Asn	Ser
	850					855					860				
Arg	Leu	Glu	Val	Glu	Asn	Arg	Ser	Gly	Glu	Ala	His	Glu	Phe	Ser	Ile
865				870					875						880
Pro	Ile	Asp	Thr	Gly	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Asn	Ala	Gly	Ile	Trp
			885					890						895	
Val	Gly	Phe	Lys	Ile	Thr	Asp	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Gly	Asn
			900					905					910		
Leu	Glu	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Pro	Leu	Ser	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Arg
		915					920					925			
Leu	Gln	Arg	Glu	Glu	Gln	Gln	Trp	Lys	Ile	Gln	Met	Thr	Arg	Arg	Arg
	930					935						940			
Glu	Glu	Thr	Asp	Arg	Arg	Tyr	Met	Ala	Ser	Lys	Gln	Ala	Val	Asp	Arg
945				950						955					960
Leu	Tyr	Ala	Asp	Tyr	Gln	Asp	Gln	Gln	Leu	Asn	Pro	Asp	Val	Glu	Ile
			965					970						975	
Thr	Asp	Leu	Thr	Ala	Ala	Gln	Asp	Leu	Ile	Gln	Ser	Ile	Pro	Tyr	Val
			980					985					990		

ES 2 368 499 T3

Tyr Asn Glu Met Phe Pro Glu Ile Pro Gly Met Asn Tyr Thr Lys Phe
 995 1000 1005
 Thr Glu Leu Thr Asp Arg Leu Gln Gln Ala Trp Ser Leu Tyr Asp Gln
 1010 1015 1020
 Arg Asn Ala Ile Pro Asn Gly Asp Phe Arg Asn Gly Leu Ser Asn Trp
 1025 1030 1035 1040
 Asn Ala Thr Pro Gly Val Glu Val Gln Gln Ile Asn His Thr Ser Val
 1045 1050 1055
 Leu Val Ile Pro Asn Trp Asp Glu Gln Val Ser Gln Gln Phe Thr Val
 1060 1065 1070
 Gln Pro Asn Gln Arg Tyr Val Leu Arg Val Thr Ala Arg Lys Glu Gly
 1075 1080 1085
 Val Gly Asn Gly Tyr Val Ser Ile Arg Asp Gly Gly Asn Gln Thr Glu
 1090 1095 1100
 Thr Leu Thr Phe Ser Ala Ser Asp Tyr Asp Thr Asn Gly Met Tyr Asn
 1105 1110 1115 1120
 Thr Gln Val Ser Asn Thr Asn Gly Tyr Asn Thr Asn Asn Ala Tyr Asn
 1125 1130 1135
 Thr Gln Ala Ser Ser Thr Asn Gly Tyr Asn Ala Asn Asn Met Tyr Asn
 1140 1145 1150
 Thr Gln Ala Ser Asn Thr Asn Gly Tyr Asn Thr Asn Ser Val Tyr Asn
 1155 1160 1165
 Asp Gln Thr Gly Tyr Ile Thr Lys Thr Val Thr Phe Ile Pro Tyr Thr
 1170 1175 1180
 Asp Gln Met Trp Ile Glu Met Ser Glu Thr Glu Gly Thr Phe Tyr Ile
 1185 1190 1195 1200
 Glu Ser Val Glu Leu Ile Val Asp Val Glu
 1205 1210

5 <210> 14
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo para PCR para la secuencia de h10
 <400> 14

cgactcgaga aaagaaatct aggtgccttc gaaaaatgg 39

15 <210> 15
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso para PCR para la proteasa h10
 <400> 15

ccattatatg cggccgccta caatttaggg taagagtca tg 42

25 <210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador directo para PCR para la secuencia de c9
 35 <400> 16

ES 2 368 499 T3

cgactcgaga aagaaattta tctgccttg agcaatgg 38

5 <210> 17
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador inverso para PCR para la secuencia de c9

<400> 17

15 cctatattag cggccgccta caactgggg taagagttc 39

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fragmento N-terminal de la beta-caseína

25 <400> 18

Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro
1 5

30 <210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sitio proteolítico

<400> 19

40 Leu Leu Gln Ser
1

<210> 20
<211> 4
45 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio proteolítico
50

