

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 079**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/32** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2006 E 06795076 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1904521**

54 Título: **Nuevas proteínas bacterianas con actividad plaguicida**

30 Prioridad:

**08.07.2005 US 697391 P**

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

**18.12.2013**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO INSTITUTO (100.0%)  
V. UNIVERSIDAD NO. 2001 COL. CHAMILPA  
62210 CUERNAVACA, MORELOS, MX**

72 Inventor/es:

**BRAVO-DE-LA-PARRA, ALEJANDRA y  
SOBERON-CHAVEZ, MARIO**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 435 079 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Nuevas proteínas bacterianas con actividad plaguicida

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del control de plagas, particularmente el control de insectos. Se proporcionan secuencias de ADN recombinantes que codifican proteínas plaguicidas denominadas proteínas ISLP, y sus fragmentos o variantes tóxicos, que son útiles para proteger organismos del daño por plagas, tal como la protección de plantas frente al daño por insectos. Se proporcionan además plantas que comprenden una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína ISLP de la invención, así como métodos y medios para usar estas secuencias de ácidos nucleicos para reducir el daño por plagas, tal como daño por insectos, a las plantas.

10 Antecedentes

El uso de bioplaguicidas bacterianos tales como *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una alternativa viable para el control de insectos en agricultura y otras áreas (es decir, vectores de enfermedad) que intensificará la producción de cultivos de una manera económicamente sostenible y medioambientalmente amigable. Las proteínas Bt Cry son muy específicas, inocuas para seres humanos, vertebrados y plantas, y son completamente biodegradables de manera que no se acumulan productos tóxicos residuales en el entorno (Schnepf et al., 1998). Hasta la fecha, se han determinado y clasificado 200 secuencias de genes cry en 44 familias y diferentes subclases (Crickmore et al., 1998, 2005). Adicionalmente, Bt produce un número de compuestos extracelulares que pueden contribuir a la virulencia, como fosfolipasas, proteasas, quitinasas y otras toxinas tales como  $\beta$ -exotoxina o proteínas VIP (Schnepf et al., 1998). A pesar de la intensa investigación a lo largo de las últimas décadas, sólo se usan unas pocas toxinas insecticidas bacterianas a gran escala frente a las plagas de insectos más dañinas en aplicaciones biológicas del control de insectos, tales como aquellas que usan plantas Bt.

La capa S es una estructura ordenada del conjunto paracristalino proteinoso, que cubre la superficie de muchas arqueas y eubacterias (Beveridge et al., 1997; Sara y Sleytr, 2000) y puede constituir hasta el 15% de la proteína celular total. La función de las proteínas de la capa S no se ha definido exactamente, pero se ha propuesto que estas proteínas están implicadas en la integridad y mantenimiento de la forma celulares. También, se ha teorizado que pueden estar implicadas en el intercambio macromolecular con el entorno, ya que son el componente de cubierta celular más externo (Beveridge et al., 1997). En algunas bacterias patógenas gramnegativas, se han visto implicadas en virulencia y resistencia al exterminio mediado por el complemento (Sara y Sleytr, 2000; Pei y Blaser, 1990). En *B. cereus*, se ha descrito que la capa S promueve interacciones con leucocitos humanos y con el hospedante, contribuyendo a la patogenicidad (Kotiranta et al., 1998). En *B. anthracis*, se ha propuesto que la capa S y la cápsula pueden cooperar en la interacción con el hospedante (Mignot et al., 2002).

En *B. anthracis*, se han descrito dos proteínas de la capa S diferentes (SAP y EA1) (Mignot et al., 2002). La presencia de estas proteínas no es necesaria para el encapsulamiento normal de los bacilos (Mesnage et al., 1998). Estas proteínas parecen secuencialmente de manera dependiente de la fase de crecimiento, antecediendo la síntesis de SAP a la de EA1 (Mignot et al., 2002). En *B. thuringiensis* subs. *galleria*, se describió una proteína de la capa S, SlpA, que es similar a SAP de *B. anthracis*. La proteína CTC de la capa S se describió en *B. thuringiensis* subsp. *finitimus* (número de acceso GenBank AAR23791), y esta proteína es similar a EA1 de *B. anthracis* (Sun et al., 2001). CTC tiene un tamaño molecular de 100 kDa y forma cuerpos paraespóricos durante la fase de esporulación del crecimiento.

40 Xu et al. (2004) describe la presencia de una proteína de 120 kDa en un análisis de SDS-PAGE de una mezcla de cristal/espora de una cepa esporulante de *Bacillus thuringiensis*. Se encontró que el sobrenadante de esta mezcla de cristal/espora, obtenido tras la disolución, centrifugación y diálisis, prolonga la supervivencia de ratones inyectados con una muestra sanguínea infecciosa de *Plasmodium berghei*. La secuencia N-terminal (15 aminoácidos) de la proteína de 120 kDa mostró 100% de homología con la de la proteína de la capa S de *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleria* (dado a conocer en Mesnage et al., 1998). La secuencia nucleotídica del gen que codifica esta proteína no se proporciona, pero se afirma que codifica 821 restos de aminoácidos con un peso molecular deducido de 87,5 kDa. No se ensayó proteína aislada o purificada, ni un hospedante recombinante productor de esta proteína, para determinar la eficacia frente a la infección por *Plasmodium* aquí. También, la cepa a partir de la que se aisló tal mezcla de cristal/espora no se ha depositado o descrito específicamente en este documento.

Sumario de la invención

Se proporcionan en esta invención usos de proteínas ISLP insecticidas caracterizadas por:

- a) ser insecticidas frente a *Epilachna varivestis*, y
- b) tener al menos 70% de identidad de secuencia con la proteína de la capa S de SEC ID NO:2; En otra realización, estas proteínas tienen 80% de identidad de secuencia con la proteína de la capa S de SEC ID No. 2, y tienen un peso molecular de alrededor de 50 a alrededor de 120 kDa.

Se proporcionan aquí también usos de tales proteínas ISLP que tienen al menos 95% de identidad de secuencia con la proteína de SEC ID NO:2.

5 Se proporciona adicionalmente según esta invención una proteína plaguicida ISLP como se define anteriormente, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2 a partir de una posición de aminoácidos entre la posición 1 de aminoácidos y la posición 31 de aminoácidos hasta la posición 863 de aminoácidos, tal como una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2.

10 También se incluye aquí el uso de secuencias de ADN que codifican cualquiera de las proteínas ISLP anteriores para controlar plagas de insectos, y el uso de genes quiméricos que comprenden: a) una secuencia codificante que comprende tal ADN, y b) un promotor que permite la expresión en células vegetales, para controlar plagas de insectos. En una realización, tal gen quimérico comprende una secuencia codificante que es una secuencia de ADN sintética que se ha optimizado para la expresión en una planta hospedante.

En otra realización de esta invención, se proporciona el uso de una planta, semilla o célula vegetal transgénica que comprende el gen quimérico para controlar plagas de insectos, particularmente una planta, semilla o célula de maíz, algodón, soja, arroz, colza, coliflor, y repollo.

15 También se proporciona aquí un método para proteger plantas frente al daño causado por plagas de insectos de plantas que se alimentan de la especie vegetal a la que pertenecen dichas plantas, que comprende la etapa de expresar cualquiera de los genes quiméricos anteriores en células de dichas plantas; así como un método para obtener una planta protegida frente al daño causado por plagas de insectos de plantas, que se alimentan de la especie vegetal a la que pertenecen dichas plantas, que comprende la etapa de transformar una célula vegetal con  
20 cualquiera de los genes quiméricos anteriores.

También se proporciona aquí el uso anterior de la proteína ISLP anterior, en el que dicha proteína se produce en una planta, o el uso de cualquiera de los genes quiméricos anteriores, en el que el gen quimérico se expresa en una planta.

25 También se proporciona aquí un procedimiento para aislar proteínas insecticidas tóxicas frente a *Epilachna varivestis*, comprendiendo tal procedimiento la etapa de identificar cultivos de bacilos insecticidas en busca de genes de la proteína de la capa S, en el que tales genes se reconocen usando tecnología de PCR y cebadores específicos para las regiones de homología de la capa S en SEC ID NO: 1, en el que dichas regiones de homología de la capa S son las regiones en SEC ID NO: 1 que codifican las siguientes regiones en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2: la región desde la posición 34 a 76 de aminoácidos, la región desde la posición 95 a 136 de aminoácidos, y la  
30 región desde la posición 162 de aminoácidos hasta la posición 198 de aminoácidos, en el que dichos genes de la proteína de la capa S se transforman en bacterias, y dichas bacterias se identifican en busca de la expresión de la proteína de la capa S, y las bacterias o las proteínas de la capa S purificadas o semipurificadas se ensayan para determinar la actividad frente a *E. varivestis*, y tal procedimiento en el que dichos bacilos son negativos para los genes Cry o VIP en el análisis de PCR.

35 También se proporciona aquí un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a la proteína de SEC ID No. 2 y una proteína insecticida que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 2, en el que dicha proteína es insecticida frente a *Epilachna varivestis*.

#### Descripción detallada de realizaciones de la invención

40 La presente invención proporciona métodos y medios para reducir daño a plantas provocadas por plagas de insectos, tales como plagas de insectos lepidópteros o coleópteros. Se proporcionan aquí nuevas secuencias de ácidos nucleicos y proteínas que son diferentes de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas descritas previamente. Estos ácidos nucleicos y proteínas se pueden usar para controlar plagas tales como plagas de insectos, por ejemplo mediante integración y expresión de al menos una de estas nuevas secuencias nucleotídicas  
45 en plantas o células vegetales, o mediante tratamiento externo de plantas o partes de plantas con composiciones que comprenden las toxinas codificadas por estas moléculas de ácidos nucleicos.

La presente invención proporciona nuevas toxinas plaguicidas derivadas de cepas bacterianas, y su uso para controlar plagas de insectos.

50 Según esta invención, una "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ADN o ARN, en forma mono- o bicatenaria, que codifica cualquiera de las proteínas ISLP de esta invención. La expresión "secuencia de ácido nucleico aislada", como se usa aquí, no está limitada a una secuencia de ácido nucleico en aislamiento, sino también engloba una secuencia de ácido nucleico que ya no está en el entorno natural a partir del que se aísla. De este modo, un (una) "(secuencia de) ácido nucleico ISLP aislado" o un (una) "(secuencia de) proteína ISLP aislada", según esta invención, incluye la (secuencia de) ácido nucleico o proteína en otro hospedante bacteriano, en  
55 comparación con el organismo original, o en un genoma nuclear vegetal.

