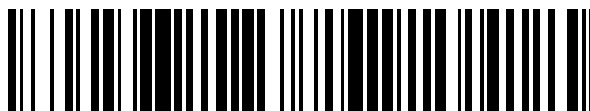


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 058**

51 Int. Cl.:
C12N 15/82 (2006.01)
C07K 14/325 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04794128 .1**
96 Fecha de presentación: **05.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1678310**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2006**

54 Título: **AXMI-0140, UN GEN DE LA DELTA-ENDOTOXINA Y MÉTODOS PARA SU USO.**

30 Prioridad:
14.10.2003 US 510982 P
04.10.2004 US 958008

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
ATHENIX CORPORATION
108 T W ALEXANDER DRIVE PO BOX 110347NC
NORTH CAROLINA
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 27709, US

72 Inventor/es:
CAROZZI, Nadine;
HARGISS, Tracy;
KOZIEL, Michael, G.;
DUCK, Nicholas, B. y
CARR, Brian

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 375 058 T3

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

DESCRIPCIÓN

AXMI-010, un gen de la delta-endotoxina y métodos para su uso.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Esta invención se refiere al campo de la biología molecular. Se proporcionan nuevos genes que codifican proteínas que tienen actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Estas proteínas y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican son útiles en la preparación de formulaciones plaguicidas y en la producción de plantas transgénicas resistentes a las plagas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 La *Bacillus thuringiensis* es una bacteria del suelo que forma esporas gram-positivas caracterizada por su capacidad para producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para ciertos órdenes y especies de insectos, pero inocuas para plantas y otros organismo no considerados dianas. Por esta razón, las composiciones que incluyen cepas de *Bacillus thuringiensis* o sus proteínas insecticidas se pueden usar como insecticidas aceptables para el medio ambiente para controlar las plagas agrícolas de insectos o los insectos vectores para una variedad de enfermedades humanas o animales.

15 Los cristales proteínicos también llamados proteínas cristal o proteínas Cry (delta-endotoxinas) de la *Bacillus thuringiensis* tienen potente actividad insecticida contra las larvas predominantemente de lepidópteros, dípteros y coleópteros. Estas proteínas han mostrado también actividad contra los órdenes de plagas de himenópteros, homópteros, flirápteros, malófagos y ácaros, así como otros órdenes de invertebrados, tales como nematelmintos, platelmintos y sarcostigóforos (Feitelson (1993) *The Bacillus Thuringiensis Family Tree. In Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.). Estas proteínas se clasificaron originalmente como CryI a CryV, basándose principalmente en su actividad insecticida. Las clases principales fueron la específica de los lepidópteros (I), la específica de los lepidópteros y los dípteros (II), la específica de los coleópteros (III), la específica de los dípteros (IV) y la específica de los nemátodos (V) y (VI). Las proteínas se clasificaron además en subfamilias; a las proteínas más relacionadas con cada familia se le asignaron letras consecutivas tales como Cry1A, Cry1B, Cry1C, etc. Incluso las proteínas más estrechamente relacionadas dentro de cada grupo se les dieron nombres tales como Cry1C1, Cry1C2, etc.

20 Recientemente se describió una nueva nomenclatura para los genes Cry basada en la homología de las secuencias de aminoácidos en lugar de en la especificidad para el insecto diana (Crickmore et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813). En la nueva clasificación, a cada toxina se le asigna un único nombre que incorpora una categoría principal (un número arábigo), una categoría secundaria (una letra mayúscula), una categoría terciaria (una letra minúscula) y una categoría cuaternaria (otro número arábigo). En la nueva clasificación, en la categoría principal los números romanos han sido sustituidos por números arábigos.

35 La proteína cristal no presenta actividad insecticida hasta que ha sido ingerida y solubilizada en el intestino medio del insecto. La protoxina ingerida es hidrolizada por proteasas en el tracto digestivo del insecto a una molécula tóxica activa. (Höfte and Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53: 242-255). Esta toxina se une a receptores localizados en la microvellosidad apical en el intestino medio de las larvas diana y se inserta en la membrana apical creando canales o poros iónicos que producen la muerte de la larva.

Debido a la devastación que los insectos pueden provocar es necesario descubrir nuevas formas de delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

40 SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan moléculas de ácidos nucleicos correspondientes a una secuencia de ácido nucleico de la delta-endotoxina. Adicionalmente, se incluyen las secuencias de aminoácidos correspondientes al polinucleótido. En particular, la presente invención proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:2, o la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEQ ID NO:1, así como sus variantes y fragmentos que tienen una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de la SEQ ID NO:1 o 2 y que tienen o codifican un polipéptido con actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una molécula de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en:

- 50 a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;
- b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tienen una actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero;

c) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; y

5 d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero.

La invención también proporciona:

- un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención;
- una planta o célula hospedante que contiene dicho vector; y
- una semilla que comprende una molécula de ácido nucleico de la invención.

10 La invención proporciona además un polipéptido con actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, seleccionado del grupo que consiste en:

a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2;

b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2;

15 c) un polipéptido que es codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1; y

d) un polipéptido que es codificado por una molécula de ácidos nucleicos que comprende a secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.

20 La invención proporciona además un método para matar o controlar una población de una plaga de lepidópteros que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad eficaz como plaguicida de un polipéptido de la presente invención.

Además, la presente invención proporciona un método para proteger una planta de una plaga, que comprende introducir en dicha planta o una de sus células al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero, en el que dicha

25 secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;

b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;

30 c) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos of SEQ ID NO:2; y

d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde dicho polipéptido tiene una actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros.

35 La presente invención también proporciona un método para producir un polipéptido con actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, que comprende cultivar la célula hospedante de la presente invención en condiciones en las que se expresa una molécula de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención.

40 La presente invención proporciona además una planta o una célula vegetal que tiene incorporado establemente en su genoma una construcción de DNA que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, en donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;

45 b) una molécula de ácido nucleico que comprende a secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene una actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero;

c) una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; y

d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde dicho polipéptido tiene una actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La Figura 1 muestra un alineamiento de AXMI-010 (SEQ ID NO:2) con BinB4 (Nº de acceso CAA04290) (SEQ ID NO:3), *cry36Aa1* (Nº de acceso AAK64558) (SEQ ID NO:4) y *cry35Ab* (AAG41672) (SEQ ID NO:5). El alineamiento muestra los residuos de aminoácidos más altamente conservados resaltados en negro y los residuos de aminoácidos altamente conservados resaltados en gris.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 Las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles para preparar plantas y microorganismos que posean actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Así, se proporcionan bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas de plantas transformados. Las secuencias encuentran uso en la construcción de vectores de expresión para su transformación subsiguiente en organismos de interés, como sondas para el aislamiento de otros genes de delta-endotoxinas y para la generación de proteínas plaguicidas alteradas por métodos conocidos en la técnica, tales como intercambio o barajamiento de dominios de DNA. Las proteínas encuentran uso en el control o eliminación de poblaciones de plagas de lepidópteros y en la producción de composiciones con actividad plaguicida contra insectos lepidópteros.

Definiciones

20 Por "delta-endotoxina" se entiende una toxina de *Bacillus thuringiensis* que tiene una actividad tóxica contra una o más plagas, incluyendo, pero sin limitación, los miembros de los órdenes lepidópteros, dípteros y coleópteros o una proteína que tiene homología con dicha proteína. En algunos casos, las proteínas delta-endotoxinas han sido aisladas de otros organismos, incluyendo *Clostridium bifermentans* y *Paenibacillus popilliae*. Las proteínas delta-endotoxinas incluyen secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias de nucleótidos completas descritas en la presente memoria y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias completas, debido al uso de un sitio de iniciación en dirección 3' alternativo o debido al procesamiento que produce una proteína más corta que tiene actividad plaguicida. El procesamiento puede ocurrir en el organismo en el que la proteína se expresa o en el organismo de la plaga después de la ingestión de la proteína. Las delta-endotoxinas incluyen proteínas identificadas como *cry1* a *cry43*, *cyt1* y *cyt2* y toxina similar a Cyt. Actualmente se conocen más de 250 especies de delta-endotoxinas con una amplia gama de especificidades y toxicidades. Para una lista más amplia véase Crickmore et al. (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813, y para actualizaciones regulares véase Crickmore et al. (2003) "*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature" en www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.

35 Los genes bacterianos, tal como el gen AXMI-010 de esta invención, poseen con bastante frecuencia múltiples codones de iniciación de metionina próximos al inicio del marco de lectura abierto. A menudo, la iniciación de la traducción en uno o más de estos codones de iniciación conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones de iniciación pueden incluir codones ATG. Sin embargo, las bacterias, tal como *Bacillus sp.*, reconocen también el codón GTG como un codón de iniciación y las proteínas que inician la traducción en los codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. Además, con frecuencia no está determinado *a priori* cuál de estos codones es usado de forma natural en la bacteria. Así, ha de entenderse que el uso de uno de los codones de metionina alternativos puede conducir también a la generación de proteínas delta-endotoxinas que codifican actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Estas proteínas delta-endotoxinas están incluidas en la presente invención y se pueden usar en los métodos de la presente invención.

45 Por "célula vegetal" se entiende todas las formas conocidas de plantas, incluyendo tejido indiferenciado (por ejemplo, callos), células de cultivo en suspensión, protoplastos, células de hojas, células de raíces, células de floema, semillas de plantas, polen, propágulos, embriones y similares. Por "casete de expresión vegetal" se entiende una construcción de DNA que es capaz de dar como resultado la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula vegetal. Típicamente contiene un promotor y una secuencia codificadora. Frecuentemente, dichas construcciones también contendrán una región 3' no traducida. Dichas construcciones pueden contener una "secuencia señal" o "secuencia delantera" para facilitar la traducción conjunta o el transporte posterior a la traducción del péptido hasta ciertas estructuras intracelulares, tales como el cloroplasto (u otros plastos), retículo endoplasmático o aparato de Golgi.

50 Por "secuencia señal" se entiende una secuencia que se sabe o se sospecha que da como resultado el transporte del péptido traducido conjuntamente o posterior a la traducción a través de la membrana celular. En las células eucariotas, esta implica típicamente la secreción en el aparato de Golgi, con algo de glicosilación resultante. Por "secuencia delantera" se entiende una secuencia que cuando es traducida, da como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente para provocar el transporte de la cadena peptídica traducida conjuntamente hasta un orgánulo subcelular. Por tanto, esta incluye secuencias delanteras que dirigen el transporte y/o la glicosilación por paso al retículo endoplasmático, paso a las vacuolas, plastos incluyendo cloroplastos, mitocondrias y similares.

Por “vector de transformación vegetal” se entiende una molécula de DNA que es necesaria para la transformación eficaz de una célula vegetal. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión vegetal y pueden estar organizados en más de una molécula de DNA ‘vector’. Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación vegetales que utilizan dos vectores de DNA no contiguos para codificar todas las funciones que actúan en cis y en trans requeridas para la transformación de células vegetales (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). “Vector” se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para que transfiera entre diferentes células hospedantes. “Vector de expresión” se refiere a un vector que tiene capacidad para incorporar, integrar y expresar secuencias o fragmentos heterólogos de DNA en una célula extraña.

“Plantas transgénicas” o “plantas transformadas” o plantas o células o tejidos “establemente transformados” se refiere a plantas que tienen incorporadas o integradas en la célula vegetal secuencias exógenas de ácido nucleico o fragmentos de RNA. Estas secuencias de ácido nucleico incluyen las que son exógenas, o no están presentes en la célula vegetal no transformada, así como las que pueden ser endógenas, o están presentes en la célula vegetal no transformada. “Heterólogas” se refiere generalmente a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas a la célula o parte del genoma natural en el que están presentes y han sido añadidas a la célula por infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

“Promotor” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que actúa para dirigir la transcripción de una secuencia codificadora en la dirección 3’. El promotor junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y la traducción (denominadas también “secuencias de control”) son necesarios para la expresión de una secuencia de DNA de interés.