<400> 20

Leu Asp Gln Ser
1

55 <210> 21
<211> 4
<212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sitio proteolítico
 5 <400> 21

 Phe Arg Arg Gly
 1
 10 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Sitio proteolítico
 <400> 22

 Phe Arg Ser Arg Gly
 1 5
 20
 <210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sitio proteolítico
 30 <400> 23

 Phe Arg Arg Gly Phe Arg Arg Gly
 1 5
 35 <210> 24
 <211> 2433
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Gen Cry8Bb1 modificado (Cry8Bb1-K05)
 <400> 24

```

atgagtccaa ataatcaaaa tgaatatgaa attatagatg cgacaccttc tactttctgta 60
tccaatgatt ctaacagata cccttttgcg aatgagccaa caaatgcgct acaaaatgatg 120
gattataaag attattttaa aatgtctgcg ggaaatgcta gtgaataccc tggttcacct 180
gaagtacttg ttagcggaca agatgcagct aaggccgcaa ttgatatagt aggtaaatta 240
ctatcagggt taggggtccc atttgttggg ccgatagtga gtctttatac tcaacttatt 300
gatattctgt ggccttcagg ggaaaagagt caatgggaaa tttttatgga acaagtagaa 360
gaactcatta atcaaaaaat agcagaatat gcaaggaata aagcgctttc ggaattagaa 420
ggattaggta ataattacca attatatcta actgcgcttg aagaatggga agaaaatcca 480
tttcgacgag gtttcgacg aggtgcctta cgagatgtgc gaaatcgatt tgaaatcctg 540
gatagtttat ttacgcaata tatgccatct tttagagtga caaattttga agtaccattc 600
cttactgtat atgcaatggc agccaacott catttactgt tattaaagga cgcgtcaatt 660
tttgagagaag aatggggatg gtcaacaact actattaata actattatga tcgtcaaagt 720
aaacttactg cagaatattc tgatcactgt gtaaagtggg atgaaactgg tttagcaaaa 780
ttaaaggcca cgagcgctaa acaatgggtt gactataacc aattccgtag agaaatgaca 840
ctggcggttt tagatgttgt tgcatatttc ccaaattatg acacacgcac gtacccaatg 900
gaaacgaaag cacaactaac aagggaagta tatacagatc cactgggcgc ggtaaacgtg 960
tcttcaattg gttcctggta tgacaaagca ccttctttcg gagtgataga atcatccgtt 1020
attcgaccac cccatgtatt tgattatata acgggactca cagtgtatac acaatcaaga 1080
agcatttctt ccgctcgcta tataagacat tgggctggtc atcaataaag ctaccatcgt 1140
gtcagtaggg gtagtaatct tcaacaaatg tatggaacta atcaaatct acacagcact 1200
agtacctttg attttacgaa ttatgatatt tacaagactc tatcaaagga tgcagtactc 1260
cttgatattg tttaccctgg ttatacgtat atattttttg gaatgccaga agtcgagttt 1320

```

```

ttcatggtaa accaattgaa taataccaga aagacgttaa agtataatcc agtttccaaa 1380
gatattatag cgagtacaag agattcggaa ttagaattac ctccagaaac ttcagatcaa 1440
ccaaattatg agtcatatag ccatagatta tgtcatatca caagtattcc cgcgacgggt 1500
aacactaccg gattagtacc tgtattttct tggacacatc gaagtgcaga tttaaacaat 1560
acaatatatt cagataaaat cactcaaatt ccggccgtta aatgttggga taatttaccg 1620
tttgttccag tggtaaaagg accaggacat acaggagggg atttattaca gtataataga 1680
agtactgggt ctgtaggaac cttattttcta gctcgatatg gcctagcatt agaaaaagca 1740
gggaaatatc gtgtaagact gagatatgct actgatgcag atattgtatt gcatgtaaac 1800
gatgctcaga ttcagatgcc aaaaacaatg aaccaggtg aggatctgac atctaaaact 1860
tttaaagtgt cagatgctat cacaacagta aatttagcaa cagatagttc ggtagcagt 1920
aaacataatg taggtgaaga ccctaattca acagtatctg gtatagttta cgttgaccga 1980
atcgaattca tcccagtaga tgagacatat gaagcggaag cagcgaagtt tcgacgtgg 2040
tttcgacgtg gtaaagcagt gaatgccttg tttacgaata caaaagatgg cttacgacca 2100
ggcgtaacgg attatgaagt gaatcaagcg gcaaacttag tggaatgcct atcggatgat 2160
ttgtatccaa atgaaaaacg attgttattt gatgcagtga gagaggcaaa acgcctcagt 2220
gaggcacgtt atttgcttca agatccagat ttccaagaga taaatggaga aaatggctgg 2280
acggcaagta cgggaattga ggttatagaa ggggatgctt tattcaaagg gcgttatcta 2340
cgcctaccag gtgcgagaga aatagatacg gaaacgtatc caacgtatct gtatcaaaaa 2400
gtagaggaag gtgtattaaa accatagctc gag 2433