Según la presente invención, los términos “proteína” o “polipéptido” se usan de forma intercambiable para referirse a una molécula que consiste en una cadena de aminoácidos, sin referencia a ningún modo específico de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen. Por tanto, un fragmento o porción de una proteína ISLP de la invención todavía se denomina aquí como una “proteína”. La frase “proteína aislada”, como se usa aquí, no está limitada a una proteína en aislamiento, sino también engloba una proteína que ya no está en su entorno natural. El entorno natural de la proteína se refiere al entorno en el que la proteína se podría encontrar en la naturaleza, es decir, en la cepa a partir de la que se aisló originalmente la secuencia nucleotídica. Por ejemplo, una proteína aislada puede estar presente *in vitro*, o en otro hospedante bacteriano o en una célula vegetal, o se puede segregar a partir de otro hospedante bacteriano o a partir de una célula vegetal.

Según esta invención, se han aislado y caracterizado secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo secuencias de ADN, que codifican nuevas proteínas ISLP, y se obtienen artificialmente mediante síntesis de ADN nuevas formas. Un gen ISLP específico descrito aquí se denominó *islp1* y su proteína codificada ISLP1.

Como se usa aquí, una “ISLP” o “proteína ISLP” es una proteína plaguicida, particularmente una proteína insecticida, de alrededor de 40 a alrededor de 250 kDa, particularmente de alrededor de 50 a alrededor de 120 kDa, o entre alrededor de 60 y alrededor de 100 kDa, especialmente una proteína de alrededor de 80 o alrededor de 100 kDa, aislada o derivada de bacterias, preferiblemente bacilos, con al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, preferiblemente al menos 85 ó 90%, de identidad de secuencia o similitud de secuencia con una proteína de la capa S conocida, por ejemplo la proteína CTC2 de *B. thuringiensis* CTC (número de acceso GenBank AAR23791), y cualesquiera fragmentos tóxicos (como se definen aquí) o sus variantes tales como preproteínas, formas maduras, o fusiones a péptidos señal, a proteínas marcadoras seleccionables, o a otras proteínas plaguicidas o insecticidas. Las variantes de proteínas ISLP, como se usan aquí, incluyen proteínas plaguicidas, preferiblemente insecticidas, inmunológicamente relacionadas con una proteína ISLP, de manera que son reconocidas por anticuerpos que reconocen ISLPs. Las ISLPs de esta invención se originan preferiblemente a partir de o se encuentran en bacterias de la clase de bacilos con la división de Firmicutes. En otra realización de esta invención, las ISLPs de esta invención se originan a partir de o se encuentran en bacterias del orden Bacillales. En todavía otra realización de esta invención, las ISLPs de esta invención se originan a partir de o se encuentran en bacterias de la familia Bacillaceae. En una realización adicional de esta invención, las ISLPs se originan a partir de o se encuentran en bacterias del grupo *Bacillus cereus*, o en bacterias del género *Brevibacillus* o *Bacillus*, preferiblemente *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. anthracis*, *B. licheniformis* y *B. thuringiensis*. Una proteína ISLP según esta invención se puede producir en la fase vegetativa y/o en la fase de esporulación del ciclo de vida bacteriano, y en la naturaleza es típicamente una proteína segregada. Según esta invención, la toxicidad de una proteína ISLP es preferiblemente específica, de manera que la ISLP es tóxica para algunas plagas, preferiblemente insectos, y deja sin afectar a organismos no dianas, tales como mamíferos. En una realización de esta invención, la proteína ISLP no es tóxica para mamíferos, o se degrada fácilmente en sistemas digestivos de mamíferos.

Una “proteína ISLP madura”, como se usa aquí, se refiere a una proteína ISLP de esta invención que carece de su péptido señal bacteriano. Una proteína ISLP, como se usa aquí, puede ser una proteína en el tamaño de longitud completa, o puede ser una forma truncada en tanto que se retenga la actividad plaguicida, por ejemplo insecticida, o de control de plagas, por ejemplo de control de insectos, o puede ser una combinación de varias proteínas o dominios proteicos en una proteína híbrida o de fusión.

Como se proporciona aquí, una proteína ISLP es una proteína plaguicida, particularmente una proteína insecticida, específicamente tóxica para algunas plagas, preferiblemente insectos, que es capaz de formar estructuras cristalinas tales como conjuntos cristalinos o capas S en el exterior de una célula bacteriana en la naturaleza. En una realización de la invención, tales ISLPs pueden aislarse o copurificarse a menudo en un procedimiento para aislar preparaciones de cristales/esporas bacterianas, por ejemplo *Bacillus thuringiensis* (Bt), aunque no tienen identidad de secuencia significativa, preferiblemente menos de 40%, menos de 30% o menos de 20% de identidad de secuencia, con toxinas plaguicidas o insecticidas bacterianas conocidas tales como las proteínas Cry, VIP o Cyt de *Bacillus thuringiensis* (véase Crickmore et al., 1998 y 2005) o con otras proteínas bacterianas plaguicidas o insecticidas conocidas, tales como Bt. Estas ISLPs se encuentran en el lado exterior de la pared celular bacteriana en la naturaleza, y pueden ser liberadas en el entorno de la bacteria o esporas en la esporulación.

En una realización, una ISLP es una proteína plaguicida, particularmente insecticida, que comprende tres regiones de homología de la capa S (SLH), teniendo cada una de tales regiones al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, particularmente al menos 85 ó 90%, de identidad o similitud de secuencia con las regiones de homología de la capa S en SEC ID NO: 2. Las “regiones de homología de la capa S” de la proteína ISLP de SEC ID NO: 2, como se usa aquí, son las regiones de la posición 34 a 76 de aminoácidos, la región de la posición 95 a 136 de aminoácidos, y la región de la posición 162 de aminoácidos a la posición 198 de aminoácidos en SEC ID NO: 2.

También se proporciona aquí el uso de proteínas ISLP, como se define aquí, para controlar o exterminar plagas, tales como insectos, tal como sembrando semillas o plantando plantas que expresan una proteína ISLP en un campo, o aplicando proteínas ISLP en plantas o animales para protegerlos de las plagas, tales como insectos. También se proporcionan procedimientos para mejorar la productividad del campo o potenciar la productividad del cultivo, que comprenden la etapa de hacer crecer un cultivo que comprende un ADN que codifica una proteína ISLP de la invención.

Según esta invención, se proporciona un procedimiento para aislar proteínas ISLP a partir de bacilos. En una realización, los bacilos se hacen crecer sin, o sin demasiadas, etapas de subcultivo antes de aislar las proteínas ISLP, puesto que el subcultivo prolongado puede disminuir la producción de proteínas ISLP. Como alternativa, los bacilos a partir de los cuales se van a aislar las ISLPs se pueden hacer crecer en una plaga susceptible, preferiblemente plaga de insectos, por ejemplo aplicándolas en su sistema digestivo o hemolinfa. Las proteínas ISLP producidas por los bacilos se pueden aislar entonces de la plaga, tal como un insecto, por ejemplo de su tripa o hemolinfa, preferiblemente de aquellas plagas o insectos que murieron o mostraron una gran inhibición del crecimiento tras la aplicación de bacterias productoras de ISLP. En tal procedimiento, las bacterias productoras de ISLPs muy tóxicas para cierta plaga diana, tal como una plaga de insectos, se identificarán fácilmente por sus efectos obvios sobre esa plaga diana. También, una plaga diana preferida y un entorno de plaga diana *in vivo* pueden inducir mayores niveles de proteínas ISLP. A menudo, las proteínas ISLP se pueden aislar de las bacterias, tal como a partir del sobrenadante de cultivo, particularmente en cultivos esporulantes, tras la centrifugación, o como proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* se enriquecen y aíslan típicamente. Como se usa aquí, el término "bacilos" se refiere a bacterias con forma de varilla. Éstas incluyen bacterias de Bacilli, Bacillales o Bacillaceae, tales como bacterias del grupo *Bacillus cereus*, o bacterias del género *Bacillus*, por ejemplo *Bacillus thuringiensis*.

En una realización de esta invención, se proporciona un procedimiento para aislar nuevas proteínas ISLP plaguicidas, preferiblemente insecticidas, particularmente proteínas ISLP tóxicas para insectos lepidópteros o coleópteros. Tal procedimiento comprende la etapa de identificar cultivos de bacilos, preferiblemente Bt, plaguicidas, preferiblemente insecticidas, para genes con elevada similitud de secuencia con ISLPs, particularmente en cepas de bacilos plaguicidas, por ejemplo insecticidas, preferiblemente cepas de Bt, negativas para genes Cry o VIP en el análisis de PCR, particularmente en cepas que muestran toxicidad específica para algunas plagas, preferiblemente insectos, pero no para otras. Tales genes con elevada similitud de secuencia se reconocerán usando tecnología de PCR y cebadores específicos de las ISLP, tales como cebadores dirigidos a las regiones de homología de la capa S de las proteínas ISLP, por ejemplo las regiones de homología de la capa S de ISLP1. El gen correspondiente se puede aislar entonces, y la nueva proteína ISLP se puede producir mediante tecnología de expresión recombinante.

"kDa", como se usa aquí, se refiere al tamaño en kiloDalton del peso molecular de una proteína. "kDa", como se usa aquí con el término alrededor de, o refiriéndose a un número aproximado ("alrededor de 80 kDa"), se refiere al peso molecular observado en SDS-PAGE/transferencia Western estándar de una proteína cuando se compara con patrones de peso molecular. SDS-PAGE/transferencia Western se lleva a cabo usando tecnología estándar. Preferiblemente, la proteína o fragmento proteico se confirma como una proteína ISLP por medio de una reacción cruzada inmunológica (por ejemplo, transferencia Western) o mediante sus características (por ejemplo, características proteicas típicas de proteínas de la capa S o sus fragmentos).

"Proteína de la capa S", o "proteína de la capa superficial", como se usa aquí, se refiere a una proteína segregada a partir de la célula que la produce y capaz de formar un conjunto cristalino o red en la superficie de procariontes, particularmente bacterias. Tal red se forma mayoritariamente mediante autoensamblaje de subunidades proteicas en la superficie de la procarionte, de manera que se forman capas cristalinas planas. Los ejemplos son las proteínas de la capa S descritas por Luckevich y Beveridge (1989), Sleytr y Beveridge (1999), y Mesnage et al. (2001), particularmente la proteína de la capa S de la cepa CTC de Bt, número de acceso de GenBank AAR23791.