En la presente memoria se proporcionan nuevas secuencias de nucleótidos aisladas que confieren actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas delta-endotoxinas. La proteína que resulta de la traducción de este gen permite a las células controlar o eliminar las plagas de insectos lepidópteros que la ingieren.

Una molécula de ácido nucleico o proteína “aislada” o “purificada”, o sus porciones biológicamente activas, está sustancialmente exenta de otro material celular o medio de cultivo cuando es producida por técnicas recombinantes o está sustancialmente exenta de precursores químicos u otros productos químicos cuando es sintetizada químicamente. Preferiblemente, un ácido nucleico “aislado” está exento de secuencias (preferiblemente secuencias que codifican proteínas) que flanquean de modo natural el ácido nucleico (es decir, secuencias situadas en los extremos 5’ y 3’ del ácido nucleico) en el DNA genómico del organismo del que procede el ácido nucleico. Para los fines de la invención, “aislado” cuando se usa referido a moléculas de ácidos nucleicos no incluye los cromosomas aislados. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico que codifica la delta-endotoxina aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean de modo natural la molécula de ácido nucleico en el DNA genómico de la célula de la que procede el ácido nucleico. Una proteína delta-endotoxina que está sustancialmente exenta de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de proteína que no es delta-endotoxina (también denominada en la presente memoria una “proteína contaminante”). En los siguientes subapartados se describen con más detalle diversos aspectos de la invención.

Moléculas de ácidos nucleicos aisladas y sus variantes y fragmentos

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención. Como se usa en la presente memoria, se entiende que la expresión “molécula de ácido nucleico” incluye moléculas de DNA (por ejemplo, cDNA o DNA genómico) y moléculas de RNA (por ejemplo, mRNA) y análogos del DNA o RNA generados utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es DNA bicatenario.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de la presente invención incluyen la secuencia incluidas en la SEQ ID NO:1. La secuencia de aminoácidos correspondiente para la proteína delta-endotoxina codificada por esta secuencia de nucleótidos está incluida en la SEQ ID NO:2.

Las moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican la delta-endotoxina son también abarcadas por la presente invención. Por “fragmento” se entiende una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína delta-endotoxina en la que el fragmento tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de la SEQ ID NO:1 y tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos abarcada por la invención codifica por tanto una porción biológicamente activa de una proteína delta-endotoxina. Las moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos de delta-endotoxina comprenden al menos 1200, 1300, 1350, 1400, 1450 nucleótidos contiguos o hasta el número de nucleótidos presentes en una secuencia completa que codifica la delta-endotoxina descrita en la presente memoria (por ejemplo, 1467 nucleótidos para la SEQ ID NO:1) dependiendo del uso al que van a ser destinadas. Por nucleótidos “contiguos” se entiende residuos de nucleótidos que están inmediatamente adyacentes entre sí. Fragmentos de las secuencias de nucleótidos de la presente invención codificarán fragmentos proteínicos que retienen la actividad biológica de la proteína delta-endotoxina y, por tanto, retienen la actividad plaguicida. Por “retiene la actividad” se entiende que el fragmento tendrá al menos

aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos alrededor del 50%, más preferiblemente al menos alrededor del 70%, incluso más preferiblemente al menos alrededor del 80% de la actividad plaguicida de la proteína delta-endotoxina. Los métodos para medir la actividad plaguicida son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252: 199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78: 290-293; y la Patente de EE.UU. N° 5.743.477.

Un fragmento de una secuencia de nucleótidos codificadora de delta-endotoxinas que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de la invención codificará al menos aproximadamente 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 y 450 aminoácidos contiguos o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína delta-endotoxina completa de la invención (por ejemplo, 489 aminoácidos para la SEQ ID NO:2).

Las proteínas delta-endotoxinas de la presente invención están codificadas por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1. Por "suficientemente idéntica" se entiende un aminoácido o secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% u 85%, más preferiblemente una identidad de secuencias de aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% en comparación con una secuencia de referencia, con la totalidad de la secuencia de referencia, utilizando uno de los programas de alineamiento descritos en la presente memoria usando parámetros estándares. Los expertos en la técnica reconocerán que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración del código, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácido nucleicos, se alinean las secuencias para una comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las descritas a continuación, considerando o no los huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, se cuentan típicamente las igualdades.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede realizar usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático usado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2264, modificado en Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas informáticos BLASTN y BLASTX de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabras = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las de las moléculas de ácidos nucleicos similares a la delta-endotoxina de la invención. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabras = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las de las moléculas de la proteína delta-endotoxina de la invención. Para obtener alineamientos incluidos los huecos para comparación, se puede utilizar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) como ha sido descrito por Altschul et al. (1997) en *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternativamente, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda repetida que detecta las relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul et al. (1997) *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden aplicar los parámetro por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, BLASTX y BLASTN). El alineamiento se puede realizar también manualmente por inspección.

Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW compara las secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o de DNA y por tanto puede proporcionar datos sobre la conservación de secuencias de la secuencia completa de aminoácidos. El algoritmo ClustalW se utiliza en diversos paquetes de programas informáticos para análisis de DNA/aminoácidos comercialmente disponibles, tal como el módulo ALIGNX del grupo de programas Vector NTi (Informax, Inc). Después del alineamiento de las secuencias de aminoácidos con ClustalW, se puede determinar el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no limitativo de un programa informático útil para análisis de los alineamientos de ClustalW es GeneDoc™. El Genedoc™ (Karl Nicholas) permite la determinación de la similitud e identidad de aminoácidos (o DNA) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4: 11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del GCG Wisconsin Genetics Software Package, Versión 10 (proporcionado por Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4.

Un programa preferido es GAP versión 10, que usa el algoritmo de Needleman and Wunsch, 1970, *supra*. El programa GAP Versión 10 se puede usar con los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando peso por hueco de 50 y peso por longitud de 3 y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos usando peso por hueco de 8 y

peso por longitud de 2 y la matriz de puntuación BLOSUM62. También se pueden usar programas equivalentes. Por “programa equivalente” se entiende un programa para comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genera un alineamiento que tiene similitudes de residuos de nucleótidos o aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencias cuando se comparan con el alineamiento correspondiente generado por GAP Versión 10.

La invención abarca también variantes de moléculas de ácidos nucleicos. Las variantes de la invención tienen una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 y codifican un polipéptido que tiene una actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Las “variantes” de las secuencias de nucleótidos que codifican la delta-endotoxina incluyen las secuencias que codifican las proteínas delta-endotoxinas descritas en la presente memoria, pero que se diferencian conservadoramente debido a la degeneración del código genético, así como las que son suficientemente idénticas como se ha indicado anteriormente. Las variantes alélicas que existen de modo natural se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular muy conocidas, tales como las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de hibridación descritas más adelante. Las variantes de las secuencias de nucleótidos incluyen también secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente que han sido generadas, por ejemplo, aplicando mutagénesis dirigida al sitio pero que todavía codifican las proteínas de delta-endotoxinas descritas en la presente invención como se indica más adelante. Las variantes de proteínas abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína natural, esto es, reteniendo la actividad plaguicida. Por “retiene la actividad” se entiende que la variante tendrá al menos aproximadamente el 30%, preferiblemente al menos alrededor del 50%, más preferiblemente al menos alrededor del 70%, incluso más preferiblemente al menos alrededor del 80% de la actividad plaguicida de la proteína natural. Los métodos para medir la actividad plaguicida son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252: 199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78: 290-293; y la Patente de EE.UU. N° 5.743.477.

Los expertos en la técnica apreciarán además que cambios pueden ser introducidos por mutación en las secuencias de nucleótidos de la invención conduciendo con ellos a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas delta-endotoxinas codificadas, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. De este modo, se pueden crear variantes de moléculas de ácidos nucleicos aisladas introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la correspondiente secuencia de nucleótidos descrita en la presente invención, de tal modo que una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos sean introducidas en la proteína codificada. Las mutaciones pueden ser introducidas por técnicas usuales, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Dichas variantes de las secuencias de nucleótidos son también abarcadas por la presente invención teniendo una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2 y codificando un polipéptido que tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero.

Por ejemplo, preferiblemente, se pueden realizar sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos preferiblemente no esenciales predichos. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que puede ser alterado a partir de la secuencia de tipo natural de una proteína delta-endotoxina sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido “esencial” es el requerido para la actividad biológica. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es aquella en la que el residuo de aminoácido es reemplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cistina), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar en regiones no conservadas que retienen su función. En general, dichas sustituciones no se realizarían en residuos de aminoácidos conservados ni en residuos de aminoácidos que residen en un resto conservado, en el que dichos residuos son esenciales para la actividad de la proteína. Ejemplos de residuos que son conservados y que pueden ser esenciales para la actividad de la proteína incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en el alineamiento de la Figura 1. Ejemplos de residuos que son conservados pero que pueden permitir las sustituciones conservadoras de aminoácido y retener su actividad incluyen, por ejemplo, residuos que tienen solo sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en el alineamiento de la Figura 1. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que las variantes funcionales pueden tener alteraciones poco conservadas o no conservadas en los residuos conservados.

Alternativamente, las variantes de las secuencias de nucleótidos se pueden realizar introduciendo aleatoriamente mutaciones en toda o parte de la secuencia codificadora, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar basándose en la capacidad para conferir a la delta-endotoxina actividad para identificar mutantes que retienen su actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar de modo recombinante y la actividad de la proteína se puede determinar usando técnicas de valoración típicas.

Aplicando métodos tales como PCR, hibridación y similares, se pueden identificar secuencias de delta-endotoxina correspondientes, teniendo dichas secuencias una identidad sustancial con las secuencias de la invención. Véase, por ejemplo, Sambrook J., y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) e Innis, et al. (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

En un método de hibridación, se puede usar toda o parte de la secuencia de nucleótidos de la delta-endotoxina para cribar las genotecas de cDNA o genómicas. Los métodos para la construcción de dichas genotecas de cDNA y genómicas son generalmente conocidos en la técnica y están descritos en Sambrook and Russell, 2001. Las llamadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de DNA genómico, fragmentos de cDNA, fragmentos de RNA u otros oligonucleótidos, y pueden estar marcados con un grupo detectable, tal como ^{32}P u otro cualquier marcador detectable, tales como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Las sondas para hibridación se pueden preparar marcando oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia de nucleótidos que codifica la delta-endotoxina conocida descrita en la presente memoria. Adicionalmente se pueden usar cebadores degenerados diseñados basándose en los residuos de nucleótidos o aminoácidos conservados en la secuencia de nucleótidos o en la secuencia de aminoácidos codificada. La sonda comprende típicamente una región de una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones restrictivas a al menos aproximadamente 12, preferiblemente alrededor de 25, más preferiblemente al menos alrededor del 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 o 400 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos que codifica la delta-endotoxina de la invención o uno de sus fragmentos o variantes. La preparación de sondas para hibridación es generalmente conocida en la técnica y está descrita en Sambrook and Russell, 2001.