```

5 <210> 25
 <211> 786
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Cry8Bb1 modificado (Cry8Bb1-K05)

<400> 25

ES 2 368 499 T3

Met 1	Ser	Pro	Asn	Asn 5	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu 10	Ile	Ile	Asp	Ala	Thr 15	Pro
Ser	Thr	Ser	Val 20	Ser	Asn	Asp	Ser	Asn 25	Arg	Tyr	Pro	Phe 30	Ala	Asn	Glu
Pro	Thr	Asn 35	Ala	Leu	Gln	Asn 40	Met	Asp	Tyr	Lys	Asp 45	Tyr	Leu	Lys	Met
Ser	Ala 50	Gly	Asn	Ala	Ser	Glu 55	Tyr	Pro	Gly	Ser 60	Pro	Glu	Val	Leu	Val
Ser 65	Gly	Gln	Asp	Ala 70	Ala	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp 75	Ile	Val	Gly	Lys	Leu 80
Leu	Ser	Gly	Leu 85	Gly	Val	Pro	Phe	Val	Gly 90	Pro	Ile	Val	Ser	Leu 95	Tyr
Thr	Gln	Leu 100	Ile	Asp	Ile	Leu	Trp	Pro 105	Ser	Gly	Glu	Lys	Ser 110	Gln	Trp
Glu	Ile	Phe 115	Met	Glu	Gln	Val	Glu 120	Glu	Leu	Ile	Asn 125	Gln	Lys	Ile	Ala
Glu	Tyr 130	Ala	Arg	Asn	Lys 135	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu 140	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn
Asn 145	Tyr	Gln	Leu	Tyr 150	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu 155	Glu	Trp	Glu	Glu	Asn 160	Pro
Phe	Arg	Arg	Gly 165	Phe	Arg	Arg	Gly	Ala 170	Leu	Arg	Asp	Val 175	Arg	Asn	Arg
Phe	Glu	Ile 180	Leu	Asp	Ser	Leu	Phe 185	Thr	Gln	Tyr	Met 190	Pro	Ser	Phe	Arg
Val	Thr 195	Asn	Phe	Glu	Val	Pro 200	Phe	Leu	Thr 205	Val	Tyr	Ala 210	Met	Ala	Ala
Asn 210	Leu	His	Leu	Leu	Leu 215	Leu	Lys	Asp	Ala 220	Ser	Ile	Phe	Gly	Glu	Glu
Trp 225	Gly	Trp	Ser	Thr 230	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn 235	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Met 240
Lys	Leu	Thr	Ala 245	Glu	Tyr	Ser	Asp	His 250	Cys	Val	Lys	Trp 255	Tyr	Glu	Thr

Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Lys	Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	260	265	270
Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	275	280	285
Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Thr	Arg	Thr	Tyr	Pro	Met	Glu	Thr	Lys	Ala	290	295	300
Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Asn	Val	305	310	315
Ser	Ser	Ile	Gly	Ser	Trp	Tyr	Asp	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	325	330	335
Glu	Ser	Ser	Val	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Val	Phe	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	340	345	350
Leu	Thr	Val	Tyr	Thr	Gln	Ser	Arg	Ser	Ile	Ser	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ile	355	360	365
Arg	His	Trp	Ala	Gly	His	Gln	Ile	Ser	Tyr	His	Arg	Val	Ser	Arg	Gly	370	375	380
Ser	Asn	Leu	Gln	Gln	Met	Tyr	Gly	Thr	Asn	Gln	Asn	Leu	His	Ser	Thr	385	390	395
Ser	Thr	Phe	Asp	Phe	Thr	Asn	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser	Lys	405	410	415
Asp	Ala	Val	Leu	Leu	Asp	Ile	Val	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Ile	Phe	420	425	430
Phe	Gly	Met	Pro	Glu	Val	Glu	Phe	Phe	Met	Val	Asn	Gln	Leu	Asn	Asn	435	440	445
Thr	Arg	Lys	Thr	Leu	Lys	Tyr	Asn	Pro	Val	Ser	Lys	Asp	Ile	Ile	Ala	450	455	460
Ser	Thr	Arg	Asp	Ser	Glu	Leu	Glu	Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	Ser	Asp	Gln	465	470	475
Pro	Asn	Tyr	Glu	Ser	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His	Ile	Thr	Ser	Ile	485	490	495
Pro	Ala	Thr	Gly	Asn	Thr	Thr	Gly	Leu	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Trp	Thr	500	505	510
His	Arg	Ser	Ala	Asp	Leu	Asn	Asn	Thr	Ile	Tyr	Ser	Asp	Lys	Ile	Thr	515	520	525
Gln	Ile	Pro	Ala	Val	Lys	Cys	Trp	Asp	Asn	Leu	Pro	Phe	Val	Pro	Val	530	535	540
Val	Lys	Gly	Pro	Gly	His	Thr	Gly	Gly	Asp	Leu	Leu	Gln	Tyr	Asn	Arg	545	550	555
Ser	Thr	Gly	Ser	Val	Gly	Thr	Leu	Phe	Leu	Ala	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ala	565	570	575
Leu	Glu	Lys	Ala	Gly	Lys	Tyr	Arg	Val	Arg	Leu	Arg	Tyr	Ala	Thr	Asp	580	585	590
Ala	Asp	Ile	Val	Leu	His	Val	Asn	Asp	Ala	Gln	Ile	Gln	Met	Pro	Lys	595	600	605
Thr	Met	Asn	Pro	Gly	Glu	Asp	Leu	Thr	Ser	Lys	Thr	Phe	Lys	Val	Ala	610	615	620
Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Val	Asn	Leu	Ala	Thr	Asp	Ser	Ser	Val	Ala	Val	625	630	635
Lys	His	Asn	Val	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Ser	Thr	Val	Ser	Gly	Ile	Val	645	650	655
Tyr	Val	Asp	Arg	Ile	Glu	Phe	Ile	Pro	Val	Asp	Glu	Thr	Tyr	Glu	Ala	660	665	670
Glu	Gln	Asp	Leu	Glu	Ala	Ala	Lys	Phe	Arg	Arg	Gly	Phe	Arg	Arg	Gly	675	680	685
Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Leu	Arg	Pro	690	695	700
Gly	Val	Thr	Asp	Tyr	Glu	Val	Asn	Gln	Ala	Ala	Asn	Leu	Val	Glu	Cys	705	710	715
Leu	Ser	Asp	Asp	Leu	Tyr	Pro	Asn	Glu	Lys	Arg	Leu	Leu	Phe	Asp	Ala	725	730	735

Val Arg Glu Ala Lys Arg Leu Ser Glu Ala Arg Asn Leu Leu Gln Asp
 740 745 750
 Pro Asp Phe Gln Glu Ile Asn Gly Glu Asn Gly Trp Thr Ala Ser Thr
 755 760 765
 Gly Ile Glu Val Ile Glu Gly Asp Ala Leu Phe Lys Gly Arg Tyr Leu
 770 775 780
 Arg Leu
 785

<210> 26
 <211> 2399
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen Cry8Bb1 modificado (Cry8Bb1-ISC-1)