Un ejemplo de una proteína ISLP es la "proteína ISLP1", que se refiere a cualquier proteína que comprende el fragmento tóxico más pequeño de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 que retiene actividad insecticida (en lo sucesivo denominado el "fragmento tóxico de ISLP1 más pequeño"), particularmente cualquier proteína insecticida que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 desde un aminoácido entre la posición 1 de aminoácidos y la posición 31 de aminoácidos hasta la posición 863 de aminoácidos, o cualquier proteína insecticida que comprenda la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 desde un aminoácido entre la posición 1 de aminoácidos y la posición 531 de aminoácidos hasta la posición 863 de aminoácidos, o cualquier proteína insecticida que comprenda la secuencia de aminoácidos del fragmento insecticida de digestión con proteasa, particularmente digestión con tripsina, a partir de la proteína de SEC ID NO: 2, particularmente una proteína de alrededor de 30, alrededor de 40, alrededor de 50 o alrededor de 60 kDa obtenida mediante digestión con tripsina a partir de la proteína madura de SEC ID NO: 2. Se incluye aquí una fusión de la proteína ISLP1 con un péptido señal vegetal, tal como un péptido de tránsito de cloroplasto, para obtener una proteína de fusión. Esto incluye proteínas híbridas o quiméricas que comprenden el fragmento tóxico más pequeño de la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2. Se incluye en la proteína ISLP1, como se usa aquí, un fragmento proteolítico insecticida, preferiblemente un fragmento de digestión con tripsina, de la proteína de SEC ID NO: 2, o cualquier fragmento insecticidamente eficaz de la proteína de SEC ID NO: 2, así como sus variantes o equivalentes que tienen aminoácidos suprimidos, añadidos o sustituidos mientras todavía retienen toda o la mayoría de la actividad insecticida de la proteína ISLP1. También se incluye aquí una proteína ISLP1 madura, que carece de su péptido señal, o que tiene el péptido señal sustituido por una metionina o por un dipéptido Met-Ala o Met-Asp.

También están incluidas en estas definiciones las variantes de la secuencia de aminoácidos en SEC ID NO: 2, tal como secuencias de aminoácidos esencialmente similares a SEC ID NO: 2, que tienen una identidad de secuencia de al menos 70%, o al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% a nivel de la secuencia de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, "la identidad de secuencia" se puede determinar usando alineamientos por parejas usando el programa GAP del paquete de Wisconsin GCG (Madison, Wisconsin, USA,

versión 10.2). El programa GAP se usa con los siguientes parámetros para las comparaciones de las secuencias de aminoácidos: la matriz de puntuación “blosum62”, una “penalización de creación de salto” (o “peso de salto”) de 8 y una “penalización de extensión del salto” (o “peso de longitud”) de 2. Las proteínas insecticidas según la presente invención pueden tener ciertos aminoácidos añadidos, sustituidos o suprimidos sin cambiar significativamente, o sin disminuir, la actividad insecticida de la proteína.

Como se usa aquí, la expresión “que comprende” se ha de interpretar como especificando la presencia de rasgos señalados, números enteros, etapas o componentes como se refieren, pero no excluye la presencia o adición de uno o más rasgos, números enteros, etapas o componentes, o sus grupos. De este modo, la referencia aquí a ADN o proteína “que comprende la secuencia o región X” se refiere a un ADN o proteína que incluye o que contiene al menos la secuencia o región X, de manera que se pueden incluir otras secuencias nucleotídicas o de aminoácidos en el extremo 5' (o N-terminal) y/o 3' (o C-terminal). Por ejemplo, una secuencia nucleotídica puede comprender la secuencia nucleotídica que codifica un péptido de tránsito, y/o una secuencia líder de 5' o 3'.

Un “fragmento tóxico” de una proteína ISLP, como se usa aquí, es un fragmento o porción de una proteína ISLP que retiene parte o toda, preferiblemente la mayoría, de la toxicidad de la proteína ISLP plaguicida, preferiblemente insecticida, madura. Típicamente, tal fragmento tóxico se obtiene mediante escisión del péptido señal o mediante digestión enzimática de la proteína ISLP madura o de longitud completa, por ejemplo mediante digestión con enzimas del intestino de la plaga, preferiblemente insecto, tales como tripsina, quimiotripsina, u otras proteasas activas en un sistema digestivo de la plaga diana, tales como las enzimas digestivas del intestino medio de los insectos diana. Típicamente, tal fragmento tóxico tiene un peso molecular de alrededor de 40 a alrededor de 80 kDa, preferiblemente alrededor de 50 o alrededor de 60 kDa. Un fragmento tóxico de la proteína ISLP1 de esta invención es un fragmento de digestión con tripsina de alrededor de 50 kDa. El “fragmento tóxico más pequeño” de una proteína ISLP es el fragmento tóxico más pequeño de la proteína ISLP. Tal fragmento tóxico más pequeño se puede obtener mediante escisión enzimática o mediante expresión de ADN de *isl/p* con supresiones nucleotídicas. El ADN que codifica los fragmentos de ISLP tóxicos también se puede sintetizar químicamente. De este modo, los fragmentos tóxicos obtenibles a partir de la transcripción y traducción de ADN sintético se incluyen en la definición de fragmento tóxico. Cualquier proteína que comprenda el fragmento tóxico más pequeño de ISLP es útil en esta invención, y no sólo la proteína ISLP original o madura, puesto que las secuencias de aminoácidos no necesarias para la toxicidad se pueden suprimir o se pueden sustituir por otras secuencias mientras que retiene las características de la proteína ISLP.

Los fragmentos tóxicos de las proteínas ISLP también se pueden obtener mediante la ruptura y solubilización de las proteínas ISLP en el momento de la autólisis de las bacterias, por ejemplo en un sistema digestivo de la plaga, tal como en el intestino medio de los insectos, o con la esporulación en cultivos *in vitro*. Aparecen fragmentos más pequeños, más solubles, que todavía son inmunológicamente detectados con anticuerpos anti-ISLP, y se pueden identificar o aislar tras la autólisis usando tecnologías habituales tales como purificación mediada por anticuerpos.

Una “plaga diana”, como se usa aquí, es una plaga, preferiblemente insecto, que se puede exterminar o se puede ver afectado negativamente (por ejemplo, su crecimiento se inhibe) mediante una ISLP. Esta plaga o insecto muestra toxicidad por encima de los niveles de control, cuando se infecta o alimenta con bacterias productoras de esta proteína ISLP, o cuando se alimenta con dieta que contiene proteína ISLP aislada.

Los insectos diana lepidópteros posibles para proteínas ISLP de la invención incluyen, pero no se limitan a, gusano helotero (*Helicoverpa zea*), gusano cogollero (*Helicoverpa armigera*), Isoca (*Helicoverpa punctigera*), gusano del capullo del tabaco (*Heliothis virescens*), taladrador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*), cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), oruga grasienta (*Agrotis ipsilon*), lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*), barrenador de tallos amarillo (*Scirphophaga incertulas*), gusano doblador de las hojas del arroz (*Cnaphalocrocis medinalis*), taladrador de tallos rosa (*Sesamia inferens*), taladrador de tallos manchado del maíz (*Chilo partellus*), oruga de terciopelo (*Anticarsia gemmatalis*), oruga medidora de soja (*Pseudoplusia includens*), taladrador de la vaina (*Epinotia aporema*), y *Rachiplusia un.*

Otros insectos diana posibles para las proteínas ISLP de la invención se seleccionan de la lista que consiste en: *Plathypena scabra*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera ornithogalli*, *Chilo suppressalis*, *Hereitogramma licarisalis*, *Naranga aenescens*, *Mycalasis gotama*, *Marasmia patnalis*, *Marasmia exigua*, *Marasmia ruralis*, *Nymphula depunctalis*, *Scirphophaga innotata*, *Spodoptera litura*, *Chilo polychrysus*, *Rupela albinella*, *Diatraea saccharalis*, *Spodoptera frugiperda*, *Mythimna unipuncta*, *Chilo zacconius* y *Pamara guttata*, *Agelastica alni*, *Hypera postica*, *Hypera brunneipennis*, *Haltica tombacina*, *Anthonomus grandis*, *Tenebrio molitor*, *Triboleum castaneum*, *Dicladispa armigera*, *Trichispa serica*, *Oulema oryzae*, *Colaspis brunnea*, *Lissorhynchus oryzophilus*, *Phyllotreta cruciferae*, *Phyllotreta striolata*, *Psylliodes punctulata*, *Entomoscelis americana*, *Meligethes aeneus*, *Ceutorynchus sp.*, *Psylliodes chrysocephala*, *Phyllotreta undulata*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata*, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, *Diabrotica barberi*, y *Diabrotica virgifera*.

Como se usa aquí, el término “ADN de *isl/p*” o “ADN de ISLP” se refiere a cualquier ADN que codifica una proteína ISLP, tal como un ADN que codifica la “proteína ISLP1” como se define anteriormente, por ejemplo el ADN de *isl/p1* mostrado en SEC ID NO: 1, particularmente desde la posición nucleotídica 325 hasta la posición nucleotídica 2913, preferiblemente desde la posición nucleotídica 412 hasta la posición nucleotídica 2913. Esto incluye secuencias de

ADN de origen natural, artificiales, o sintéticas que codifican la proteína de SEC ID NO: 2, o sus fragmentos tóxicos o variantes como se definen anteriormente. También se incluyen aquí secuencias de ADN que codifican proteínas insecticidas, que son suficientemente similares a un ADN que codifica una proteína ISLP de la invención de manera que se pueden hibridar (es decir, tienen la capacidad de hibridarse) a estas secuencias de ADN en condiciones de hibridación restrictivas.

También se incluyen en la invención cualesquiera promotores de los genes *islp* aislados según esta invención, y su uso, por ejemplo la región promotora de ADN de *islp1* de SEC ID NO: 1, que puede proporcionar promotores poderosos para la expresión bacteriana. El promotor del ADN de *islp1* como se usa aquí comprende la SEC ID NO: desde la posición nucleotídica 1 hasta la posición nucleotídica 324.

“Condiciones de hibridación restrictivas”, como se usa aquí, se refiere particularmente a las siguientes condiciones: inmovilización del ADN pertinente en un filtro, y prehibridación de los filtros durante 1 a 2 horas en 50% de formamida, 5% de SSPE, 2x de reactivo de Denhardt y 0,1% de SDS a 42°C, o 1 a 2 horas en 6x SSC, 2x de reactivo de Denhardt y 0,1% de SDS a 68°C. La sonda marcada (con digoxigenina o radiomarcada) desnaturalizada se añade entonces directamente al fluido de prehibridación, y la incubación se lleva a cabo durante 16 a 24 horas a la temperatura apropiada mencionada anteriormente. Tras la incubación, los filtros se lavan entonces durante 30 minutos a temperatura ambiente en 2x SSC, 0,1% de SDS, seguido de 2 lavados de 30 minutos cada uno a 68°C en 0,5 x SSC y 0,1% de SDS. Se establece una autorradiografía al exponer los filtros durante 24 a 48 horas a una película de rayos X (Kodak XAR-2 o equivalente) a -70°C con un filtro intensificador (20x SSC = NaCl 3M y citrato de sodio 0,3M; 100x reactivo de Denhardt = 2% (p/v) de seroalbúmina bovina, 2% (p/v) de Ficoll™ y 2% (p/v) de polivinilpirrolidona; SDS = dodecilsulfato de sodio; 20x SSPE = NaCl 3,6M, fosfato de sodio 0,2M y EDTA 0,02M pH 7,7). Un experto normal en la técnica será capaz fácilmente de modificar las condiciones particulares y parámetros especificados anteriormente a la vez que retiene las condiciones de hibridación restrictivas deseadas.