Por ejemplo, la secuencia completa de la delta-endotoxina descrita en la presente memoria, o una o más de sus porciones, se puede usar como sonda capaz de hibridarse específicamente con secuencias similares a las de la delta-endotoxina correspondientes y con los RNA mensajeros. Para conseguir una hibridación específica en una variedad de condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y tienen preferiblemente una longitud de al menos alrededor del 10 nucleótidos y más preferiblemente una longitud de al menos alrededor de 20 nucleótidos. Dichas sondas se pueden usar para amplificar las secuencias de la delta-endotoxina correspondientes a partir de un organismo elegido por PCR. Esta técnica se puede usar para aislar secuencias codificadoras adicionales de un organismo deseado o como un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias codificadoras en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen el cribado por hibridación de genotecas de DNA en placas (placas o colonias; véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

La hibridación de dichas secuencias se puede realizar en condiciones restrictivas. Por "condiciones restrictivas" o "condiciones de hibridación restrictivas" se entiende condiciones en las que una sonda se hibridará a su secuencia diana en un grado con mayor facilidad de detección que a otras secuencias (por ejemplo, al menos el doble). Las condiciones restrictivas dependen de las secuencias y serán diferentes según las circunstancias. Controlando la restricción de las condiciones de hibridación y/o lavado, se pueden identificar las secuencias diana que son 100% complementarias con la sonda (sondeo homólogo). Alternativamente, se pueden ajustar las condiciones de restricción para permitir algo de desapareamiento en las secuencias de modo que sean detectados menores grados de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda tiene una longitud menor que aproximadamente 1000 nucleótidos, preferiblemente una longitud menor que 500 nucleótidos.

Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración salina sea inferior a aproximadamente una concentración de ion Na 1,5 M, típicamente una concentración de ion Na de aproximadamente 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayores que 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones restrictivas con la adición de agentes desestabilizantes, tal como formamida. Condiciones de baja restricción ilustrativas incluyen una hibridación con una solución tampón de formamida del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato sódico) al 1% a 37°C y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M /citrate de trisodio 0,3 M) de 50 a 55°C. Condiciones de restricción moderada ilustrativas incluyen una hibridación en formamida del 40 al 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 0,5X a 1X SSC de 55 a 60°C. Condiciones de alta restricción ilustrativas incluyen una hibridación en formamida al 50%, NaCl 1M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 0,1X SSC de 60 a 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender SDS del aproximadamente 0,1% al aproximadamente 1%. La duración de la hibridación es generalmente inferior a aproximadamente 24 horas, en general aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

La especificidad es típicamente la 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 híbridos DNA- DNA, la T_m se puede calcular aproximadamente con ayuda de la ecuación de Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138: 267-284: $T_m = 81,5^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de form}) - 500/L$; en donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el DNA, % de form 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 una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de una secuencia diana complementaria se

hibrida a una sonda perfectamente emparejada. La T_m se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% de desapareamiento; así, las condiciones de T_m , de hibridación y/o de lavado se pueden ajustar para realizar la hibridación a secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad $\geq 90\%$, la T_m se puede disminuir 10°C. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan de forma que sean aproximadamente 5°C menores que la temperatura de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y a un pH definidos. Sin embargo, las condiciones altamente restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 1, 2, 3 o 4°C menor que la temperatura de fusión térmica (T_m); las condiciones moderadamente restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C menor que la temperatura de fusión térmica (T_m); las condiciones poco restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C menor que la temperatura de fusión térmica (T_m). Aplicando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la T_m deseada, los expertos en la técnica comprenderán que variaciones en la restricción de las soluciones de hibridación y/o lavado están descritas intrínsecamente. Si el grado deseado de desapareamiento da como resultado una T_m inferior a 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC de modo que se puedan aplicar mayores temperaturas. Una amplia guía de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); y Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Véase Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York).

20 Proteínas aisladas y sus variantes y fragmentos

Las proteínas delta-endotoxinas están también abarcadas en la presente invención. Por "proteínas delta-endotoxinas" se entiende una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos incluida en la SEQ ID NO:2. Se proporcionan también sus fragmentos, proteínas biológicamente activas y sus variantes que tengan una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y que tengan actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Se pueden usar para realizar los métodos de la presente invención.

"Fragmentos" o "porciones biológicamente activas" incluyen fragmentos polipeptídicos que comprenden secuencias de aminoácidos con una identidad de secuencias de al menos el 80% con las secuencias de aminoácidos incluidas en la SEQ ID NO:2 y presentan actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Dichas porciones biológicamente activas se pueden preparar por técnicas recombinantes y evaluarse su actividad de delta-endotoxina. Los métodos para medir la actividad plaguicida son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252: 199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78: 290-293; y la Patente de EE.UU. N° 5.743.477. Como se usa en la presente memoria, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO:2. Sin embargo, la invención abarca otros fragmentos, tal como cualquier fragmento de la proteína mayor que 400, 450 y 489 aminoácidos.

Por "variantes" se entienden proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 en la totalidad de la SEQ ID NO:2. Dichas variantes retienen la actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las variantes de proteínas abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir continúan poseyendo la actividad biológica de la proteína natural, es decir, retienen la actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Los métodos para medir la actividad plaguicida son muy conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252: 199-206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78: 290-293; y la Patente de EE.UU. N° 5.743.477.

45 Variantes alteradas o mejoradas

Se reconoce que las secuencias de DNA de una delta-endotoxina pueden ser alteradas por diversos métodos, y que estas alteraciones pueden dar como resultado secuencias de DNA que codifican proteínas con una secuencia de aminoácidos diferente de la que es codificada para la delta-endotoxina de la SEQ ID NO:2. Esta proteína puede ser alterada de diversos modos incluyendo sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos. Dichas variantes tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 a través de la totalidad de la SEQ ID NO:2 y codifican un polipéptido que tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero.

Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos de la proteína delta-endotoxina pueden ser preparadas por mutaciones en el DNA. Esto se puede conseguir también por una de varias formas de mutagénesis y/o por evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectarán sustancialmente a la función de la proteína. Dichas variantes poseerán la actividad plaguicida deseada. Sin embargo, se entiende que la capacidad de la delta-endotoxina para conferir la actividad plaguicida puede ser mejorada mediante el uso de dichas técnicas por

las composiciones de esta invención. Por ejemplo, se puede expresar la delta-endotoxina en células hospedantes que exhiben altas tasas de falta de incorporación de bases durante la replicación del DNA, tal como XL-1 Red (Stratagene). Después de la propagación en dichas cepas, se puede aislar el DNA de la delta-endotoxina (por ejemplo preparando DNA de plásmido, o amplificando por PCR y clonando el fragmento resultante de la PCR en un vector), cultivar las mutaciones de delta-endotoxina en una cepa no mutágena e identificar los genes mutados de la delta-endotoxina con actividad plaguicida, por ejemplo realizando un ensayo para analizar la actividad plaguicida. Generalmente, la proteína se mezcla y usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293. Dichos ensayos pueden incluir poner en contacto las plantas con una o más plagas y determinar la capacidad de las plantas de sobrevivir y/o causar la muerte de las plagas. Ejemplos de mutaciones que dan como resultado una mayor toxicidad se encuentran en Schnepf et al. (1998) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62:775-806.

Alternativamente, se pueden preparar alteraciones en la secuencia de proteínas de muchas proteínas en el extremo amino o carboxi sin afectar sustancialmente a la actividad. Esto puede incluir inserciones, deleciones o alteraciones introducidas por métodos moleculares modernos, tal como PCR, incluyendo amplificaciones por PCR que alteran o extienden la secuencia codificadora de proteína en virtud de la inclusión de secuencias codificadoras de aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Alternativamente, las secuencias de proteínas añadidas pueden incluir secuencias codificadoras de proteínas completas, tal como las usadas generalmente en la técnica para generar fusiones de proteínas. Tales proteínas de fusión se usan frecuentemente para: (1) aumentar la expresión de una proteína interés; (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o epítopo para facilitar la purificación de proteínas, la detección de proteínas u otros usos experimentales conocidos en la técnica; (3) dirigir la segregación o traducción de una proteína en un orgánulo sub-celular, tal como el espacio periplasmático de las bacterias Gram-negativas o el retículo endoplasmático de células eucarióticas, la última de las cuales frecuentemente da como resultado la glicosilación de la proteína.

Las variantes de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la presente invención también abarcan secuencias derivadas de métodos de mutagénesis y recombinantes, tales como el barajamiento del DNA. Con dicho procedimiento se pueden usar una o más regiones diferentes codificadoras de la proteína delta-endotoxina para crear una nueva proteína delta-endotoxina que posea las propiedades deseadas. De este modo se generan colecciones de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos de la secuencia relacionada que comprende regiones de secuencia que tienen identidad sustancial de secuencia y pueden ser recombinados homológamente *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, usando este enfoque los restos de secuencia que codifican un dominio de interés pueden ser barajados entre el gen de la delta-endotoxina gene de la invención y otros genes conocidos de la delta-endotoxina para obtener un nuevo gen que codifican una proteína con una propiedad mejorada de interés, tal como una actividad insecticida mejorada. Las estrategias para tal barajamiento de DNA son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer et al. (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Cramer et al. (1998) Nature 391:288-291; y las Patentes de EE.UU N° 5.605.793 y 5.837.458.

El intercambio o barajamiento de dominios es otro mecanismo para generar proteínas delta-endotoxinas alteradas. Los dominios II y III pueden ser intercambiados entre proteínas delta-endotoxinas, dando como resultado toxinas híbridas o quiméricas con actividad plaguicida mejorada o un espectro diana. Los métodos para generar proteínas recombinantes y determinar su actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naimov et al. (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5328-5330; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537-1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954-17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923-20930; Rang et al. 91999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918-2925).

Transformación de plantas

La transformación de células vegetales puede ser conseguida por uno de diversos métodos conocidos en la técnica. Primeramente, se modifica por ingeniería genética el gen de la delta-endotoxina de un modo que permita su expresión en células vegetales. Típicamente una construcción que expresa dicha proteína contendría un promotor para dirigir la transcripción del gen, así como una región 3' no traducida para permitir la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La organización de dichas construcciones es bien conocida en la técnica. En algunos casos, puede ser útil manipular el gen de tal modo que el plaguicida resultante sea segregado o que de otro modo sea la diana dentro de la célula vegetal. Por ejemplo, el gen puede ser manipulado para contener un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplasmático. También puede ser preferible manipular el casete de expresión para que contenga un intrón, de tal modo que para la expresión se requiera el procesamiento del mRNA del intrón.

Típicamente este 'casete de expresión vegetal' se insertará en un 'vector de transformación vegetal'. Este vector de transformación vegetal puede estar constituido por uno o más vectores de DNA necesarios para conseguir la transformación de la planta. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación vegetal que estén constituidos por uno o más segmentos de DNA contiguos. Estos vectores se denominan frecuentemente en la técnica 'vectores binarios'. Los vectores binarios, así como los vectores con plásmidos

adyuvantes se usan más frecuentemente para transformación mediada por *Agrobacterium*, en donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de DNA necesarios para conseguir la transformación eficiente son bastante grandes, y es ventajoso separar las funciones en moléculas de DNA separadas. Los vectores binarios contienen típicamente un vector plasmídico que contiene las secuencias de acción en cis requeridas para la transferencia del T-DNA (tales como las de borde izquierdo y borde derecho), un marcador seleccionable que es manipulado para ser capaz de expresión en una célula vegetal, y un 'gen de interés' (un gen manipulado para ser capaz de expresión en una célula vegetal para la cual se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en este vector plasmídico secuencias requeridas para replicación bacteriana. Las secuencias de acción en cis están dispuestas de un modo que permitan la transferencia eficiente a células vegetales y la expresión en ellas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen de interés están localizados entre los bordes izquierdo y derecho. Frecuentemente un segundo vector plasmídico contiene los factores de acción en trans que median la transferencia del T-DNA desde *Agrobacterium* a células vegetales. Este plásmido contiene frecuentemente la función de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de células vegetales por *Agrobacterium*, y la transferencia de DNA por escisión en las secuencias de borde y la transferencia de DNA mediada por Vir, como se entiende en la técnica (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Para la transformación de plantas se pueden usar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.). El segundo vector plasmídico no es necesario para transformar las plantas por otros métodos, tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, los métodos de transformación de plantas implican transferir DNA heterólogo a células vegetales dianas (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos no diferenciados, protoplastos, etc.), seguido por la aplicación de un nivel umbral máximo de selección apropiado (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas de un grupo de masa celular no transformada. Los explantes se transfieren típicamente a un suministro reciente del mismo medio y se cultivan rutinariamente. Subsiguientemente, las células transformadas se diferencian en brotes después de colocarlas en un medio de regeneración suplementado con un nivel umbral máximo de agente de selección. Los brotes se transfieren luego a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar un brote o plántula enraizada. La plántula transgénica crece luego hasta una planta madura y produce semillas fértiles (por ejemplo, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Los explantes se transfieren típicamente a un suministro reciente del mismo medio y se cultivan rutinariamente. Una descripción general de las técnicas y métodos para generar plantas transgénicas se encuentra en los trabajos de Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239 y Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120. Puesto que el material transformado contiene muchas células, en cualquier pieza del callo o tejido o grupo de células diana objeto están presentes tanto células transformadas como no transformadas. La capacidad para matar las células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen da como resultado cultivos de plantas transformadas. Frecuentemente, la capacidad de retirar las células no transformadas es una limitación para la recuperación rápida de células vegetales transformadas y la generación satisfactoria de plantas transgénicas.