<400> 26

ccggatccgc catggccccc aacaaccaga acgagtaaga gatcatcgac gccaccccca 60
 gcaccagcgt gagcaacgac agcaaccgct acccggttcgc caacgagccg accaacgccc 120
 tgcagaacat ggactacaag gactacctca agatgagcgc cggcaacgcc agcgagtacc 180
 cgggcagccc ggaggtgctg gtgagcggcc aggacgcgc caaggccgcc atcgacatcg 240
 tgggcaagct cctgagcggc ctccgctgct cgttcgtggg cccgatcgtg agcctgtaca 300
 cccagctcat cgacatcctg tggccgagcg gcgagaagag ccagtgggag atcttcatgg 360
 agcaggtgga ggaactgac aaccagaaga tcgcggaata cgcgcgcaat aaggcgctgt 420
 cggaactgga aggcctgggc aataattacc agctgtacct gaccgcgctg gaagagtggg 480
 aagagaatcc gctgtcgcag tcgctgtcgc agagcgcgct ggtggacgtg cgcaatcgct 540
 tcgaaatcct ggactcgtg ttcaaccagt acatgccctc cttccgctg accaatttcg 600
 aagtgcggtt cctgacggtg tatgcgatgg cggcgaatct gcacctgctg ctgctgaagg 660
 acgcgtctat cttcggcgaa gaatggggct ggtcaacgac gacgatcaat aattattatg 720
 accgccagat gaagctgacg gcggaatata gtgacctg cgtgaagtgg tatgaaacgg 780
 gcctggccaa gctgaagggc acgagcgcga aacagtgggt ggattataat caattccgcc 840
 gcgaaatgac gctcgcctg ctggatgtgg tggccttggt cccgaattat gatacgcgca 900
 cctatccgat ggaaacgaaa gcccaactga cccgcgaagt ttataccgat ccgctcggcg 960
 ccgttaatgt cagcagcatc gccagctggt atgataaagc cccgagcttc ggcgtgatcg 1020
 agtcgtccgt tattcgcccg ccgcatgtct tcgattatat taccggcttg accgtctata 1080
 cccaatctcg ctcaattagt agcgcgcggt atatacggca ttgggcccgc catcaaatat 1140
 cgtatcatcg cgtctcccgg ggctctaata tgcaacaaat gtatgggacc aatcagaatc 1200
 tgcactcaac cagtaccttc gacttcacca attacgatat ctacaagacc ctgagcaaag 1260
 acgcgctcct gctcgatata gtctaccccg gctacaccta catcttcttc gggatgccag 1320
 aagtcgagtt cttcatggtc aatcagctga ataacacgog caagacactg aaatacaatc 1380
 ctgtctcgaa agatattata gcctccactc gcgattctga gctcgagctt ccgcccgaga 1440
 cctcagatca accaaactac gagagttaca gccatcgctt atgccacatc acgtcgatcc 1500
 ctgcccacag caacactacc ggcttagtcc cggctctctc ctggacgcac cgctctgccg 1560
 atctgaacaa cacaatctac tcagataaga tcaactcagat tcccgcgctc aaatggtggg 1620
 ataacctgcc attcgtgcct gtggtgaagg gcccggggca caccggaggt gacctgctcc 1680
 agtacaaccg gactacgggc agcgtcggga cattgtttct tgcccgtctac ggactagcct 1740
 tagagaaagc cggcaagtac agagtgcgtc tgcgatacgc gactgatgct gacattgttc 1800
 tccacgtaaa cgacgcacag attcagatgc ccaagaccat gaaccaggc gaggacttga 1860
 cgtcgaagac attcaaggtc gccgacgcga ttactaccgt caaccttgct acggactcct 1920
 ctgtcgcggt caagcacaac gtgggggagg accctaactc aacagttagc ggaattgtat 1980
 acgtcgaccg catcgagttc atcccgggtg acgagactta cgaggccgag caggacctag 2040
 aggcgggctaa gttccggagg ggtttcagac gtggcaaggc agtcaacgcc ttattcacca 2100
 acacgaagga cgggctgcga cccggagtta cagactacga ggtcaaecag gccgctaacc 2160
 tcgtggagtg cttgtcggac gacctttacc caaacgagaa gcgcctgctc tgcgacgcag 2220
 ttccgggagg caagaggttg tccgaggcga gaaaccttct gcaggaccct gacttccagg 2280
 agatcaacgg tgagaacggc tggactgctt ctactgggat cgaggtaatc gagggagatg 2340
 ctctgttcaa gggtagatac cttagacttt aggtcatgag tcatgagtca gtttaactag 2399