Hay muchos enfoques conocidos en la técnica para el aislamiento de variantes de las secuencias de ADN de la invención. Por ejemplo, las variantes se pueden detectar y aislar a partir de cepas bacterianas, por ejemplo bacilos, particularmente *Bacillus* spp., mediante hibridación como se describe *más arriba*, y/o mediante tecnología de PCR, como se conoce en la técnica. Se pueden obtener cebadores específicos o degenerados para las regiones de las secuencias de ADN de *islp*, y se pueden usar para amplificar variantes de cepas bacterianas conocidas o nuevas.

Las variantes del ADN de *islp* de la invención incluyen secuencias de ADN que codifican las variantes de la proteína ISLP descritas anteriormente, o una secuencia de ADN, que codifica una proteína insecticida, con al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, 80% o 90%, de identidad de secuencia con un ADN de *islp* de la invención, por ejemplo SEC ID NO: 1, preferiblemente desde la posición nucleotídica 412 hasta la posición nucleotídica 2913. Las identidades de secuencia citadas se calculan usando el programa GAP del paquete de GCG de Wisconsin (Madison, Wisconsin, USA, versión 10.2). El programa GAP se usa con los siguientes parámetros ácidos nucleicos: la matriz de puntuación “nwgsgapdna”, una “penalización de creación de salto” (o “peso de salto”) de 50 y una “penalización de extensión de salto” (o “peso de longitud”) de 3. Las condiciones de hibridación restrictivas son como se definen anteriormente.

“Actividad insecticida” se una proteína ISLP, como se usa aquí, significa la capacidad de tal proteína para exterminar insectos cuando tal proteína se alimenta a insectos, preferiblemente mediante expresión en un hospedante recombinante tal como una planta. Se entiende que una proteína tiene actividad insecticida si tiene la capacidad de exterminar el insecto durante al menos una de sus etapas de desarrollo, preferiblemente la etapa larvaria.

“Cantidades que controlan insectos” de una proteína, como se usa aquí, se refiere a una cantidad de proteína que es suficiente para limitar el daño en una planta, provocado por insectos en cualquier etapa de desarrollo (por ejemplo, larvas de insecto) que se alimentan de tal planta, hasta niveles comercialmente aceptables. Limitar el daño de insectos a una planta puede ser el resultado de, por ejemplo, exterminar los insectos o inhibir el desarrollo, fertilidad o crecimiento de los insectos de tal manera que el insecto inflige menos daño a una planta y el rendimiento de la planta no se ve afectado significativamente de forma adversa. Como se usa aquí, “controlar” insectos significa obtener una inhibición del crecimiento, retraso del desarrollo o inhibición de la fertilidad al menos significativo (por encima de los valores de control) de tales insectos cuando se tratan con la proteína ISLP de la invención.

Según esta invención, los insectos susceptibles a las nuevas proteínas ISLP de la invención se ponen en contacto con esta proteína en cantidades que controlan insectos, preferiblemente cantidades insecticidas. Los insectos diana preferidos para las proteínas de esta invención son plagas de insectos que dañan económicamente de maíz, algodón, arroz, soja, vegetales, plantas de la especie Brassica, Brassica napus, coliflor, zanahoria, guisante, trigo, cebada, centeno, tomate, patata, caña de azúcar, flores de corte, rosas, plantas frutales (manzana, pera, melocotón, fresa, etc.), árboles (tales como álamo y sauce), y lechuga, particularmente en países de Europa, Norteamérica y Sudamérica, Asia y Australia. El término “planta”, como se usa aquí, engloba plantas completas así como partes de plantas, tales como hojas, tallos, semillas, flores o raíces.

“Actividad plaguicida” de una proteína ISLP, como se usa aquí, se refiere a la actividad de una proteína para exterminar, provocar daño, inhibir el crecimiento o afectar negativamente de otro modo a toda o a una parte de una planta u organismo de plaga animal, tal como ciertos artrópodos, nematodos, ácaros, áfidos, moscas, bacterias,

virus, hongos, etc. Una planta u organismo de plaga animal, como se usa aquí, es cualquier organismo vivo que puede provocar daño a una planta o animal, incluyendo seres humanos, al provocar infecciones, enfermedad o muerte a las partes o a toda la planta o animal, o que puede inhibir de otro modo el crecimiento, inutilizando o afectando negativamente a tal planta o animal, preferiblemente estos son organismos más pequeños tales como invertebrados. Un organismo vector capaz de pasar en un organismo de plaga a una planta o animal también se considera un organismo de plaga como se usa aquí, por ejemplo plagas tales como mosquitos o cucarachas.

La secuencia de ácido nucleico, particularmente la secuencia de ADN, que codifica una proteína ISLP de esta invención se puede obtener sintéticamente y se puede insertar en vectores de expresión para producir cantidades elevadas de proteínas ISLP. Las proteínas ISLP se pueden usar para preparar anticuerpos monoclonales o policlonales específicos de una manera convencional (Höfte et al., 1988; Harlow y Lane, 1988).

En una realización de la invención, se proporcionan anticuerpos que se unen específicamente a la proteína ISLP. En particular, se proporcionan anticuerpos monoclonales o policlonales que se unen a una proteína ISLP o a un fragmento o variantes de la misma. También se incluyen fragmentos de anticuerpos monoclonales o policlonales, que retienen la capacidad para unirse a la proteína ISLP o fragmento frente a la cual se provocaron (por ejemplo, anticuerpos monoclonales). Un anticuerpo contra una proteína ISLP se puede preparar usando la proteína ISLP como antígeno en un animal (tal como conejo o ratón), usando métodos conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para preparar anticuerpos incluyen aquellos descritos en Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998); y en Liddell y Cryer "A Practical Guide to Monoclonal Antibodies" (Wiley and Sons, 1991). Los anticuerpos se pueden usar para aislar, identificar, caracterizar o purificar la proteína ISLP a la que se unen. Por ejemplo, el anticuerpo se puede usar para detectar la proteína ISLP en una muestra, al permitir que el anticuerpo y la proteína formen un inmunocomplejo, y detectando la presencia del inmunocomplejo, por ejemplo mediante ELISA o inmunotransferencias.

En una realización adicional de la invención, se proporcionan cebadores de PCR y/o sondas, y kits para detectar las secuencias de ADN de ISLP. Los pares de cebadores de PCR (en los que cada cebador tiene al menos 15 a 25, preferiblemente al menos 18 a 20 nucleótidos en longitud) para amplificar el ADN de ISLP optimizado para la planta de esta invención a partir de muestras se pueden sintetizar basándose en la secuencia de la ISLP, por ejemplo la secuencia de ISLP1, mediante métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Dieffenbach y Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; y McPherson et al. (2000) PCR - Basics: From Background to Bench, Primera Edición, Springer Verlag, Alemania). Igualmente, como sondas de hibridación se pueden usar fragmentos de ADN de la secuencia de SEC ID NO: 1, particularmente partes de regiones con homología elevada en varias proteínas de la capa S bacteriana, preferiblemente bacilos, tales como la región SLH (Mesnage et al., 2001, Microbiology 147, 1343-1351), tal como la región SLH de ISLP1 descrita anteriormente. Un kit de detección de ISLP puede comprender cebadores específicos de ISLP o sondas específicas de ISLP, y un protocolo asociado para usar los cebadores o sonda para detectar ADN de ISLP en una muestra. Por ejemplo, tal kit de detección se puede usar para determinar si una planta se ha transformado con un gen que codifica una proteína ISLP (o parte de la misma) de la invención.

Debido a la degeneración del código genético, algunos codones de aminoácidos se pueden sustituir por otros sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Además, algunos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos equivalentes sin cambiar, o sin cambiar significativamente, la actividad plaguicida, preferiblemente insecticida, de la proteína, o al menos sin disminuir la actividad plaguicida, preferiblemente insecticida, de la proteína. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos incluyen intercambiar aminoácidos en las categorías: básicos (por ejemplo Arg, His, Lys), ácidos (por ejemplo Asp, Glu), no polares (por ejemplo Ala, Val, Trp, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp, Gly), y polares (por ejemplo Ser, Thr, Tyr, Cys, Asn, Gln). Tales sustituciones en categorías caen dentro del alcance de la invención en tanto que la actividad plaguicida de la proteína ISLP sea sustancialmente la misma, o no disminuya por debajo del nivel necesario para obtener el control de plagas, tal como el control de insectos. Además, las sustituciones de aminoácidos no conservativas caen dentro del alcance de la invención en tanto que la actividad plaguicida de la proteína ISLP sea sustancialmente la misma, o no disminuya. Las variantes o equivalentes de las secuencias de ADN de la invención incluyen secuencias de ADN que codifican una ISLP como se define aquí, que se hibridan a la secuencia de ADN de ISLP de SEC ID NO: 1 en condiciones de hibridación restrictivas. Tales variantes o equivalentes deberían codificar una proteína con las mismas o sustancialmente las mismas características plaguicidas que la proteína de esta invención, mientras que se pueden alterar otras características tales como estabilidad térmica o susceptibilidad a la escisión por proteasas. En algunos casos, puede ser preferido tener disponible una ISLP tóxica con la misma toxicidad o casi similar pero con una menor estabilidad térmica o con una mayor sensibilidad a pepsina, y tales variantes se pueden obtener mediante procedimientos conocidos para mutagénesis al azar y selección, o mediante mutación dirigida al sitio de una proteína ISLP de esta invención, por ejemplo mediante la introducción de sitios de escisión con pepsina en una proteína ISLP (véase el documento WO 02074799). Las variantes o equivalentes, como se usan aquí, también incluyen secuencias de ADN que tienen un uso de codones diferente en comparación con los genes ISLP nativos de esta invención pero que codifican una proteína con la misma actividad plaguicida y con la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de ADN de ISLP se pueden optimizar en los codones adaptando el uso de codones a aquel más preferido en genes vegetales, particularmente a genes nativos al género o especie vegetal de interés, es decir, en los que se desea la expresión de la proteína ISLP usando tablas de uso de codones disponibles (por ejemplo, más adaptadas con respecto a la expresión en algodón, soja, maíz o arroz).