La generación de plantas transgénicas se puede realizar por uno de diversos métodos, incluyendo, pero sin limitación, la introducción de DNA heterólogo por *Agrobacterium* en células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con DNA extraño heterólogo adherido a partículas, y otros diversos métodos directos sin intervención de partículas (por ejemplo, Hiei et al. (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750; Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13: 219-239; Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42: 107-120) para transferir DNA.

Los protocolos de transformación, así como los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos en plantas pueden variar dependiendo del tipo de planta o célula vegetal, es decir, monocotiledóneas o dicotiledóneas, que son la diana de la transformación. Los métodos adecuados de introducir secuencias de nucleótidos en células vegetales y la subsiguiente inserción en el genoma de plantas incluyen microinyección (Crossway et al. (1986) *Biotechniques* 4:320-334), electroporación (Riggs et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5602-5606), transformación mediada por *Agrobacterium* (Patente de EE.UU. N° 5.563.055; Patente de EE.UU. N° 5.981.840), transferencia directa de genes (Paszkowski et al. (1984) *EMBO J.* 3:2717-2722), y aceleración balística de partículas (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.945.050; la patente de EE.UU. N° 5.879.918; la patente de EE.UU. N° 5.886.244; la patente de EE.UU. N° 5.932.782; Tomes et al. (1995) "*Direct DNA Transfer into Intact Plant Cells via Microprojectile Bombardment*," en *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture: Fundamental Methods*, ed. Gamborg and Phillips (Springer-Verlag, Berlin); McCabe et al. (1988) *Biotechnology* 6: 923-926); transformación por haces de aerosol (Solicitud de patente publicada de EE.UU. N° 2001/0026941; patente de EE.UU. N° 4.945.050; Publicación Internacional N° WO 91/00915; Solicitud de patente publicada de EE.UU. 2002/015066); y transformación Lec1 (WO 00/28058). Véase también Weissinger et al. (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Sanford et al. (1987) *Particulate Science and Technology* 5:27-37; Christou et al. (1988) *Plant Physiol.* 87:671-674; McCabe et al. (1988) *Bio/Technology* 6:923-926; Finer and McMullen (1991) *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27P:175-182; Singh et al. (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96:319-324; Datta et al. (1990) *Biotechnology* 8: 736-740; Klein et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309; la patente de EE.UU. N° 5.240.855; las patentes de EE.UU. N° 5.322.783 y 5.324.646; Klein et al. (1988) *Plant Physiol.* 91:440-444; Hooykaas-Van Slogteren et al. (1984) *Nature* (London) 311:763-764; la patente de EE.UU. N° 5.736.369; Bytebier et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5345-5349; De Wet et al. (1985) en *The Experimental Manipulation of Ovule Tissues*, ed. Chapman et al. (Longman, New York), pp. 197-209;

Kaeppler et al. (1990) *Plant Cell Reports* 9:415-418 y Kaeppler et al. (1992) *Theor. Appl. Genet.* 84:560-566; D'Halluin et al. (1992) *Plant Cell* 4:1495-1505; Li et al. (1993) *Plant Cell Reports* 12:250-255 y Christou and Ford (1995) *Annals of Botany* 75:407-413; Osjoda et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750.

5 Después de la integración del DNA extraño heterólogo en células vegetales, se aplica el nivel umbral máximo de selección apropiada en el medio para matar las células no transformadas y separar y hacer proliferar las células supuestamente transformadas que sobreviven a dicho tratamiento de selección, transfiriéndolas regularmente a un medio de nueva aportación. Por pases continuos y enfrentamiento con un medio de selección apropiado, se identifican y proliferan las células que están transformadas con el vector plasmídico. Se usarán métodos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo de interés integrado en el genoma de la planta transgénica.

10 Las células que han sido transformadas pueden hacerse crecer hasta plantas de acuerdo con modos convencionales. Véase, por ejemplo, McCormick et al. (1986) *Plant Cell Reports* 5: 81-84. Estas plantas pueden hacerse crecer y polinizarse con la misma cepa transformada o con cepas diferentes y ser identificada la planta híbrida resultante que tiene la expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada. Se pueden hacer crecer 15 dos o más generaciones para asegurar que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantiene establemente y se hereda y luego se cosechan las semillas para asegurar que se ha conseguido la expresión de las características fenotípicas deseadas. De esta manera, la presente invención proporciona semillas transformadas (también denominadas "semillas transgénicas") que tienen una construcción de nucleótidos de la invención, por ejemplo, un casete de expresión de la invención, incorporado establemente en su genoma.

20 Las secuencias de delta-endotoxinas de la invención pueden ser proporcionadas en casetes de expresión para expresión en la planta de interés. El casete incluirá secuencias reguladoras en los extremos 5' y 3' unidas operativamente a una secuencia de la invención. Por "unidas operativamente" se pretende indicar una unión funcional entre un promotor y una segunda secuencia, en donde la secuencia de promotor inicia y media la transcripción de la secuencia de DNA correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, unida 25 operativamente significa que las secuencias de ácidos nucleicos que están enlazadas son contiguas y, si es necesario unen dos regiones codificadoras de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. El casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional que ha de ser co- transformado en el organismo. Alternativamente, el(los) gen(es) adicional(es) pueden ser proporcionados en casetes de expresión múltiples.

30 Dicho casete de expresión es proporcionado con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia de delta-endotoxina para estar bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

El casete de expresión incluirá en la dirección de transcripción 5'-3', una región de iniciación de la transcripción y de la traducción (es decir, un promotor), una secuencia de DNA de la invención, y una región de terminación de la transcripción y de la traducción (es decir, una región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser natural o análogo o extraño o heterólogo, para la planta hospedante y/o para la secuencia de DNA de la invención. 35 Adicionalmente, el promotor puede ser una secuencia natural o alternativamente una secuencia sintética. Cuando el promotor es "natural" u "homólogo" a la planta hospedante, se pretende que el promotor se encuentre en la planta natural en la cual se introduce el promotor. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" para la secuencia de DNA de la invención, se pretende que el promotor no sea el promotor natural o el que se produce naturalmente para la secuencia de DNA unida operativamente de la invención.

40 La región de terminación puede ser natural con la región de iniciación de la transcripción, puede ser natural con la secuencia de DNA unida operativamente de interés, puede ser natural con la planta hospedante o puede derivarse de otras fuentes (es decir, extrañas o heterólogas para el promotor, la secuencia de DNA de interés, la planta hospedante o cualquiera de sus combinaciones). Las regiones de terminación convenientes están disponibles en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, tal como las regiones de terminación de octopina-sintasa y nopalina-sintasa. Véase 45 también Guerineau et al. (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon et al. (1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen et al. (1990) *Plant Cell* 12:1261-1272; Munroe et al. (1990) *Gene* 91:151-158; Ballas et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 7891-7903; y Joshi et al. (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

50 Cuando sea apropiado el(los) gen(es) puede(n) ser optimizados para aumentar su expresión en la célula hospedante transformada. Es decir, los genes pueden ser sintetizados usando codones preferidos en la célula hospedante para mejorar la expresión o pueden ser sintetizados usando codones de la frecuencia de uso de codones preferidos por el hospedante. Generalmente, se aumentará el contenido de GC de gen. Véase, por ejemplo, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92: 1-11 para una discusión de uso de codones preferido por el hospedante. En dichos casos el ácido nucleico de la invención debe tener una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2 y codifica un polipéptido que tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. En la técnica hay disponible métodos para sintetizar genes preferidos por las plantas. Véanse, 55 por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.380.831 y 5.436. 391 y Murray et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498.

Los ácidos nucleicos de interés pueden actuar como dianas para la expresión en cloroplastos. De este modo cuando el ácido nucleico de interés no está directamente insertado en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá

adicionalmente un ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito para dirigir el producto génico de interés a los cloroplastos. Dichos péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne et al. (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9: 104-126; Clark et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer et al. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; y Shah et al. (1986) *Science* 233:478-481.

Los métodos para la transformación de cloroplastos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Svab et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. El método se basa en el suministro por un cañón de partículas de DNA que contiene un marcador seleccionable y la dirección del DNA al genoma del plasto a través de recombinación homóloga. Adicionalmente, la transformación del plasto se puede conseguir por transactivación de un trans-gen llevado por un plasto silencioso por expresión preferida en tejidos de una RNA-polimerasa codificada en el núcleo y dirigida al plasto. Dicho sistema ha sido descrito en el trabajo de McBride et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Los ácidos nucleicos de interés que han de ser dirigidos al cloroplasto pueden ser optimizados para la expresión en el cloroplasto teniendo en cuenta las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la célula vegetal y este orgánulo. De este modo, se pueden sintetizar los ácidos nucleicos de interés usando los codones preferidos por los cloroplastos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.380.831.

Evaluación de la transformación de plantas

Después de la introducción de DNA extraño heterólogo en células vegetales, la transformación o integración del gen heterólogo en el genoma de la planta se confirma por diversos métodos, tales como análisis de ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos asociados con el gen integrado.

Análisis por PCR: El análisis por PCR es un método rápido para cribar células, tejido o brotes transformados en cuanto a la presencia del gen incorporado en la etapa más temprana antes de trasplantarlo al suelo (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La PCR se lleva a cabo usando cebadores oligonucleotídicos específicos para el gen de interés, etc.

Análisis Southern: La transformación de plantas es confirmada por análisis de transferencia Southern de DNA genómico (Sambrook and Russell, 2001, supra). En general, se extrae el DNA total del transformante, se digiere con enzimas de restricción apropiadas, se fracciona en un gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nilón a. La membrana o "medio de transferencia" se sonda luego con, por ejemplo, con un fragmento de DNA diana radiomarcado con ³²P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta de acuerdo con técnicas estándares (Sambrook and Russell, 2001, supra).

Análisis Northern: Se aísla RNA de tejidos específicos del transformante, se fracciona en un gel de agarosa con formaldehído, se transfiere a un filtro de nilón de acuerdo con métodos estándares que se usan rutinariamente en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, supra). La expresión de RNA codificado para la delta-endotoxina se analiza luego hibridando el filtro a una sonda radioactiva derivada de una delta-endotoxina, por métodos conocidos en la técnica (Sambrook and Russell, 2001, supra).

Transferencia Western y ensayos bioquímicos: Se pueden llevar a cabo transferencia Western y ensayos bioquímicos y similares en plantas transgénicas para confirmar por métodos estándares la presencia de una proteína codificada por el gen de la delta-endotoxina (Sambrook and Russell, 2001, supra) usando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína delta-endotoxina.