<210> 27
 <211> 786
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido Cry8Bb1 modificado (Cry8Bb1-ISC-1)

5

<400> 27

Met	Ser	Pro	Asn	Asn	Gln	Asn	Glu	Tyr	Glu	Ile	Ile	Asp	Ala	Thr	Pro	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Val	Ser	Asn	Asp	Ser	Asn	Arg	Tyr	Pro	Phe	Ala	Asn	Glu	20	25	30	
Pro	Thr	Asn	Ala	Leu	Gln	Asn	Met	Asp	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Leu	Lys	Met	35	40	45	
Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Ser	Glu	Tyr	Pro	Gly	Ser	Pro	Glu	Val	Leu	Val	50	55	60	
Ser	Gly	Gln	Asp	Ala	Ala	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Ile	Val	Gly	Lys	Leu	65	70	75	
Leu	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Val	Gly	Pro	Ile	Val	Ser	Leu	Tyr	85	90	95	
Thr	Gln	Leu	Ile	Asp	Ile	Leu	Trp	Pro	Ser	Gly	Glu	Lys	Ser	Gln	Trp	100	105	110	
Glu	Ile	Phe	Met	Glu	Gln	Val	Glu	Glu	Leu	Ile	Asn	Gln	Lys	Ile	Ala	115	120	125	
Glu	Tyr	Ala	Arg	Asn	Lys	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	130	135	140	
Asn	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	Glu	Glu	Trp	Glu	Glu	Asn	Pro	145	150	155	
Leu	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Gln	Ser	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Asn	Arg	165	170	175	
Phe	Glu	Ile	Leu	Asp	Ser	Leu	Phe	Thr	Gln	Tyr	Met	Pro	Ser	Phe	Arg	180	185	190	
Val	Thr	Asn	Phe	Glu	Val	Pro	Phe	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	Met	Ala	Ala	195	200	205	
Asn	Leu	His	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Gly	Glu	Glu	210	215	220	
Trp	Gly	Trp	Ser	Thr	Thr	Thr	Ile	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Arg	Gln	Met	225	230	235	
Lys	Leu	Thr	Ala	Glu	Tyr	Ser	Asp	His	Cys	Val	Lys	Trp	Tyr	Glu	Thr	245	250	255	
Gly	Leu	Ala	Lys	Leu	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Lys	Gln	Trp	Val	Asp	Tyr	260	265	270	
Asn	Gln	Phe	Arg	Arg	Glu	Met	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Asp	Val	Val	Ala	275	280	285	
Leu	Phe	Pro	Asn	Tyr	Asp	Thr	Arg	Thr	Tyr	Pro	Met	Glu	Thr	Lys	Ala	290	295	300	
Gln	Leu	Thr	Arg	Glu	Val	Tyr	Thr	Asp	Pro	Leu	Gly	Ala	Val	Asn	Val	305	310	315	
Ser	Ser	Ile	Gly	Ser	Trp	Tyr	Asp	Lys	Ala	Pro	Ser	Phe	Gly	Val	Ile	325	330	335	
Glu	Ser	Ser	Val	Ile	Arg	Pro	Pro	His	Val	Phe	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	340	345	350	
Leu	Thr	Val	Tyr	Thr	Gln	Ser	Arg	Ser	Ile	Ser	Ser	Ala	Arg	Tyr	Ile	355	360	365	
Arg	His	Trp	Ala	Gly	His	Gln	Ile	Ser	Tyr	His	Arg	Val	Ser	Arg	Gly	370	375	380	
Ser	Asn	Leu	Gln	Gln	Met	Tyr	Gly	Thr	Asn	Gln	Asn	Leu	His	Ser	Thr	385	390	395	
Ser	Thr	Phe	Asp	Phe	Thr	Asn	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Lys	Thr	Leu	Ser	Lys	405	410	415	