Para la expresión en plantas u otras eucariotas, se evitan, eliminan o reducen en los genes de ISLP de la invención tramos largos de nucleótidos AT o GC (por ejemplo, tramos de 6 o más nucleótidos A o T, o tramos de 6 o más nucleótidos G o C), y se pueden introducir sitios de restricción adecuados.

5 Además, el término N de una proteína ISLP se puede modificar para que tenga un contexto de iniciación de la traducción óptimo, añadiendo o suprimiendo de ese modo uno o más aminoácidos en el N-terminal de la proteína. En la mayoría de los casos, se prefiere que las proteínas de la invención a expresar en células vegetales comiencen con un dipéptido Met-Asp o Met-Ala para el inicio de la traducción óptimo, requiriendo por tanto algunas veces la inserción en el ADN de *ISLP* de un codón que codifica un aminoácido Asp o Ala en dirección 3' del codón de partida como un nuevo segundo codón (si tal segundo codón ya no es Ala o Asp).

10 Las secuencias de ADN también se pueden modificar para eliminar sitios de ajuste ilegítimos o señales de terminación de la transcripción. Puesto que los genes bacterianos pueden contener motivos que son reconocidos en otros hospedantes, específicamente en hospedantes eucariotas tales como plantas, como sitios de ajuste de 5' o 3' o señales de terminación de la transcripción, la transcripción en esos otros hospedantes puede ser ineficaz o se puede terminar prematuramente. Los sitios de ajuste ilegítimos o señales de terminación de la transcripción se pueden identificar mediante análisis a base de ordenador de las secuencias de ADN y/o mediante análisis de PCR como se conoce en la técnica.

20 Dependiendo del fin particular, se puede construir cualquier secuencia de ADN que difiera en su uso de codones pero que codifique la misma proteína o una proteína similar con sustancialmente la misma actividad plaguicida. Se ha descrito en sistemas de expresión de procariontes y eucariotas que el cambio el uso de codones por el de la célula hospedante tiene beneficios para la expresión génica en hospedantes extraños (Bennetzen y Hall, 1982; Itakura et al., 1977). Existen tablas de uso de codones en la bibliografía (Wada et al., 1990; Murray et al., 1989) y en las bases de datos de secuencias de ADN principales (por ejemplo EMBL en Heidelberg, Alemania), y como se describe por Nakamura et al (2000). En consecuencia, un experto normal en la técnica puede construir fácilmente secuencias de ADN sintéticas de manera que se produzcan las mismas proteínas o sustancialmente las mismas proteínas. Es evidente que se pueden obtener secuencias de ADN alternativas una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos de las proteínas ISLP de esta invención. Tales secuencias de ADN alternativas incluyen secuencias de ADN sintéticas o semisintéticas que se han cambiado a fin de inactivar ciertos sitios en el gen. Esta inactivación se puede lograr, por ejemplo, adaptando el uso de codones global al de un organismo hospedante más relacionado, tal como el del organismo hospedante en el que se desea la expresión. En la bibliografía de patentes y científica se pueden encontrar varias técnicas para modificar el uso de codones a aquel preferido por las células hospedantes. El método exacto de la modificación del uso de codones no es crítico para esta invención en tanto que la mayoría o todas las secuencias reguladoras crípticas o elementos de procesamiento (tales como señales de poliadenilación vegetales y sitios de ajuste) se hayan sustituido por otras secuencias, y preferiblemente el contenido de AT de la región codificante se aproxime al del organismo hospedante.

35 Se pueden realizar de forma habitual modificaciones pequeñas a la secuencia de ADN tal como se describe anteriormente, por ejemplo mediante mutagénesis mediada por PCR (Ho et al., 1989, White et al., 1989). Se pueden realizar de forma habitual modificaciones más sustanciales a la secuencia de ADN mediante síntesis de ADN *de novo* de una región codificante deseada usando técnicas disponibles.

40 La frase "sustancialmente la misma", cuando se usa aquí, en referencia a la secuencia de aminoácidos de una proteína ISLP, se refiere a una secuencia de aminoácidos que difiere no más de 5%, o no más de 2%, de la secuencia de aminoácidos de la proteína con la que se compara (para la región de la misma longitud, si la proteína es más pequeña). Cuando se hace referencia a la toxicidad de una proteína ISLP, la frase "sustancialmente la misma" se refiere a una proteína cuyo valor LC<sub>50</sub> media difiere en no más de un factor de 2 a 5, preferiblemente 2, del valor LC<sub>50</sub> media obtenido para la proteína con la que se compara. En este contexto, "LC<sub>50</sub> media" es la concentración de proteína que provoca 50% de mortalidad de la población de ensayo, calculado a partir de tres bioensayos independientes llevados a cabo usando las mismas condiciones de bioensayo. Los valores de LC<sub>50</sub> se calculan con análisis de probitos, usando el programa POLO PC (de LeOra Software, 1987, Berkely, California). Se entiende que los límites de confianza del 95% (o 90%) (un parámetro asociado calculado con el análisis de probitos) se calculan para los valores de LC<sub>50</sub> de cada una de las dos proteínas a comparar, a fin de determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa en los valores de LC<sub>50</sub>. En una realización de esta invención, la toxicidad de las dos proteínas se ve como sustancialmente la misma si – en el mismo montaje experimental o en un montaje experimental comparable que usa los controles apropiados – los límites de confianza se solapan, y es sustancialmente diferente si los límites de confianza no se solapan.

55 Las secuencias de ADN de *ISLP* de la invención, preparadas a partir de ADN total, se pueden ligar en vectores de expresión adecuados y se pueden transformar en una cepa bacteriana, tal como *E. coli* u otra cepa bacteriana, preferiblemente en otros bacilos tales como en *Bacillus thuringiensis*. En una realización de la invención, para la expresión en bacterias, se incluye en el constructo de ADN un ADN que codifica el péptido señal bacteriano de la proteína ISLP u otro péptido señal bacteriano adecuado (por ejemplo, aquel que se origina a partir de una proteína segregada obtenida mediante la célula hospedante). Los clones se pueden identificar entonces mediante métodos de inmunosondaje de colonias convencionales (French et al., 1986) en busca de la expresión de la toxina con anticuerpos monoclonales o policlonales provocados contra las proteínas ISLP.

Los clones bacterianos se pueden identificar en busca de la producción de proteínas ISLP (el lisado celular o sobrenadante se puede hacer pasar en geles de SDS-PAGE usando métodos estándar, y se pueden llevar a cabo procedimientos estándar de transferencia western), o las bacterias o la proteína de ISLP purificada o semipurificada se pueden ensayar en busca de su actividad plaguicida en comparación con bacterias de control usando métodos conocidos en la técnica o descritos aquí más abajo. Los clones también se pueden analizar en busca de la presencia de ARNm que codifica la proteína ISLP, usando principales de PCR estándar, tales como RT-PCR.

Los genes que codifican las proteínas ISLP de esta invención se pueden secuenciar de manera convencional (Maxam y Gilbert, 1980; Sanger, 1977) para obtener la secuencia de ADN.

Las comparaciones de secuencias indican que los genes *islp* son diferentes de los genes previamente descritos que codifican toxinas bacterianas plaguicidas, particularmente insecticidas, y pertenecen a una nueva clase de genes que codifican proteínas plaguicidas o insecticidas con identidad de secuencia significativa con proteínas de la capa S bacterianas, preferiblemente bacilos.

Una parte plaguicidamente eficaz de las secuencias de ADN, que codifican una porción plaguicidamente eficaz de las proteínas ISLP recientemente identificadas, se puede obtener de manera convencional tras el análisis de secuencia del gen. La secuencia de aminoácidos de las proteínas ISLP se puede determinar a partir de la secuencia del ADN aislado. La frase “una parte plaguicidamente eficaz (o porción o fragmento)” de una secuencia de ADN que codifica la proteína ISLP, también denominada aquí como “gen truncado” o “ADN truncado”, como se usa aquí, se refiere a una secuencia de ADN que codifica un fragmento tóxico de una proteína ISLP como se define aquí.

A fin de expresar toda o una parte plaguicidamente eficaz de una secuencia de ADN que codifica una proteína ISLP de esta invención en *E. coli*, en otras cepas bacterianas, o en plantas, se pueden introducir sitios de restricción adecuados, que flanquean a la secuencia de ADN. Esto se puede hacer mediante mutagénesis dirigida al sitio, usando procedimientos bien conocidos (véanse, por ejemplo, Stanssens et al., 1989; White et al., 1989). A fin de obtener una expresión mejorada en plantas, el uso de codones del gen *ISLP* o parte del gen *ISLP* plaguicidamente eficaz de esta invención se puede modificar para formar un gen o parte de gen equivalente, modificado o artificial según las publicaciones PCT WO 91/16432 y WO 93/09218 y las publicaciones EP 0.385.962, EP 0.359.472 y US 5.689.052. Los genes *ISLP* o partes de genes también se pueden insertar en el genoma de plastidios (por ejemplo, cloroplastos) o mitocondrial de una planta, y se pueden expresar allí usando un promotor adecuado (véase, por ejemplo, McBride et al., 1995; US 5.693.507).

Para obtener una expresión potenciada en plantas monocotiledóneas tales como maíz o arroz, también se puede añadir un intrón (por ejemplo, un intrón de monocotiledónea) al gen quimérico. Por ejemplo, se ha demostrado que la inserción del intrón del gen *Adh1* del maíz en la región reguladora de 5' potencia la expresión en maíz (Callis et al., 1987). Igualmente, el intrón HSP70, como se describe en el documento US 5.859.347, se puede usar para potenciar la expresión. La secuencia de ADN del gen *ISLP* o su fragmento tóxico se puede cambiar además de manera traduccionalmente neutra. Tales cambios pueden modificar, posiblemente inhibiendo, las secuencias de ADN presentes en la parte génica por medio de una inserción de intrón dirigida al sitio y/o introduciendo cambios al uso de codones. Los cambios en el uso de codones pueden ser, *por ejemplo*, para adaptar el uso de codones a aquel más preferido por las plantas, particularmente la planta hospedante, sin cambiar, o sin cambiar significativamente, la secuencia de aminoácidos codificada.