Actividad plaguicida en plantas

Se pueden generar plantas transgénicas que expresan delta-endotoxinas que tienen actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros. Los métodos antes descritos como ejemplos se pueden utilizar para generar plantas transgénicas, pero el modo en el que se generan las células vegetales transgénicas no es crítico para esta invención. Los métodos conocidos o descritos en la técnica tales como transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, y métodos no mediados por partículas se pueden emplear a discreción del experimentador. Las plantas que expresan delta-endotoxinas se pueden aislar por métodos usuales descritos en la técnica, por ejemplo por transformación de callos, selección de callos transformados y regeneración de plantas fértiles a partir de dichos callos transgénicos. En dichos procesos, como marcador seleccionable se puede usar cualquier gen siempre y cuando su expresión en las células vegetales confiera capacidad para identificar o seleccionar células transformadas.

Se ha desarrollado cierto número de marcadores para uso con células vegetales, tales como resistencia al cloranfenicol, al aminoglicósido G418, a higromicina o similares. También se pueden usar como marcadores seleccionables otros genes que codifican un producto implicado en el metabolismo de los cloroplastos. Por ejemplo, los genes que proporcionan resistencia a herbicidas de plantas, tales como glifosato, bromoxinilo o imidazolinona pueden encontrar un uso particular. Dichos genes han sido descritos (Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-

6314 (gen de la nitrilasa para resistencia al bromoxinilo); y Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 2188 (gen AHAS de resistencia a imidazolinonas).

5 Las plantas fértiles que expresan delta-endotoxinas pueden ser analizadas en lo que respecta a su actividad plaguicida, y las plantas que muestran una actividad óptima ser seleccionadas para posterior reproducción. Están disponibles en la técnica métodos para analizar la actividad plaguicida. Generalmente, la proteína se mezcla y usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

10 La presente invención se puede usar para la transformación de cualquier especie de planta, incluyendo pero sin limitación, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Ejemplos de plantas de interés incluyen, pero sin limitación, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuètes, patata dulce, mandioca (yuca), café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, te, plátanos, aguacate, higos, guayaba, mango, olivos, papaya, anacardo, macadamia, almendra, avenas, hortalizas, plantas ornamentales y coníferas.

15 Las hortalizas incluyen pero sin limitación, tomates, lechuga, judías verdes, judías de Lima, guisantes y miembros del género *Cucumis*, tales como pepino, melón cantalupo y melón almizclero. Las plantas ornamentales incluyen, sin limitación, azalea, hortensia, hibisco, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, flor de Pascua y crisantemos. Preferiblemente las plantas de la presente invención son plantas de cosecha, (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza, etc.).

Uso en control de plagas

20 Se conocen en la técnica métodos generales para emplear cepas que comprenden la secuencia de nucleótidos de la presente invención en control de plagas o modificación por ingeniería genética de otros organismos como agentes plaguicidas. Véase, por ejemplo la patente de EE.UU. N° 5.039.523 y la solicitud de patente europea EP 0480762 A2.

25 Las cepas de *Bacillus* que contienen la secuencia de nucleótidos de la presente invención o los microorganismos que han sido alterados genéticamente para contener el gen y la proteína plaguicida se pueden usar para proteger cosechas y productos agrícolas de insectos lepidópteros. Las células enteras, es decir, no lisadas de un organismo productor de toxinas (plaguicidas) pueden ser tratadas con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando dicha célula se aplica al medio ambiente de la plaga o plagas dianas.

30 Alternativamente, el plaguicida se produce introduciendo un gen heterólogo que comprende un ácido nucleico de la invención en un hospedante celular. La expresión del gen heterólogo da como resultado, directamente o indirectamente, la producción intracelular y el mantenimiento del plaguicida. Estas células se tratan luego en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando dicha célula se aplica al medio ambiente de la plaga o plagas dianas. El producto resultante retiene la toxicidad de la toxina. Estos plaguicidas naturalmente encapsulados pueden ser formulados de acuerdo con técnicas convencionales para aplicación al medio ambiente afectado por una plaga diana, por ejemplo, suelo, agua y follaje de las plantas. Véase, por ejemplo el documento EPA 0192319, y las referencias que se citan en el mismo. Alternativamente, se pueden formular células que expresan los genes de esta invención de tal modo que permitan la aplicación del material resultante como un plaguicida contra insectos lepidópteros.

40 Los ingredientes activos se aplican normalmente en la forma de composiciones y se pueden aplicar a la zona de la cosecha de las plantas o ser tratados, simultáneamente, o en sucesión, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, herbicidas, agentes crioprotectores, tensioactivos, detergentes, jabones plaguicidas, aceites latentes, polímeros, y/o otras formulaciones de vehículos de liberación prolongada o biodegradables que permiten la dosificación a largo plazo de una zona diana tras una sola aplicación de la formulación. Pueden ser también herbicidas selectivos, insecticidas químicos, virucidas, microbicidas, amebicidas, plaguicidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, moluscocidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con más vehículos, tensioactivos o adyuvantes promotores de la aplicación aceptables en agricultura empleados usualmente en la técnica de formulación. Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias ordinariamente empleadas en la tecnología de formulación, por ejemplo, sustancias naturales o minerales regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes humectantes, adhesivos, aglutinantes o fertilizantes.

50 Análogamente las formulaciones se pueden preparar en forma de "cebos" comestibles o ser conformadas en "trampas" para plagas para permitir la alimentación o ingestión de la formulación plaguicida por los organismos de la plaga diana.

55 Los métodos preferidos de aplicar un ingrediente activo o una composición agroquímica que contiene al menos una de las proteínas plaguicidas producidas por las cepas bacterianas de la presente invención son aplicación a hojas, revestimiento de semillas y aplicación al suelo. El número de aplicaciones y la tasa de aplicación dependen de la intensidad de infestación por la plaga correspondiente.

La composición puede ser formulada como polvo, polvo fino, pelet, gránulo, espray, emulsión, coloide, solución, o

similar, y puede ser preparada por medios convencionales como desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de células que comprende el polipéptido. En todas dichas composiciones que contienen al menos uno de dichos polipéptidos plaguicidas, el polipéptido puede estar presente en una concentración desde aproximadamente 1% a aproximadamente 99% en peso.

Las plagas de lepidópteros pueden ser eliminadas o reducidas en número en una zona dada por los métodos de la invención, o pueden ser aplicados profilácticamente a una zona ambiental para impedir la infestación por una plaga susceptible. Preferiblemente los organismos de la plaga ingieren, o se ponen en contacto con, una cantidad eficaz como plaguicida del polipéptido. Por "cantidad eficaz como plaguicida" se pretende significar una cantidad del plaguicida que es capaz de lograr la muerte de al menos una plaga, o reducir notablemente el crecimiento, la alimentación o el desarrollo fisiológico normal de plagas. Esta cantidad variará dependiendo de factores tales como, por ejemplo, la plaga diana específica que ha de ser controlada, el medio ambiente, la localización, la planta, la cosecha o el sitio agrícola específicos que han de ser tratados, las condiciones ambientales y el método, la tasa, la concentración, la estabilidad y la cantidad de aplicación de la composición de polipéptido eficaz como plaguicida. Las formulaciones pueden variar también con respecto a las condiciones climáticas, consideraciones ambientales, y/o frecuencia de aplicación y/o gravedad de la infestación por plagas.

Las composiciones plaguicidas descritas se pueden preparar formulando la célula bacteriana, el cristal y/o la suspensión de esporas o el componente proteínico aislado con el vehículo deseado aceptable en agricultura. Las composiciones se pueden formular antes de la administración en un medio apropiado, tal como liofilizadas, secadas por congelación, desecadas, o en un medio o vehículo acuoso o diluyente adecuado, tal como solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden estar en la forma de un polvo o material granular, o una suspensión en aceite (vegetal o mineral), o emulsiones agua en aceite o aceite en agua o como un polvo humectable o en combinación con cualquier otro material vehículo adecuado para aplicación en agricultura. Los vehículos para aplicación en agricultura adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son bien conocidos en la técnica. La expresión "vehículo aceptable en agricultura" cubre todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, adhesivos, aglutinantes, etc, que se usan ordinariamente en la tecnología de las formulaciones de plaguicidas; dichos vehículos son muy conocidos por los expertos en la técnica de formulación de plaguicidas. Las formulaciones se pueden mezclar con uno o más coadyuvantes sólidos o líquidos y prepararse de varios modos, por ejemplo, mezclando homogéneamente, removiendo y/o triturando la composición plaguicida con adyuvantes adecuados usando técnicas de formulación convencionales. Formulaciones y métodos de aplicación adecuados se describen en la Patente de EE.UU. N° 6.468.523.

Los polipéptidos de la invención tienen actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero. Las plagas de insectos para las principales cosechas son: **Maíz:** *Ostrinia nubilalis*, taladro del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Helicoverpa zea*, gusano elotero del maíz; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz; *Diatraea grandiosella*, taladro del maíz del sudoeste; *Elasmopalpus lignosellus*, taladro del tallo del maíz; *Diatraea saccharalis*, taladro de la caña de azúcar; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz del oeste; *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 alambres; *Cyclocephala borealis*, escarabajo enmascarado del norte (larva blanca); *Cyclocephala immaculata*, escarabajo enmascarado del sur (larva blanca); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Claaetocnema pulicaria*, escarabajo pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de las hojas del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, pulgón de las raíces del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Melanoplus femurrubrum*, saltamonte de patas rojas; *Melanoplus sanguinipes*, saltamonte migratorio; *Hylemya platyura*, gusano de la semilla del maíz; *Agromyza parvicornis*, minador de hojas del maíz; *Anaphothrips obscurus*, piojillos de pasto; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, araña de dos manchas; **Sorgo:** *Chilo partellus*, taladro del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero; *Helicoverpa zea*, gusano elotero del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, taladro del tallo del maíz; *Feltia subterranea*, gusano cortador granuloso; *Phyllophaga crinita*, larva blanca; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus spp.*, gusanos alambres; *Oulema melanopus*, escarabajos de las hojas de cereales; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón de las hojas del maíz; *Sipha flava*, pulgón amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquita del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, araña de color carmín; *Tetranychus urticae*, araña de dos manchas; **Trigo:** *Pseudaletia unipunctata*, gusano cogollero; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, taladro del tallo del maíz; *Agrotis orthogonia*, gusano del maíz del oeste; *Oulema melanopus*, escarabajo de las hojas de cereales; *Hypera punctata*, gorgojo de las hojas del trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; *Diuraphis noxia*, pulgón del trigo ruso; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Macrosiphum avenae*, pulgón de los cereales ingleses; *Melanoplus femurrubrum*, saltamonte de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamonte diferencial; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hess; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito del trigo; *Meromyza americana*, gusano de los tallos de trigo; *Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo; *Frankliniella fusca*, piojillos del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca sierra de los tallos de trigo; *Aceria tulipae*, ácaro rizado del trigo; **Girasol:** *Suleima helianthana*, polilla de los brotes de girasol; *Homoeosoma electellum*, polilla del girasol; *Zygogramma exclamationis*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de las zanahorias; *Neolasioptera murtfeldiana*, mosquito de las semillas del girasol; **Algodón:** *Heliothis virescens*, gusano de los brotes del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano de las cápsulas del algodón; *Spodoptera exigua*, gusano

cogollero de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, lagarta rosada; *Anthonomus grandis*, gorgojo de las cápsulas; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltadora del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca de alas bandeadas; *Lygus lineolaris*, chinche deslustrado; *Melanoplus femurrubrum*, saltamonte de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamonte diferencial; *Thrips tabaci*, piojillos de las cebollas; *Frankliniella fusca*, piojillos del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, araña de color carmín; *Tetranychus urticae*, araña de dos manchas; **Arroz:** *Diatraea saccharalis*, taladro de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano elotero del maíz; *Colaspis brunnea*, colaspis de la uva; *Lissorhoptus oryzophilus*, gorgojo de los arrozales; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, saltamonte de las hojas del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche hediondo verde; **Soja:** *Pseudoplusia includens*, rizador de la soja; *Anticarsia gemmatilis*, oruga de la judía aterciopelada; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, taladro del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Spodoptera exigua*, gusano cogollero de la remolacha; *Heliothis virescens*, gusano de los brotes de maíz; *Helicoverpa zea*, gusano de las cápsulas del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo de las judías mexicanas; *Myzus persicae*, pulgón verde de los melocotones; *Empoasca fabae*, saltamontes de la hoja de patata; *Acrosternum hilare*, chinche hediondo verde; *Melanoplus femurrubrum*, saltamonte de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamonte diferencial; *Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz; *Sericothrips variabilis*, piojillos de la soja; *Thrips tabaci*, piojillos de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, araña de las fresas; *Tetranychus urticae*, araña de dos manchas; **Cebada:** *Ostrinia nubilalis*, taladro del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Schizaphis graminum*, chinche verde; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche hediondo verde; *Euschistus servus*, chinche hediondo pardo; *Delia platura*, gusano de las semillas del maíz; *Mayetiola destructor*, mosca de Hess; *Petrobia latens*, ácaro pardo del trigo; **Colza:** *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la col; *Phyllotreta cruciferae*, escarabajo pulga; *Mamestra configurata*, gusano cogollero Berta; *Plutela xylostela*, polilla de lomo rómbico; *Delia* ssp., gusanos de las raíces.