Asp Ala Val Leu Leu Asp Ile Val Tyr Pro Gly Tyr Thr Tyr Ile Phe
 420 425 430
 Phe Gly Met Pro Glu Val Glu Phe Phe Met Val Asn Gln Leu Asn Asn
 435 440 445
 Thr Arg Lys Thr Leu Lys Tyr Asn Pro Val Ser Lys Asp Ile Ile Ala
 450 455 460
 Ser Thr Arg Asp Ser Glu Leu Glu Leu Pro Pro Glu Thr Ser Asp Gln
 465 470 475 480
 Pro Asn Tyr Glu Ser Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ile Thr Ser Ile
 485 490 495
 Pro Ala Thr Gly Asn Thr Thr Gly Leu Val Pro Val Phe Ser Trp Thr
 500 505 510
 His Arg Ser Ala Asp Leu Asn Asn Thr Ile Tyr Ser Asp Lys Ile Thr
 515 520 525
 Gln Ile Pro Ala Val Lys Cys Trp Asp Asn Leu Pro Phe Val Pro Val
 530 535 540
 Val Lys Gly Pro Gly His Thr Gly Gly Asp Leu Leu Gln Tyr Asn Arg
 545 550 555 560
 Ser Thr Gly Ser Val Gly Thr Leu Phe Leu Ala Arg Tyr Gly Leu Ala
 565 570 575
 Leu Glu Lys Ala Gly Lys Tyr Arg Val Arg Leu Arg Tyr Ala Thr Asp
 580 585 590
 Ala Asp Ile Val Leu His Val Asn Asp Ala Gln Ile Gln Met Pro Lys
 595 600 605
 Thr Met Asn Pro Gly Glu Asp Leu Thr Ser Lys Thr Phe Lys Val Ala
 610 615 620
 Asp Ala Ile Thr Thr Val Asn Leu Ala Thr Asp Ser Ser Val Ala Val
 625 630 635 640
 Lys His Asn Val Gly Glu Asp Pro Asn Ser Thr Val Ser Gly Ile Val
 645 650 655
 Tyr Val Asp Arg Ile Glu Phe Ile Pro Val Asp Glu Thr Tyr Glu Ala
 660 665 670
 Glu Gln Asp Leu Glu Ala Ala Lys Phe Arg Arg Gly Phe Arg Arg Gly
 675 680 685
 Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Asn Thr Lys Asp Gly Leu Arg Pro
 690 695 700
 Gly Val Thr Asp Tyr Glu Val Asn Gln Ala Ala Asn Leu Val Glu Cys
 705 710 715 720
 Leu Ser Asp Asp Leu Tyr Pro Asn Glu Lys Arg Leu Leu Phe Asp Ala
 725 730 735
 Val Arg Glu Ala Lys Arg Leu Ser Glu Ala Arg Asn Leu Leu Gln Asp
 740 745 750
 Pro Asp Phe Gln Glu Ile Asn Gly Glu Asn Gly Trp Thr Ala Ser Thr
 755 760 765
 Gly Ile Glu Val Ile Glu Gly Asp Ala Leu Phe Lys Gly Arg Tyr Leu
 770 775 780
 Arg Leu
 785

<210> 28
 <211> 673
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido Cry8Bb1 modificado (Cry8Bb1-K04)