Según una realización de esta invención, las proteínas se pueden dirigir hacia orgánulos intracelulares en células vegetales, tales como plastidios (por ejemplo, cloroplastos), mitocondrias, o se pueden segregar a partir de la célula. Para este fin, en una realización de esta invención, los genes quiméricos de la invención comprenden una región codificante que codifica una señal o péptido seleccionador de dianas, preferiblemente una señal vegetal o péptido seleccionador de dianas, enlazado a la región codificante de la proteína ISLP de la invención. Los péptidos que se pueden incluir en las proteínas de esta invención son los péptidos de tránsito para cloroplasto u otra selección de plastidios, tales como regiones de péptidos de tránsito duplicadas de genes vegetales cuyo producto génico es dirigido hacia los plastidios, el péptido de tránsito optimizado de Capellades et al. (US 5.635.618), el péptido de tránsito de ferredoxina-NADP<sup>+</sup> oxidorreductasa de espinaca (Oelmuller et al., 1993), el péptido de tránsito descrito en Wong et al. (1992), y los péptidos seleccionadores de dianas en la solicitud de patente PCT publicada WO 00/26371. Péptidos alternativos incluyen aquellos que señalan la secreción de una proteína enlazada a tal péptido, tal como la señal de secreción del inhibidor II de proteínasa de patata (Keil et al., 1986), la señal de secreción del gen de alfa-amilasa 3 de arroz (Sutliff et al., 1991) y la señal de secreción de la proteína PR1 del tabaco (Cornelissen et al., 1986).

Los péptidos señal útiles según la invención incluyen el péptido de tránsito de cloroplasto (por ejemplo, Van Den Broeck et al., 1985), o el péptido de tránsito de cloroplasto optimizado de los documentos US 5.510.471 y US 5.635.618 que provoca el transporte de la proteína a los cloroplastos, un péptido señal secretor o un péptido que dirige la proteína hacia otros plastidios, mitocondrias, el ER, u otro orgánulo. Las secuencias señal para la selección como dianas hacia orgánulos intracelulares o para la secreción fuera de la célula vegetal o a la pared celular se encuentran en proteínas naturalmente seleccionadas o segregadas, tales como aquellas descritas por Klösgen et al. (1989), Klösgen y Weil (1991), Neuhaus y Rogers (1998), Bih et al. (1999), Morris et al. (1999), Hesse et al. (1989), Tavladoraki et al. (1998), Terashima et al. (1999), Park et al. (1997), Shcherban et al. (1995).

Secuencias señal alternativas incluyen las secuencias de péptidos señal de proteínas seleccionadas o segregadas de maíz, algodón, soja o arroz.

Para permitir la secreción de las proteínas ISLP fuera de la célula hospedante transformada, se puede fusionar un péptido señal de secreción apropiado al extremo aminoterminal (extremo N-terminal) de la proteína ISLP. También, cualquier péptido señal de secreción bacteriano se puede suprimir y sustituir por el dipéptido Met-Ala o Met-Asp, o por otro péptido señal, tal como un péptido señal de secreción vegetal como se describe anteriormente. Particularmente, los aminoácidos 1 a 29 de las proteínas ISLP de la invención, por ejemplo la proteína ISLP 1 mostrada en SEC ID NO: 2, comprenden un péptido señal bacteriano. Los aminoácidos 1 a 29 se pueden eliminar, o se pueden sustituir por un aminoácido metionina o por un dipéptido Met-Ala o Met-Asp, o se pueden sustituir por un péptido señal apropiado, tal como un péptido señal vegetal como se describe anteriormente. Los péptidos señal se pueden detectar usando análisis a base de ordenador, usando programas tales como el programa (SignalP V1.1 o 2.0), usando una matriz apropiada (por ejemplo, para bacterias grampositivas procariotas) y una puntuación umbral menor que 0,5, una puntuación umbral de 0,25, o menor (véanse, *por ejemplo*, Von Heijne, Gunnar, 1986 y Bendtsen et al., 2004), o mediante alineamiento con proteínas similares con péptidos señal conocidos. Además, las propiedades de unión de las proteínas ISLP de la invención se pueden evaluar, usando métodos conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, Van Rie et al., 1990), para determinar si las proteínas ISLP de la invención se unen a sitios en la plaga, tal como el estómago de insectos, que no son reconocidos (o están en competencia) por otras proteínas bacterianas. Una nueva clase de proteínas insecticidas que se unen a diferentes sitios de unión en insectos susceptibles relevantes, en comparación con proteínas insecticidas conocidas tales como las toxinas de Bt de las familias de toxinas Cry, Cyt o VIP, es muy valiosa. Tales proteínas se pueden usar para sustituir proteínas bacterianas conocidas para las cuales los insectos pueden haber desarrollado resistencia, o para usar en combinación con proteínas bacterianas insecticidas que tienen un modo de acción diferente para prevenir o retrasar el desarrollo de resistencia de insectos frente a proteínas bacterianas, particularmente cuando se expresan (preferiblemente de forma simultánea) en una planta. Debido a las características de las toxinas de ISLP de la presente invención, son extremadamente útiles para transformar plantas, por ejemplo monocotiledóneas tales como maíz y arroz, y dicotiledóneas tales como algodón, cultivos vegetales, habas y soja, para proteger estas plantas del daño por insectos. El modo de acción de las proteínas ISLP de la actual invención es diferente en comparación con las toxinas de Bt conocidas que se usan actualmente en productos de plantas transgénicas, tales como proteínas Cry o VIP de bacilos. Tales propiedades de unión se pueden medir mediante ensayos de unión habituales como se describen anteriormente o en la patente US 6.291.156 y en la patente US 6.137.033.

Especialmente para los fines del manejo de la resistencia de insectos para una plaga de insectos específica, se prefiere combinar una proteína ISLP de esta invención con otra proteína de control de insectos, particularmente una proteína Cry bacteriana, tal como una proteína Cry1F, Cry2A o Cry1Ac, o una proteína VIP o similar a VIP, tal como VIP3A, preferiblemente una proteína que no reconoce al menos un sitio de unión reconocido por tal proteína ISLP. Las proteínas de control de insectos adecuadas para combinar con las proteínas ISLP de esta invención, particularmente para la expresión simultánea en plantas (tales como maíz, algodón, especies de Brassica (tales como coliflor o repollo), plantas de arroz o de soja), incluyen, pero no se limitan a, las proteínas Cry, tales como una proteína Cry1B, Cry1C, Cry1D, o Cry1E o sus fragmentos tóxicos, una proteína que comprende el fragmento tóxico Cry1F o híbridos derivados de una proteína Cry1F (*por ejemplo*, las proteínas híbridas Cry1A-Cry1F descritas en los documentos US 6.326.169; US 6.281.016; US 6.218.188 o sus fragmentos tóxicos), una proteína que comprende las proteínas de tipo Cry1A o sus fragmentos tóxicos, preferiblemente la proteína Cry1Ac o híbridos derivados de la proteína Cry1Ac (*por ejemplo*, la proteína híbrida Cry1Ab-Cry1Ac descrita en el documento US 5.880.275) o una proteína que comprende la proteína Cry1Ab o sus fragmentos insecticidas como se describe en el documento EP451878, una proteína que comprende el fragmento tóxico de la proteína Cry2Ab, tal como la proteína de fusión de proteína Cry2Ab-péptido de tránsito descrita en la patente US 6.489.542; una proteína que comprende los fragmentos tóxicos Cry2Ae, Cry2Af o Cry2Ag como se describen en el documento WO02/057664, una proteína que comprende los fragmentos tóxicos de la proteína Cry como se describen en el documento WO01/47952; una proteína que comprende la proteína VIP3Aa o un fragmento tóxico de la misma como se describe en Estruch et al. (1996) y el documento US 6.291.156, proteínas insecticidas de *Xenorhabdus* spp. como se describe en el documento WO98/50427, proteínas insecticidas de *Serratia* (particularmente de *S. entomophila*) o cepas de la especie *Photorhabdus*, tales como proteínas Tc de *Photorhabdus* como se describe en el documento WO98/08932 (*por ejemplo*, Waterfield et al., 2001; Ffrench-Constant y Bowen, 2000). En una realización, tal coexpresión se obtiene fácilmente transformando una planta que ya expresa una proteína de control de insectos con un ADN que codifica una proteína ISLP de esta invención, o cruzando plantas transformadas con una proteína de control de insectos conocida con plantas transformadas con una o más proteínas ISLP de esta invención. Para plantas de maíz, arroz, algodón o soja, se puede usar la proteína ISLP como la primera proteína de control de insectos, y, como segunda proteína de control de insectos, se pueden usar las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Ae o VIP3Aa o las proteínas que comprenden sus fragmentos tóxicos, híbridos o variantes de las mismas. Los métodos para obtener expresión de diferentes proteínas insecticidas en la misma planta en un esfuerzo por minimizar o prevenir el desarrollo de resistencia a plantas transgénicas resistentes a insectos se describen en el documento EP 0.408.403. Las diferentes proteínas se pueden expresar en la misma planta, o cada una se puede expresar en una planta individual y entonces se combinan en la misma planta cruzando las plantas individuales entre sí. Por ejemplo, en producción de semillas híbridas, cada planta progenitora puede expresar una proteína individual. Al cruzar las plantas progenitoras para producir híbridos, ambas proteínas se combinan en la planta híbrida. En algunas

circunstancias, puede ser preferible insertar los diferentes genes de las toxinas en el mismo lugar o locus genético de una planta, de manera que los genes no se segregarán en la progenie de esa planta.

5 Es bien conocido que las proteínas Cry de Bt se expresan como protoxinas, que se convierten en el núcleo tóxico mediante proteólisis en el intestino del insecto. Cuando se combinan las proteínas ISLP de la invención con proteínas Cry de Bt, se entiende que se pueden usar genes *cry* que codifican la protoxina completa o el núcleo tóxico, o cualquier forma intermedia.

Para los fines de selección, y/o para incrementar las opciones de control de malas hierbas, las plantas transgénicas de la invención también se pueden transformar con un ADN que codifica una proteína que confiere resistencia a un herbicida de amplio espectro, *por ejemplo*, herbicidas basados en glufosinato o glifosato.