En toda la memoria, la expresión "que comprende" o las variaciones, tales como "comprenden" o "que comprenden", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, un número entero o una etapa o un grupo de elementos, números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solamente como ilustración y de ningún modo como limitación.

PARTE EXPERIMENTAL

30 Ejemplo 1. Extracción de DNA de plásmidos

Un cultivo puro de la cepa ATX13026 se hizo crecer en grandes cantidades de medio rico. El cultivo se centrifugó para cosechar el sedimento de células. El sedimento de células se preparó luego por tratamiento con SDS por métodos conocidos en la técnica, dando como resultado la rotura de la pared celular y la liberación de DNA. Las proteínas y el DNA genómico grande se precipitó luego mediante una alta concentración de sal. El DNA plasmídico se precipitó luego por precipitación estándar con etanol. El DNA plasmídico se separó luego de cualquier DNA cromosómico restante por centrifugación a alta velocidad a través de un gradiente de cloruro de cesio. El DNA se visualizó en el gradiente por luz UV y la banda de menor densidad (es decir, la banda inferior) se extrajo usando una jeringa. Esta banda contenía el DNA plasmídico de la cepa ATX13026. La calidad del DNA se comprobó por visualización en un gel de agarosa por métodos conocidos en la técnica.

40 Ejemplo 2. Clonación de genes

El DNA plasmídico purificado se cizalló en fragmentos de un tamaño de 5-10 kb y los extremos colgantes monocatenarios 5' y 3' se repararon usando DNA-polimerasa de T4 y fragmento de Klenow en presencia de los cuatro dNTP, como es conocido en la técnica. A los extremos 5' se les añadió fosfatos por tratamiento con polinucleótido-quinasa de T4. Los fragmentos de DNA reparados se ligaron luego durante una noche en un vector estándar de alto número de copias (es decir, pBluescript SK+), adecuadamente preparado para aceptar los insertos como es conocido en la técnica (por ejemplo por digestión con una enzima de restricción que produce extremos romos).

La calidad de la genoteca se analizó digiriendo un subconjunto de clones con una enzima de restricción que se sabe que tiene un sitio de restricción que flanquea el sitio de clonación. Se determinó que un alto porcentaje de clones contenían insertos con un tamaño medio de insertos de 5-6 kb.

50 Ejemplo 3. Secuenciación de alta productividad de placas de genotecas

Una vez que se comprobó y confirmó la calidad de la genoteca por perdigonada se hicieron crecer colonias en un caldo rico en bloques de 96 pocillos de 2 ml durante una noche a 37°C a una velocidad de agitación de 350 rpm. Los bloques fueron centrifugados para cosechar las células en el fondo del bloque. Los bloques se acondicionaron luego por una preparación de lisis alcalina estándar en un formato de alta productividad.

Las secuencias de los extremos de los clones de esta genoteca se determinaron para un gran número de clones del

modo siguiente: La secuencia de DNA de cada clon elegido para el análisis se determinó usando la técnica de secuenciación con terminador colorante fluorescente (Applied Biosystems) y los cebadores estándares que flanquean cada lado del sitio de clonación. Una vez que se habían llevado a cabo las reacciones en el termociclador, el DNA se precipitó usando precipitación estándar con etanol. El DNA se re-suspendió en agua y se cargó en una máquina de secuenciación capilar. Cada placa de la genoteca de DNA se secuenció desde cualquier extremo del sitio de clonación, proporcionando dos lecturas por placa en cada inserto.

Ejemplo 4. Ensamblaje y cribado de datos de secuenciación

Las secuencias de DNA obtenidas se compilaron en un proyecto de ensamblaje y se alinearon conjuntamente para formar contigios (conjunto de segmentos de DNA solapantes). Esto se puede hacer eficazmente usando un programa informático, tal como Vector NTi, o alternativamente usando un grupo de programas informáticos Pred/Phrap de alineamiento de DNA y análisis. Estos contigios, junto con cualquier lectura individual que puede no haber sido añadida a un contigio, se compararon con una base de datos compilada de todas las clases de genes de plaguicidas conocidos. Se analizaron adicionalmente los contigios o las lecturas individuales identificadas que tenían identidad con una endotoxina o un plaguicida conocido. Entre las secuencias obtenidas, el clon pAX010 contenía DNA identificado que tiene homología con genes de endotoxina conocidos. Por tanto, pAX010 se seleccionó para posterior secuenciación.

Ejemplo 5. Secuenciación de pATX010 e identificación de AXMI-010

Se diseñaron cebadores para asociarse a pAX-010, de tal modo que las secuencias de DNA generadas a partir de dichos cebadores se solaparan con secuencias de DNA existentes de los clone(s). Este proceso, conocido como "oligo walking", es muy conocido en la técnica. Este proceso se utilizó para determinar la secuencia de DNA completa de la región que exhibe homología con un gen de endotoxina conocido. En el caso de pAX-010, este proceso se usó para determinar la secuencia de DNA del clon completo, dando como resultado una sola secuencia de nucleótidos. La secuencia de DNA completada se colocó de nuevo en el ensamblaje grande original para posterior validación. Esto permitió la incorporación de más lecturas de secuencias de DNA en el contigio, dando como resultado múltiples lecturas que cubren la región completa.

El análisis de la secuencia de DNA de pAX-010 por métodos conocidos en la técnica identificó un marco de lectura abierto con homología con los genes conocidos de delta-endotoxinas. Este marco de lectura abierto se denomina AXMI-010. La secuencia de DNA de AXMI-010 es proporcionada como SEQ ID NO:1, y la secuencia de aminoácidos de la proteína de AXMI-010 predicha es proporcionada en la SEQ ID NO:2.

Ejemplo 6. Homología de AXMI-010 con genes de endotoxinas conocidos

Las búsquedas en bases de datos de DNA y proteínas con la secuencia de DNA y la secuencia de aminoácidos de AXMI-010 revelan que AXMI-010 es homólogo a un conjunto de endotoxinas conocidas.

Las búsquedas por el programa BLAST identifican ET69 (*cry36Aa1*) que tiene el bloque más fuerte de homología con AXMI-010. La identidad global de aminoácidos AXMI-010 con *cry36Aa1* es 35% (véase la Tabla 1). El alineamiento de la proteína AXMI-10 (SEQ ID NO:2) con un conjunto de proteínas toxinas relacionadas (Figura 1) muestra que la proteína homóloga es *cry36Aa1*. Búsquedas en base de datos PFAM identifican AXMI-010 que tiene homología con la familia de la toxina cristal insecticida, P42 (familia de 'toxina 10') de endotoxinas (Nº de acceso en PFAM. PF05431). Cepas de *Bacillus* que tienen esta actividad insecticida usan una toxina binaria constituida por dos proteínas, P51 y P42 (esta familia). La proteína P42 sola ha demostrado tener actividad contra mosquitos (Baumann et al. (1985) *J. Bacteriol.* 163:738-47). ET69 ha demostrado tener actividad contra el gusano de la raíz del maíz del oeste (WCRW) (Publicación de patente internacional Nº WO/0066742). Miembros de esta familia están altamente conservados entre cepas de diferentes serotipos y grupos de fagos (Humphreys and Berry (1998) *J. Invert. Pathol.* 71:184-185). Estas toxinas difieren algo de la endotoxina 'típica' porque no contienen el conjunto de cinco dominios conservados compartidos, por ejemplo por las toxinas similares a *Cry1Aα*. AXMI-010 contiene dominios conservados que están presentes en esta subfamilia de toxinas similar a "*B. Sphaericus*". La inspección de la secuencia de aminoácidos de AXMI-010 sugiere que no contiene un dominio no tóxico C-terminal como está presente en diversas familias de endotoxinas.

Tabla 1. Identidad de los aminoácidos de AXMI-010 con las toxinas relacionadas

Toxina	Nº de acceso en GenBank	Identidad de aminoácidos para AXMI-010
<i>Cry36Aa1</i> (ET69)	AAK64558.1	35%
BinB4	CAA04920.1	24%
<i>Cry35Ab</i> (149-B1)	AAG41672.1	14%

Ejemplo 7. Ensayo de actividad plaguicida

La capacidad de una proteína plaguicida de actuar como un plaguicida sobre una plaga se determina frecuentemente por cierto número de modos. Un modo muy conocido en la técnica es realizar un ensayo de alimentación. En dicho ensayo de alimentación, se expone la plaga a una muestra que contiene los compuestos a ensayar o muestras de control. Frecuentemente esto se realiza colocando el material a ensayar o una dilución adecuada de dicho material sobre un material que ingerirá el organismo de la plaga, tal como una dieta artificial. El material a ensayar puede estar constituido por un líquido, sólido o suspensión. El material a ensayar puede ser colocado sobre una superficie y dejarse secar. Alternativamente, el material a ensayar se puede mezclar con una dieta artificial fundida, y luego ser distribuido en una cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una copa, una bandeja o un pocillo de una placa de microtitulación.

Los ensayos para plagas de organismos chupadores (por ejemplo pulgones) pueden implicar separar el material de ensayo del insecto mediante un tabique, idealmente una porción que puede ser perforada por las partes chupadoras de la boca del insecto chupador, para permitir la ingestión del material de ensayo. Frecuentemente el material de ensayo se mezcla con un estimulante de la alimentación, tal como sacarosa para promover la ingestión del compuesto de ensayo.

Otros tipos de ensayo pueden incluir microinyección del material de ensayo en la boca o el intestino del organismo de la plaga, así como desarrollar plantas transgénicas, seguido por el ensayo de verificar la capacidad de la plaga de alimentarse de la planta transgénica. El ensayo con plantas puede implicar el aislamiento de las partes de la planta normalmente consumidas, por ejemplo, pequeñas jaulas unidas a una hoja o aislamiento de plantas completas en jaulas que contienen insectos.

Otros métodos y enfoques para analizar o ensayar plagas son conocidos en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo en Robertson, J.L. & H. K. Preisler. 1992. *Pesticide bioassays with arthropodes*. CRC, Boca Raton, FL. Alternativamente, se describen usualmente ensayos en las revistas "*Arthropod Management Tests*" y "*Journal of Economic Entomology*" o en debates con miembros de la *Entomological Society of America* (ESA).

Ejemplo 8. Expresión de AXMI-0010 en *Bacillus*

El gen insecticida AXMI-010 es amplificado por PCR a partir de pATX-010, y clonado en el vector de expresión de *Bacillus* pAX916 por métodos muy conocidos en la técnica. El clon resultante es analizado para la expresión de la proteína AXMI-010 después de la transformación en células de una cepa *cry(-)* de *Bacillus thuringiensis*. Una cepa de *Bacillus* que contiene el clon AXMI-010 y que expresa la proteína insecticida AXMI-010 se hace crecer en medio CYS (10 g/L de bacto-casitona; 3 g/L de extracto de levadura; 6 g/l de KH₂PO₄; 14 g/l de K₂HPO₄; MgSO₄ 0,5 mM; MnCl₂ 0,05 mM; FeSO₄ 0,05 mM), hasta que la esporulación es evidente por examen microscópico. Se preparan muestras, y se analiza el AXMI-010 para actividad insecticida en bioensayos contra importantes plagas de insectos.