10 <400> 28

Met Ser Pro Asn Asn Gln Asn Glu Tyr Glu Ile Ile Asp Ala Thr Pro
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una protoxina de insectos que tiene al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a una cisteína proteasa de intestino de insecto y en el que la escisión de dicha protoxina de insecto por dicha cisteína proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto activa; en el que dicho sitio de escisión se introduce en la unión entre el segmento de formación cristalina en N-terminal de la protoxina y la porción C-terminal de la protoxina que comprende la toxina de insecto activa después de la escisión; en el que dicha toxina de insecto activa es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* o una variante o fragmento de la misma, en el que dicha variante y dicho fragmento tienen actividad pesticida y dicha variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con una secuencia de aminoácido de dicha toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*; y en el que dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQS (SEC ID N° 1).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el dicho sitio de escisión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de LXQS (SEC ID N° 2) LSQSLSQS (SEC ID N° 3) y LSQSLSQS (SEC ID N° 4).
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, que además comprende fabricar composiciones que comprenden dicha protoxina de insecto para usar en el control de plagas de plantas.
4. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una protoxina de insecto, en la que dicha protoxina de insecto tiene al menos un sitio de activación proteolítica que se ha modificado para comprender un sitio de escisión que es sensible a una cisteína proteasa de intestino de insecto y en el que la escisión de dicha protoxina de insecto por dicha cisteína proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto activa; en el que dicha toxina de insecto activa es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* o una variante o fragmento de la misma, en el que dicha variante y dicho fragmento tienen actividad pesticida y dicha variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con una secuencia de aminoácido de dicha toxina Cry de *Bacillus thuringiensis*; y en el que dicho
 - (a) dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQS (SEC ID N° 1) y se introduce en la unión entre el segmento de formación cristalina en N-terminal de la protoxina y la porción C-terminal de la protoxina que comprende la protoxina de insecto activa después de la escisión;
 - (b) dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQS (SEC ID N° 1) en el que dicha toxina de insecto activa es una toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* es una toxina Cry8 o una variante o fragmento de la misma, en el que dicha variante y dicho fragmento tienen actividad pesticida y dicha variante tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 % con una secuencia de aminoácido de dicha toxina Cry8 ; y/o
 - (c) dicho sitio de escisión comprende la secuencia de aminoácidos LXQSLXQS (SEC ID N° 3) o LSQSLSQS (SEC ID N° 4).
5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4(a) o 4(b), en la que el dicho sitio de escisión comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de LXQS (SEC ID N° 2) LSQSLSQS (SEC ID N° 3) y LSQSLSQS (SEC ID N° 4).
6. Un casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos de la reivindicación 4 o 5 unida de forma operable a un promotor que dirige la expresión en una planta.
7. Un procedimiento para proteger una planta de una plaga de insectos, comprendiendo dicho procedimiento la introducción en dicha planta de al menos una construcción de polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la reivindicación 4 o 5 unida de forma operable a un promotor que dirige la expresión en dicha planta, en el que la expresión de dicha construcción de polinucleótidos produce dicha protoxina de insecto en dicha planta, en el que dicha plaga de insecto ingiere dicha planta y dicha protoxina de insecto y en el que la escisión de dicha protoxina de insecto mediante dicha cisteína proteasa de intestino de insecto produce una toxina de insecto activa en el intestino de dicha plaga de insecto.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7, en el que dicha protoxina de insecto tiene actividad pesticida mejorada respecto a una protoxina de insecto que carece de dicho al menos un sitio de activación proteolítico modificado.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 8, en el que dicho sitio de activación proteolítico estabiliza además dicha protoxina de insecto en la planta.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 9, en el que dicha plaga de insectos se selecciona del escarabajo de la patata de Colorado, el gusano de la raíz del maíz occidental, el gusano de la raíz del maíz del sur, el gusano de la raíz del maíz del norte y el picudo.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 10, en el que dicha cisteína proteasa es

una proteasa de tipo L.

- 5 12. Una planta transformada que comprende al menos una construcción de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de la reivindicación 4 o 5 unida de forma operable a un promotor que dirige la expresión en dicha planta.
13. La planta de la reivindicación 12, en la que dicha construcción de polinucleótidos se incorpora de forma estable en el genoma de la planta.
- 10 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 11, o la planta de la reivindicación 12 o 13, en el que dicha planta es una monocotiledónea.
- 15 15. El procedimiento o planta de la reivindicación 14, en el que dicha monocotiledónea es maíz.
- 16 16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 11, o la planta de la reivindicación 12 o 13, en el que dicha planta es una dicotiledónea.
17. El procedimiento o planta de la reivindicación 16, en el que dicha dicotiledónea es soja.
- 20 18. El casete de expresión de la reivindicación 6 o la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 7 a 11, en el que dicho promotor es un promotor preferido de la raíz.
- 25 19. Una semilla transgénica de la planta de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18, en la que la semilla comprende dicha construcción de polinucleótidos.
20. Una protoxina de insecto aislada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 o 5.
- 30 21. Una composición que comprende al menos una protoxina de insecto de acuerdo con la reivindicación 20 en combinación con un vehículo.
22. Un procedimiento para afectar a una plaga de insectos que comprende aplicar la composición de acuerdo con la reivindicación 21 en el ambiente de dicha plaga de insectos mediante un procedimiento seleccionado de pulverización, espolvoreado, transmisión y recubrimiento de semillas.
- 35