10 La parte del gen *ISLP* plaguicidamente eficaz, o su equivalente, preferiblemente el gen quimérico *ISLP*, que codifica una porción plaguicidamente eficaz de la proteína ISLP, se puede insertar de forma estable de manera convencional en el genoma nuclear de una célula vegetal individual, y la célula vegetal así transformada se puede usar de manera convencional para producir una planta transformada que controla plagas, tales como plagas de insectos. A este respecto, para transformar la célula vegetal, se puede usar un vector de ADN-T, que contiene un ADN que codifica una proteína ISLP, en *Agrobacterium tumefaciens*. Después, se puede regenerar una planta transformada a partir de la célula vegetal transformada usando los procedimientos descritos en, por ejemplo, los documentos EP 0.116.718, EP 0.270.822, publicación PCT WO 84/02913 y la solicitud de patente europea publicada EP 0.242.246, y en Gould et al. (1991). La construcción de un vector de ADN-T para la transformación de plantas mediada por *Agrobacterium* es bien conocida en la técnica. El vector de ADN-T puede ser un vector binario, como se describe en los documentos EP 0.120.561 y EP 0.120.515, o un vector cointegrado, que se puede integrar en el plásmido Ti de *Agrobacterium* mediante recombinación homóloga, como se describe en el documento EP 0.116.718. Los vectores de ADN-T preferidos contienen cada uno un promotor enlazado operablemente a una parte del gen *ISLP* plaguicidamente eficaz entre las secuencias de borde de ADN-T, o al menos localizado a la izquierda de la secuencia de borde derecho. Las secuencias de borde se describen en Gielen et al. (1984). Otros tipos de vectores se pueden usar para transformar la célula vegetal, usando procedimientos tales como transferencia génica directa (como se describe, por ejemplo, en el documento EP 0.223.247), transformación mediada por polen (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0.270.356 y WO 85/01856), transformación de protoplastos como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.684.611, transformación vegetal mediada por virus de ARN (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP 0.067.553 y US 4.407.956), transformación mediada por liposomas (como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.536.475), y otros métodos, tales como los métodos recientemente descritos para transformar ciertas estirpes de maíz (por ejemplo, documento US 6.140.553; Fromm et al., 1990; Gordon-Kamm et al., 1990) y arroz (Shimamoto et al., 1989; Datta et al. 1990), y el método para transformar monocotiledóneas generalmente (publicación PCT WO 92/09696). Un método adecuado para la transformación de algodón se describe en la publicación de patente PCT WO 00/71733. Para la transformación de arroz, se hace referencia a los métodos descritos en los documentos WO92/09696, WO94/00977 y WO95/06722.

Los términos “maíz” y “maíz”, como se usan aquí de forma sinónima, se refieren a *Zea mays*. Algodón, como se usa aquí, se refiere a *Gossypium* spp., particularmente *G. hirsutum* y *G. barbadense*. El término “arroz” se refiere a *Oryza* spp., particularmente *O. sativa*. “Soja” se refiere a *Glycine* spp, particularmente *G. max*. Las plantas vegetales o vegetales, como se usan aquí, se refieren a pepino, tomate, lechuga, col de Bruselas, vegetales de Brassica tales como coliflor o repollos, puerro, lechuga, cebolla, melón (sandía), alcachofa, zanahoria, o pimientos.

Además de la transformación del genoma nuclear, también está incluida en la invención la transformación del genoma del plastidio (por ejemplo, el genoma del cloroplasto). Kota et al. (1999) han descrito un método para sobreexpresar una proteína Cry2Aa en cloroplastos de tabaco.

45 La planta transformada resultante se puede usar en un esquema de reproducción vegetal convencional para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir la parte del gen *ISLP* plaguicidamente eficaz en otras variedades de la misma especie vegetal o una especie vegetal relacionada. Las semillas, que se obtienen de las plantas transformadas, contienen el gen que codifica la proteína ISLP como un inserto genómico estable. Las células de la planta transformadas se pueden cultivar de manera convencional para producir la porción plaguicidamente eficaz de la toxina o proteína ISLP, que se puede recuperar para uso en composiciones insecticidas convencionales, particularmente composiciones insecticidas frente a *Lepidoptera*.

La parte del gen *ISLP* plaguicidamente eficaz se inserta en un genoma de célula vegetal de manera que el gen insertado está en dirección 3' (es decir, 3') de, y bajo el control de, un promotor que puede dirigir la expresión de la parte génica en la célula vegetal. Esto se puede lograr insertando el gen quimérico *ISLP* en el genoma de la célula vegetal, por ejemplo en el genoma nuclear o del plastidio (por ejemplo, cloroplasto).

55 Los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a: los promotores fuertes constitutivos 35S (los promotores “35S”) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de aislados CM 1841 (Gardner et al., 1981), CabbB-S (Franck et al., 1980) y CabbB-JI (Hull y Howell, 1987); el promotor 35S descrito por Odell et al. (1985), promotores de la familia de ubiquitina (por ejemplo, el promotor de ubiquitina de maíz de Christensen et al., 1992, documento EP 0.342.926, y véase también Cornejo et al., 1993), el promotor *gos2* (de Pater et al., 1992), el promotor *emu* (Last et al., 1990),

los promotores de actina de *Arabidopsis*, tales como el promotor descrito por An et al. (1996), los promotores de actina de arroz tales como el promotor descrito por Zhang et al. (1991), y el promotor descrito en el documento US 5.641.876; los promotores del virus del mosaico de las nervaduras de yuca (documento WO 97/48819, Verdagner et al. (1998)), la serie de promotores pPLEX del virus de la atrofia subterránea del trébol (documento WO 96/06932, particularmente el promotor S7), un promotor de alcohol deshidrogenasa, por ejemplo pAdh1S (números de acceso de GenBank X04049, X00581), y el promotor TR1' y el promotor TR2' (el "promotor TR1'" y el "promotor TR2'", respectivamente) que conducen la expresión de los genes 1' y 2', respectivamente, del ADN-T (Velten et al., 1984). Como alternativa, se puede utilizar un promotor que no es constitutivo sino más bien es específico para uno o más tejidos u órganos de la planta (*por ejemplo*, hojas y/o raíces), con lo que la parte del gen *ISLP* insertada se expresa solamente en células del tejido o tejidos u órgano u órganos específicos. Por ejemplo, una parte del gen *ISLP* insecticidamente eficaz se podría expresar selectivamente en las hojas de una planta (por ejemplo, maíz, algodón, arroz, soja) colocando la parte génica insecticidamente eficaz bajo el control de un promotor inducible por la luz, tal como el promotor del gen de la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa de la propia planta o de otra planta, tal como guisante, como se describe en el documento US 5.254.799. El promotor se puede escoger, por ejemplo, de manera que el gen *ISLP* de la invención sólo se exprese en aquellos tejidos o células en los que la plaga diana, tal como una plaga de insectos, se alimenta, de manera que la alimentación por la plaga diana susceptible dará como resultado un daño reducido a la planta hospedante, en comparación con plantas que no expresan el gen *ISLP*. De este modo, una plaga que daña principalmente las raíces se puede controlar expresando un gen *ISLP* bajo un promotor específico de la raíz. Un promotor preferentemente activo en raíces se describe en el documento WO00/29566. Un promotor adecuado para la expresión preferente en raíces es el promotor ZRP (y sus modificaciones), como se describe en el documento US 5.633.363. Otra alternativa es usar un promotor cuya expresión es inducible, por ejemplo un promotor inducible por herida, tal como, *por ejemplo*, el promotor MPI descrito por Cordera et al. (1994), que es inducido por una herida (tal como provocado por la alimentación del insecto), o un promotor inducible por una sustancia química, tal como desametaxona como se describe por Aoyama y Chua (1997), o un promotor inducible por la temperatura, tal como el promotor del choque térmico descrito en el documento US 5.447.858, o un promotor inducible por otros estímulos externos. En plantas monocotiledóneas, tales como maíz y arroz, el promotor TR2' de *Agrobacterium*, o sus variantes, son un promotor preferido inducido por heridas para conducir la transcripción de un gen quimérico *ISLP* de la invención, véase el documento WO 03/093483.

La parte del gen *ISLP* plaguicidamente eficaz se puede insertar en el genoma de la planta de manera que la parte génica insertada está en dirección 5' (*es decir*, 5') de las señales de regulación de la transcripción del extremo 3' adecuadas (*es decir*, señales de formación del transcrito y poliadenilación). Esto se logra preferiblemente insertando el gen quimérico *ISLP* en el genoma de la célula vegetal. Las señales adecuadas de poliadenilación y de formación del transcrito incluyen aquellas del gen CaMV 35S, el gen de nopalina sintasa (Depicker et al., 1982), el gen de octopina sintasa (Gielen et al., 1984) y el gen 7 de ADN-T (Velten y Schell, 1985), que actúan como secuencias de ADN no traducidas de 3' en células vegetales transformadas. La introducción del vector de ADN-T en *Agrobacterium* se puede llevar a cabo usando métodos conocidos, tales como electroporación o emparejamiento triparental.

La parte del gen *ISLP* plaguicidamente eficaz se puede insertar opcionalmente en el genoma vegetal como un gen híbrido (documento US 5.254.799; Vaeck et al., 1987) bajo el control del mismo promotor como un gen marcador seleccionable o puntuable, tal como el gen neo (documento EP 0.242.236) que codifica resistencia a canamicina, de manera que la planta expresa una proteína de fusión que es fácilmente detectable.

La transformación de células vegetales también se puede usar para producir las proteínas de la invención en grandes cantidades en cultivos de células vegetales, por ejemplo para producir una proteína *ISLP* que se puede aplicar entonces a cultivos tras la formulación apropiada. Cuando se hace aquí referencia a una célula vegetal transgénica, esto se refiere a una célula vegetal (o también un protoplasto vegetal) tal como en aislamiento o en cultivo tisular, o a una célula vegetal (o protoplasto) contenida en una planta o en un órgano o tejido diferenciado, y ambas posibilidades están incluidas específicamente aquí. Por tanto, una referencia a una célula vegetal en la descripción o en las reivindicaciones quiere decir que se refiere no sólo a las células aisladas en cultivo, sino también a cualquier célula vegetal, tanto si puede estar localizada o en cualquier tipo de tejido u órgano vegetal que pueda estar presente.

Para transformar otros microorganismos, incluyendo bacterias, tales como *B. thuringiensis*, que pueden tener ya actividad insecticida frente a *Lepidoptera* o *Coleoptera*, también se puede usar todo o una parte de un gen *ISLP*, que codifica una proteína insecticida, particularmente contra lepidópteros. De ese modo, se puede producir una cepa de *Bt* transformada que es útil para combatir un amplio espectro de plagas de insectos lepidópteros y/o coleópteros, o para combatir plagas de insectos lepidópteros adicionales. La transformación de bacterias, tales como bacterias del género *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Bacillus* o *Escherichia*, con todo o una parte del gen *ISLP* de esta invención, incorporado en un vehículo de clonación adecuado, se puede llevar a cabo de manera convencional, usando, por ejemplo, técnicas de electroporación convencionales como se describe en Mahillon et al. (1989) y en la publicación de patente PCT WO 90/06999.

Las cepas transformadas de la especie *Bacillus* que contienen el gen *ISLP* de esta invención se pueden fermentar mediante métodos convencionales (Dulmage, 1981; Bernhard y Utz, 1993) para proporcionar rendimientos elevados

de células. En condiciones de crecimiento apropiadas, estas cepas pueden producir proteína ISLP con rendimientos elevados.

Los microorganismos hospedantes adecuados alternativos en los que se pueden expresar los genes *ISLP* son hongos, algas, o virus, particularmente especies que son especies colonizadoras de plantas (*por ejemplo*, (endo)simbióticas) o patógenos de plagas, tales como plagas de insectos.