Métodos

Para preparar medio CYS: 10 g/l de bacto-casitona; 3 g/l de extracto de levadura; 6 g/l de KH₂PO₄; 14 g/l de K₂HPO₄; MgSO₄ 0,5 mM; MnCl₂ 0,05 mM; FeSO₄ 0,05 mM. La mezcla CYS debe tener pH 7, y se ajusta si es necesario. Se prefieren NaOH o HCl. El medio se trata luego en autoclave y se añaden después del tratamiento en autoclave 100 ml de glucosa filtrada 10X. Si la solución resultante es turbia puede agitarse a la temperatura ambiente hasta que sea transparente.

Ejemplo 9. Vectorización de AXMI-010 para expresión in plantas

El DNA de la región codificadora de AXMI-010 se conecta operativamente con secuencias de promotor y terminador adecuadas para la expresión en plantas. Dichas secuencias son muy conocidas en la técnica y pueden incluir el promotor de actina del arroz y el promotor de ubiquitina del maíz para la expresión en monocotiledóneas, el promotor UBQ3 de *Arabidopsis* o el promotor 35S del CaMV para la expresión en dicotiledóneas, y los terminadores *nos* o *PinII*. Los métodos para producir y confirmar construcciones de promotor-gen-terminador también son muy conocidos en la técnica.

Los casetes de expresión en plantas descritos anteriormente se combinan con un marcador seleccionable de plantas apropiado para ayudar en las selecciones de células y tejidos transformados, y se ligan en vectores de transformación vegetal. Estos vectores pueden incluir vectores binarios de transformación mediada por *Agrobacterium* o vectores plasmídicos sencillos para transformación por aerosol o biolística.

Ejemplo 10. Transformación de células de maíz con AXMI-010

Se recogen mazorcas de maíz de 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas, y para la transformación se usan los embriones que tienen un tamaño de 0,8-1,5 mm. Los embriones se cultivan en placas con el lado del escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado, tal como el medio DN62A5S (3,98 g/L de sales N6; 1 mL/L de vitaminas N6 (de 1000x solución madre); 800 mg/L de L-asparagina; 100 mg/L de mio-inositol; 1,4 g/L de L-prolina; 100 mg/L de casaminoácidos; 50 g/L de sacarosa; 1 mL/L de 2,4-D (de 1 mg/mL de

solución madre)), y se incubaron a 25°C en la oscuridad.

Los explantes resultantes se transfieren a mallas (30-40 por placa), se transfieren a un medio osmótico durante 30-45 minutos, y luego se transfieren a un placa receptora de haces de partículas (véase, por ejemplo, la publicación PCT N° WO/ 0138514 y la patente de EE.UU. N° 5.240.842).

- 5 Las construcciones de DNA diseñadas para expresar AXMI-010 en células vegetales se aceleran en tejido vegetal usando un acelerador de haces de aerosol, usando condiciones esencialmente como las descritas en la publicación PCT N° WO/0138514. Después del tratamiento con los haces de aerosol, los embriones se incuban durante 30 minutos en un medio osmótico, luego se colocan en un medio de incubación durante una noche a 25°C en la oscuridad. Para evitar un daño indebido los explantes tratados con los haces, se incuban durante al menos 24 horas antes de transferirlos a un medio de recuperación. Los embriones se extienden luego sobre el medio del periodo de recuperación, durante 5 días, a 25°C en la oscuridad, luego se transfieren a un medio de selección. Los explantes se incuban en un medio de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, el callo resultante se transfiere a un medio de maduración de embriones hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Los embriones somáticos maduros resultantes se colocan bajo luz de poca intensidad y se inicia el proceso de regeneración por métodos conocidos en la técnica. Los brotes resultantes se dejan crecer en un medio de enraizamiento y las plantas resultantes se transfieren a tiestos de vivero y se propagan como plantas transgénicas.

Materiales

Medio DN62A5S

Componentes	por litro	Fuente
Mezcla de sales Chu'S N6 Basal (Prod. N° C 416)	3,98 g/L	Phytotechnology Labs
Solución de vitaminas Chu's N6 (Prod. N° C 149)	1 mL/L (de 1000 x sol. madre)	Phytotechnology Labs
L-Asparagina	800 mg/L	Phytotechnology Labs
Mio-inositol	100 mg/L	Sigma
L-Prolina	1,4 g/L	Phytotechnology Labs
Casaminoácidos	100 mg/L	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/L	Phytotechnology Labs
2,4-D (Prod. N° D-7299)	1 mL/L (de 1 mg/mL sol. madre)	Sigma

- 20 Se ajusta el pH de la solución hasta pH 5,8 con KOH 1N/KCl 1N, se añade Gelrite (Sigma) hasta 3 g/L, y se trata en autoclave. Después de enfriar a 50°C, se añaden 2 ml/L de una solución madre de 5 mg/ml nitrato de plata (Phytotechnology Labs). La receta proporciona aproximadamente 20 placas.

Ejemplo 11. Transformación de AXMI-010 en células vegetales por transformación mediada por *Agrobacterium*

- 25 Se recogen espigas 8-12 días después de la polinización. Se aíslan los embriones de las espigas y se usan para la transformación los embriones que tengan un tamaño de 0,8-1,5 mm. Los embriones se cultivan en placas con el lado del escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado y se incuban durante una noche a 25°C en la oscuridad. Sin embargo, no es necesario *per* se incuban los embriones toda la noche. Los embriones se ponen en contacto con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores apropiados para la transferencia mediada por el plásmido Ti durante 5-10 minutos, y luego se cultivan en placas en un medio de cultivo conjunto durante 3 días (25°C en la oscuridad). Después del cultivo conjunto, los explantes se transfieren a un medio del periodo de recuperación durante cinco días (a 25°C en la oscuridad). Los explantes se incuban en un medio de selección hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección el callo resultante se transfiere a un medio de maduración de embriones, hasta que se observe la formación de embriones somáticos maduros. Los embriones somáticos maduros resultantes se colocan luego bajo luz de baja intensidad y se inicia el proceso de regeneración como es conocido en la técnica. Los brotes resultantes se dejan enraizar en un medio de enraizamiento y las plantas resultantes se transfieren a tiestos de vivero y se propagan como plantas transgénicas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Carozzi, Nadine
 Hargiss, Tracy
 Koziel, Michael G.
 5 Duck, Nicholas B.
 Carr, Brian

<120> AXMI-010, UN GEN DE LA DELTA-ENDOTOXINA Y MÉTODOS PARA SU USO.
 <130> 045600/282810
 <150> 60/510,982
 10 <151> 14-10-2003
 <160> 5
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 1467
 15 <212> DNA
 <213> Bacillus thuringiensis
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1467)
 20 <400> 1

atg aat gta aat caa aga gat gat aga tat aat cag cag cat acg aca	48
Met Asn Val Asn Gln Arg Asp Asp Arg Tyr Asn Gln Gln His Thr Thr	
1 5 10 15	
aat gaa cag gtg cat gag aat ggg aat tct aat agt cga att cat gct	96
Asn Glu Gln Val His Glu Asn Gly Asn Ser Asn Ser Arg Ile His Ala	
20 25 30	
gga gct tgt tct tgc ggt tgt cag caa gga ata tat gat aat tac tcc	144
Gly Ala Cys Ser Cys Gly Cys Gln Gln Gly Ile Tyr Asp Asn Tyr Ser	
35 40 45	
aca aaa aat aat aag ggg agt aat tat tct gta ata aaa ggt tct tca	192
Thr Lys Asn Asn Lys Gly Ser Asn Tyr Ser Val Ile Lys Gly Ser Ser	
50 55 60	
caa aat gat atg aac tat gaa aac aca aac tat aat gga ttg aat agt	240
Gln Asn Asp Met Asn Tyr Glu Asn Thr Asn Tyr Asn Gly Leu Asn Ser	
65 70 75 80	
tgt gtc cca cca gta tta aat tta cct att gaa agt act caa ttt caa	288
Cys Val Pro Pro Val Leu Asn Leu Pro Ile Glu Ser Thr Gln Phe Gln	
85 90 95	
acg ata agc gcc tca ggt gag tcg act atg tgt tta gat tct tgg aat	336
Thr Ile Ser Ala Ser Gly Glu Ser Thr Met Cys Leu Asp Ser Trp Asn	
100 105 110	
att agg aaa ggc act gat ttg aat aat gga atg tcc gga gtg tgt cgg	384
Ile Arg Lys Gly Thr Asp Leu Asn Asn Gly Met Ser Gly Val Cys Arg	
115 120 125	
aaa gtg cct aat gat tat caa gtt act att tat cct ctt aat aca gcg	432
Lys Val Pro Asn Asp Tyr Gln Val Thr Ile Tyr Pro Leu Asn Thr Ala	
130 135 140	

ES 2 375 058 T3

aat gat tca caa tat ttt ata ttt tac cgg tta gat gat ggg aat ttt	480
Asn Asp Ser Gln Tyr Phe Ile Phe Tyr Arg Leu Asp Asp Gly Asn Phe	
145 150 155 160	
ata ata gct agt cag aat cac gga cgt gtt ttt gat aag gga tta agc	528
Ile Ile Ala Ser Gln Asn His Gly Arg Val Phe Asp Lys Gly Leu Ser	
165 170 175	
gat cat agt att gtg gca agt tta tac act ggt aat aat gat caa aga	576
Asp His Ser Ile Val Ala Ser Leu Tyr Thr Gly Asn Asn Asp Gln Arg	
180 185 190	
ttt tcg aaa gtt act act tca agt aat aat ttt act tta aga aga aat	624
Phe Ser Lys Val Thr Thr Ser Ser Asn Asn Phe Thr Leu Arg Arg Asn	
195 200 205	
gga aga tgg gtg gat gct tgt gat cgt aat atg gca aac gat cgc ctt	672
Gly Arg Trp Val Asp Ala Cys Asp Arg Asn Met Ala Asn Asp Arg Leu	
210 215 220	
ctt gta gct gat act act act act tct act gcg aca ttc cgt cat agt	720
Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr Thr Ser Thr Ala Thr Phe Arg His Ser	
225 230 235 240	
gat gta aga aat ata gat aac tta aat tta tct tgt gta aca gca tta	768
Asp Val Arg Asn Ile Asp Asn Leu Asn Leu Ser Cys Val Thr Ala Leu	
245 250 255	
ggt cca ctg cca gat tta acg gga ttg aat gat tca gga cca tct cca	816
Gly Pro Leu Pro Asp Leu Thr Gly Leu Asn Asp Ser Gly Pro Ser Pro	
260 265 270	
gaa gca gca tca aga gca acc atg ggt agt tgg ctt atc cct tgt ata	864
Glu Ala Ala Ser Arg Ala Thr Met Gly Ser Trp Leu Ile Pro Cys Ile	
275 280 285	
ttt ata aat gat gta atc cca tta gag aac aga atc aaa cag agt cct	912
Phe Ile Asn Asp Val Ile Pro Leu Glu Asn Arg Ile Lys Gln Ser Pro	
290 295 300	
tat tat tta tta gaa tat aga cag tat tgg cat aga tta tgg tca gat	960
Tyr Tyr Leu Leu Glu Tyr Arg Gln Tyr Trp His Arg Leu Trp Ser Asp	
305 310 315 320	
gtg att cct gct tca gat tca aga atc ttt gaa gaa aca aca ggg ata	1008
Val Ile Pro Ala Ser Asp Ser Arg Ile Phe Glu Glu Thr Thr Gly Ile	
325 330 335	
gaa cct gat agt caa tcg aat atg agc cgt aca gta gat ata atg ata	1056
Glu Pro Asp Ser Gln Ser Asn Met Ser Arg Thr Val Asp Ile Met Ile	
340 345 350	
ggg gca gat tgg aat tta aga ttc gga agt ctt tca aca ccg ttt aga	1104
Gly Ala Asp Trp Asn Leu Arg Phe Gly Ser Leu Ser Thr Pro Phe Arg	
355 360 365	
caa caa att ttg tcg ggt tta aat acg cta agc tca tat tct aat atg	1152
Gln Gln Ile Leu Ser Gly Leu Asn Thr Leu Ser Ser Tyr Ser Asn Met	
370 375 380	
aat tta gga ata aga aca aac ctt cca cgt tat aca aat ttc aat agt	1200
Asn Leu Gly Ile Arg Thr Asn Leu Pro Arg Tyr Thr Asn Phe Asn Ser	
385 390 395 400	
cag gca gtt aga tat gcc aga ttt aca aga gcg tat gag tat aga tta	1248
Gln Ala Val Arg Tyr Ala Arg Phe Thr Arg Ala Tyr Glu Tyr Arg Leu	
405 410 415	

ES 2 375 058 T3

```

aca cgt att gat gga aca cgc gta gga aca tgg gta gcc cta gat aat 1296
Thr Arg Ile Asp Gly Thr Arg Val Gly Thr Trp Val Ala Leu Asp Asn
      420                      425                      430

aga agc atg tat ctg aaa aca ttc cct cat aat atg caa tta tct gta 1344
Arg Ser Met Tyr Leu Lys Thr Phe Pro His Asn Met Gln Leu Ser Val
      435                      440                      445

caa gat aac aaa ata aaa aga agt gat aac agc tat gat cta tcc gta 1392
Gln Asp Asn Lys Ile Lys Arg Ser Asp Asn Ser Tyr Asp Leu Ser Val
      450                      455                      460

tgg aaa aca cca atg gta ata aaa gat ggt gaa atg aaa ata aaa aat 1440
Trp Lys Thr Pro Met Val Ile Lys Asp Gly Glu Met Lys Ile Lys Asn
465                      470                      475                      480

aaa cat aat tca aaa cca tac aat gag 1467
Lys His Asn Ser Lys Pro Tyr Asn Glu
      485

```

<210> 2

<211> 489

<212> PRT

5 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 2

ES 2 375 058 T3

Met Asn Val Asn Gln Arg Asp Asp Arg Tyr Asn Gln Gln His Thr Thr
1 5 10 15
Asn Glu Gln Val His Glu Asn Gly Asn Ser Asn Ser Arg Ile His Ala
20 25 30
Gly Ala Cys Ser Cys Gly Cys Gln Gly Ile Tyr Asp Asn Tyr Ser
35 40 45
Thr Lys Asn Asn Lys Gly Ser Asn Tyr Ser Val Ile Lys Gly Ser Ser
50 55 60
Gln Asn Asp Met Asn Tyr Glu Asn Thr Asn Tyr Asn Gly Leu Asn Ser
65 70 75 80
Cys Val Pro Pro Val Leu Asn Leu Pro Ile Glu Ser Thr Gln Phe Gln
85 90 95
Thr Ile Ser Ala Ser Gly Glu Ser Thr Met Cys Leu Asp Ser Trp Asn
100 105 110
Ile Arg Lys Gly Thr Asp Leu Asn Asn Gly Met Ser Gly Val Cys Arg
115 120 125
Lys Val Pro Asn Asp Tyr Gln Val Thr Ile Tyr Pro Leu Asn Thr Ala
130 135 140
Asn Asp Ser Gln Tyr Phe Ile Phe Tyr Arg Leu Asp Asp Gly Asn Phe
145 150 155 160
Ile Ile Ala Ser Gln Asn His Gly Arg Val Phe Asp Lys Gly Leu Ser
165 170 175
Asp His Ser Ile Val Ala Ser Leu Tyr Thr Gly Asn Asn Asp Gln Arg
180 185 190
Phe Ser Lys Val Thr Thr Ser Ser Asn Asn Phe Thr Leu Arg Arg Asn
195 200 205
Gly Arg Trp Val Asp Ala Cys Asp Arg Asn Met Ala Asn Asp Arg Leu
210 215 220
Leu Val Ala Asp Thr Thr Thr Thr Ser Thr Ala Thr Phe Arg His Ser
225 230 235 240
Asp Val Arg Asn Ile Asp Asn Leu Asn Leu Ser Cys Val Thr Ala Leu
245 250 255
Gly Pro Leu Pro Asp Leu Thr Gly Leu Asn Asp Ser Gly Pro Ser Pro
260 265 270
Glu Ala Ala Ser Arg Ala Thr Met Gly Ser Trp Leu Ile Pro Cys Ile
275 280 285
Phe Ile Asn Asp Val Ile Pro Leu Glu Asn Arg Ile Lys Gln Ser Pro
290 295 300
Tyr Tyr Leu Leu Glu Tyr Arg Gln Tyr Trp His Arg Leu Trp Ser Asp
305 310 315 320
Val Ile Pro Ala Ser Asp Ser Arg Ile Phe Glu Glu Thr Thr Gly Ile
325 330 335
Glu Pro Asp Ser Gln Ser Asn Met Ser Arg Thr Val Asp Ile Met Ile
340 345 350
Gly Ala Asp Trp Asn Leu Arg Phe Gly Ser Leu Ser Thr Pro Phe Arg
355 360 365
Gln Gln Ile Leu Ser Gly Leu Asn Thr Leu Ser Ser Tyr Ser Asn Met
370 375 380
Asn Leu Gly Ile Arg Thr Asn Leu Pro Arg Tyr Thr Asn Phe Asn Ser
385 390 395 400
Gln Ala Val Arg Tyr Ala Arg Phe Thr Arg Ala Tyr Glu Tyr Arg Leu
405 410 415
Thr Arg Ile Asp Gly Thr Arg Val Gly Thr Trp Val Ala Leu Asp Asn
420 425 430
Arg Ser Met Tyr Leu Lys Thr Phe Pro His Asn Met Gln Leu Ser Val
435 440 445
Gln Asp Asn Lys Ile Lys Arg Ser Asp Asn Ser Tyr Asp Leu Ser Val
450 455 460
Trp Lys Thr Pro Met Val Ile Lys Asp Gly Glu Met Lys Ile Lys Asn
465 470 475 480
Lys His Asn Ser Lys Pro Tyr Asn Glu
485

<210> 3
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Bacillus sphaericus

5 <400> 3

```

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

Thr Gly Ile Ser Glu Val Val Gln Asn Ser Met Ile Glu Asp Leu Asn
290     295     300
Met Tyr Ile Gly Ala Asp Phe Gly Met His Phe Tyr Leu Arg Ser Ser
305     310     315     320
Gly Phe Lys Glu Gln Ile Thr Arg Gly Leu Asn Arg Pro Leu Ser Gln
      325     330     335
Thr Thr Thr Gln Leu Gly Glu Arg Val Glu Glu Met Glu Tyr Tyr Asn
      340     345     350
Ser Asn Asp Leu Asp Val Arg Tyr Val Lys Tyr Ala Leu Ala Arg Glu
355     360     365
Phe Thr Leu Lys Arg Val Asn Gly Glu Ile Val Lys Asn Trp Val Ala
370     375     380
Val Asp Tyr Arg Met Ala Gly Ile Gln Ser Tyr Pro Asn Ala Pro Ile
385     390     395     400
Thr Asn Pro Leu Thr Leu Thr Lys His Thr Ile Ile Arg Cys Glu Asn
      405     410     415
Ser Tyr Asp Gly His Ile Phe Lys Thr Pro Leu Ile Phe Lys Asn Gly
      420     425     430
Glu Val Ile Val Lys Thr Asn Glu Glu Leu Ile Pro Lys Ile Asn Gln
435     440     445
    
```

<210> 4

<211> 520
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 4

```

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

5

ES 2 375 058 T3

305					310					315					320
Val	Asn	Asp	Val	Ile	Pro	Val	Ala	Gln	Arg	Met	Gln	Glu	Ser	Pro	Tyr
				325					330					335	
Tyr	Val	Leu	Thr	Tyr	Asn	Thr	Tyr	Trp	His	Arg	Val	Ile	Ser	Ala	Ile
			340					345					350		
Leu	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Thr	Thr	Arg	Phe	Asp	Val	Asn	Leu	Pro	Gly
		355					360					365			
Pro	Asn	Gln	Ser	Thr	Met	Val	Asp	Val	Leu	Asp	Thr	Ala	Ile	Thr	Ala
		370				375					380				
Asp	Phe	Arg	Leu	Gln	Phe	Val	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	Asn	Val	Phe	Gln
385					390					395					400
Gln	Gln	Ile	Arg	Asn	Gly	Leu	Asn	Ile	Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Ser	His
				405					410					415	
Arg	Leu	Gly	Asp	Glu	Thr	Arg	Asn	Trp	Asp	Phe	Thr	Asn	Arg	Gly	Ala
			420					425					430		
Gln	Gly	Arg	Leu	Ala	Phe	Phe	Val	Lys	Ala	His	Glu	Phe	Val	Leu	Thr
		435					440					445			
Arg	Ala	Asn	Gly	Thr	Arg	Val	Ser	Asp	Pro	Trp	Val	Ala	Leu	Asp	Pro
	450					455					460				
Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Gln	Thr	Phe	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu
465					470					475					480
Lys	Glu	Lys	Ile	Val	Cys	Ala	Ser	Asn	Ser	Tyr	Asn	Leu	Ser	Val	Trp
				485					490					495	
Lys	Thr	Pro	Met	Glu	Ile	Lys	Asn	Gly	Lys	Ile	Tyr	Thr	Lys	Asn	Glu
			500					505						510	
Trp	Asn	Thr	Lys	Pro	Asn	Tyr	Lys								
		515					520								

<210> 5

<211> 383

<212> PRT

5 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 5

ES 2 375 058 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:
 - a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;
 - 5 b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero;
 - c) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; y,
 - 10 d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2, en donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida contra un insecto lepidóptero.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos en un célula vegetal.
3. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2.
- 15 4. El vector de la reivindicación 3, que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.
5. Una planta o célula bacteriana hospedante que contiene el vector de la reivindicación 3.
6. Una semilla que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2.
7. Un polipéptido con actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, seleccionada del grupo que consiste en:
 - 20 a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2;
 - b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2;
 - c) un polipéptido que está codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1; y,
 - 25 d) un polipéptido que está codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.
8. El polipéptido de la reivindicación 7, que comprende además secuencias heterólogas de aminoácidos.
9. Un método para matar o controlar una población de una plaga de lepidópteros, que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad eficaz como plaguicida de un polipéptido de la reivindicación 7 u 8.
- 30 10. Un método para producir un polipéptido con actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 5 en condiciones en las cuales se expresa una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.
11. Una planta o una célula vegetal que tiene incorporado establemente en su genoma una construcción de DNA que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, en donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
 - 35 a) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;
 - b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;
 - 40 c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; y,
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2; en donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificadora en una célula vegetal.
 - 45
12. La planta o célula vegetal transgénica de la reivindicación 11, en donde dicha planta o célula vegetal se

selecciona del grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, col, girasol, tomate, crucíferas, pimientas, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza.

- 5 **13.** Un método para proteger una planta de una plaga, que comprende introducir en dicha planta o en sus células al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido plaguicida, en donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- a) una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1;
 - b) una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1; y
 - 10 c) una molécula de ácido nucleico que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2; y
 - d) una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de al menos el 80% en la totalidad de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:2, en donde dicho polipéptido tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros.