Una composición insecticida, particularmente contra lepidópteros, de esta invención se puede formular de manera convencional usando como ingredientes activos los microorganismos transformados con el gen *ISLP*, o una proteína ISLP, o una porción de ISLP insecticidamente eficaz, junto con vehículos, diluyentes, emulsionantes y/o dispersantes adecuados (*por ejemplo*, como se describe por Bernhard y Utz, 1993). Esta composición insecticida se puede formular como un polvo humectable, peletes, gránulos o polvo fino, o como una formulación líquida con disolventes acuosos o no acuosos tal como una espuma, gel, suspensión, concentrado, etc. Los ejemplos de composiciones que comprenden esporas bacterianas insecticidas se describen en el documento WO 96/10083.

Un método para controlar insectos, particularmente lepidópteros o coleópteros, según esta invención puede comprender aplicar (*por ejemplo*, pulverizar), a un locus (área) a proteger, una cantidad insecticida de las proteínas ISLP o composiciones que comprenden las proteínas ISLP o que comprenden células hospedantes transformadas con los genes *ISLP* de esta invención. El locus a proteger puede incluir, por ejemplo, el hábitat de las plagas de insectos o la vegetación en crecimiento (*por ejemplo* aplicación al follaje), o un área en el que se va a hacer crecer la vegetación (*por ejemplo* aplicación al suelo o al agua). En una realización, una composición según la presente invención comprende una cantidad insecticida de al menos una de las proteínas ISLP de la invención, que se puede producir mediante un hospedante bacteriano. Tal composición se puede aplicar a hojas, al suelo, o al revestimiento de semillas.

La expresión “poner en contacto” se usa aquí para querer decir “poner en contacto físico con”. Poner en contacto una planta con una proteína insecticida significa que la proteína insecticida se pone en contacto con células de la planta, ya sea internamente (por ejemplo mediante expresión en la planta) o externamente (por ejemplo aplicando composiciones que comprenden la proteína insecticida externamente a la planta). Se entiende que la expresión no indica la duración de tiempo de contacto, sino que comprende cualquier período de contacto. Cuando se refiere a un método para proteger una planta frente al daño por insectos que comprende poner en contacto dicha planta (o células o tejidos de la misma) con una proteína insecticida de la invención, el contacto puede ser suficientemente prolongado y suficientemente amplio (con una cantidad suficientemente elevada de proteína que se pone en contacto con un número suficientemente grande de células) para prevenir o reducir el daño por insectos.

Esta invención se refiere además a un método para controlar plagas del algodón de lepidópteros o coleópteros, o plagas de insectos chupadores del algodón, tales como picudos del algodón, gusanos belloteros del algodón, gusanos del capullo, o gusanos de la oreja, *Aphis gossypii*, *Myzus persicae*, insectos de *Lygus*, mosca blanca, insectos hediondos, áfidos, o *Creontiades dilutus*. Las plagas de algodón de lepidópteros específicas que se pueden controlar mediante los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, las seleccionadas del grupo de *Helicoverpa zea* (gusano de la mazorca de maíz), *Helicoverpa armigera* (gusano bellotero del algodón), *Helicoverpa punctigera* (gusano bellotero nativo), *Heliothis virescens* (gusano bellotero del tabaco), *Spodoptera frugiperda* (cogollero del maíz) y *Pectinophora gossypiella* (gusano bellotero rosa). El método para controlar plagas de insectos del algodón comprende aplicar a un área o planta a proteger una proteína ISLP como se define aquí. Esto se puede lograr poniendo en contacto una planta de algodón con una proteína ISLP de esta invención, por ejemplo plantando una planta, tal como una planta de algodón, transformada con un gen ISLP de esta invención, o pulverizando una composición que contiene una proteína ISLP de esta invención. La invención también se refiere al uso de las proteínas ISLP de esta invención frente a plagas de insectos del algodón de lepidópteros, áfidos o coleópteros, para minimizar el daño a las plantas de algodón.

Una plaga de insectos diana para las proteínas ISLP de esta invención, tal como la proteína ISLP1, también puede ser *Epilachna varivestis*, el escarabajo del haba mejicano. Esta es una planta importante en diversos cultivos de legumbres en América del Norte, pero también es un problema serio en otros cultivos en Asia y África como cucurbitáceas, solanáceas, habas, maíz, sorgo, arroz, trigo, algodón, sésamo, lechuga, soja y frijol. Esta invención se refiere además a un método para controlar plagas de maíz de lepidópteros o coleópteros o áfidos, tales como áfidos de la hoja del maíz (*Rhopalosiphum maidis*), escarabajos verdes (*Schizaphis graminum*) o áfidos del melocotón verdes (*Myzus persicae*); gusanos de la oreja, orugas militares, orugas de corte, barrenadores de tallos, gusanos de alambre, barrenadores del maíz o gusanos de la raíz del maíz. Las plagas de maíz específicas que se pueden controlar mediante los métodos de la presente invención se pueden seleccionar del grupo de *Helicoverpa zea* (gusano de la mazorca de maíz), *Agrotis ipsilon* (gusano negro), *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), gusanos de la raíz del maíz *Diabrotica* spp. y *Spodoptera frugiperda* (cogollero del maíz). El método comprende aplicar a un área o planta a proteger una proteína ISLP como se define aquí. Esto se puede lograr poniendo en contacto una planta de maíz con una proteína ISLP de esta invención, por ejemplo plantando una planta de maíz transformada con un gen ISLP de esta invención, o pulverizando una composición que contiene una proteína ISLP de esta invención. La invención también se refiere al uso de las proteínas ISLP de esta invención frente a plagas de insectos lepidópteros del maíz, para minimizar el daño a plantas del maíz.

Esta invención se refiere además a un método para controlar plagas del arroz de lepidópteros o coleópteros, o insectos chupadores en el arroz, tales como saltahojas del arroz, insectos (negros) del arroz, barrenadores del tallo del arroz, saltadores del arroz, gusanos negros del arroz, cogolleros del arroz, gusanos de la carcasa del arroz, y saltadores del arroz o larvas blancas. Las plagas de insectos del arroz lepidópteros que se pueden controlar mediante los métodos de la presente invención se pueden seleccionar del grupo de barrenador del tallo amarillo (*Scirphophaga incertulas*), saltahojas (*Cnaphalocrocis medinalis*), barrenador del tallo rosa (*Sesamia inferens*) y barrenador del tallo manchado del maíz (*Chilo partellus*). El método comprende aplicar a un área o planta a proteger una proteína ISLP como se define aquí. Esto se puede lograr poniendo en contacto una planta de arroz con una proteína ISLP de esta invención, por ejemplo plantando una planta de arroz transformada con un gen ISLP de esta invención, o pulverizando una composición que contiene una proteína ISLP de esta invención. La invención también se refiere al uso de las proteínas ISLP de esta invención frente a plagas de insectos del arroz lepidópteros, de áfidos o coleópteros, para minimizar el daño a plantas de arroz.

Esta invención se refiere además a un método para controlar plagas de lepidópteros, áfidos o coleópteros de la soja. Las plagas de soja específicas que se pueden controlar mediante los métodos de la presente invención se pueden seleccionar del grupo de oruga de haba aterciopelada (*Anticarsia gemmatalis*), oruga de la soja (*Pseudoplusia includens*), cogollero de la remolacha (*Spodoptera exigua*), cogollero con tiras amarillas (*Spodoptera omithogalli*), gusano de la mazorca del maíz (*Helicoverpa zea*), barrenador de la vaina (*Epinotia aporema*) y *Rachiplusia nu*. Este método comprende aplicar a un área o planta a proteger una proteína ISLP como se define aquí. Esto se puede lograr poniendo en contacto una planta de soja con una proteína ISLP, por ejemplo una proteína ISLP1, de esta invención, por ejemplo plantando una planta de soja transformada con un gen ISLP de esta invención, o pulverizando una composición que contiene una proteína ISLP de esta invención. La invención también se refiere al uso de las proteínas ISLP de esta invención frente a plagas de insectos lepidópteros de la soja, para minimizar el daño a plantas de soja.

Para obtener la toxina o proteína de ISLP, las células de los hospedantes recombinantes que expresan la proteína ISLP se pueden hacer crecer de manera convencional en un medio de cultivo adecuado. La proteína ISLP producida se puede separar y purificar de células lisadas, o, cuando se segregan, del medio de crecimiento. Si las proteínas no se segregan, las células se pueden lisar usando medios convencionales, tales como degradación enzimática, mediante ultrasonidos o usando detergentes o similares. La proteína ISLP se puede separar entonces y purificar mediante técnicas estándar, tales como cromatografía, extracción, electroforesis, o similar.

El término "gen", como se usa aquí, significa cualquier fragmento de ADN o ARN que comprende una región (la "región transcrita") que se puede transcribir en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula, operablemente enlazada a regiones reguladoras adecuadas, por ejemplo un promotor expresable en plantas. De este modo, un gen puede comprender varios fragmentos enlazados operablemente tales como un promotor, una secuencia líder de 5', una región codificante, y una secuencia no traducida de 3', que comprende un sitio de poliadenilación. Un gen endógeno para un organismo particular (tal como una especie vegetal o una cepa bacteriana) es un gen que se encuentra de forma natural en ese organismo en la naturaleza. Un "gen quimérico", cuando se refiere a un ADN de ISLP de esta invención, se refiere a una secuencia de ADN de ISLP que tiene secuencias reguladoras de 5' y/o 3' diferentes de las secuencias reguladoras de 5' y/o 3' bacterianas de origen natural, que conducen la expresión del gen *ISLP* en su célula hospedante nativa.

La expresión "expresión de un gen", cuando se refiere a los genes ISLP de la invención, se refiere al proceso en el que una región codificante de ADN que está enlazada operablemente a regiones reguladoras apropiadas, tal como a un promotor, se transcribe y traduce en una proteína.

Para los fines de esta invención, la "identidad de secuencia" de dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos relacionadas, expresada como porcentaje, se refiere al número de posiciones en las dos secuencias óptimamente alineadas que tienen restos idénticos (x100), dividido entre el número de posiciones comparadas. Un salto, *es decir*, una posición en un alineamiento en el que un resto está presente en una secuencia pero no en la otra, se considera como una posición con restos no idénticos (para secuencias de diferente longitud, el tamaño se iguala al de la secuencia más corta, por ejemplo en el caso del alineamiento de un fragmento de una proteína ISLP y una proteína de la capa S de longitud completa, la comparación es con respecto a la parte correspondiente del mismo tamaño en la proteína de la capa S). Para calcular la identidad de secuencia entre dos secuencias para los fines de esta invención, se puede usar el programa GAP, que usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) y que se proporciona mediante el Paquete de Wisconsin, Versión 10.2, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin 53711, USA. Los parámetros de GAP usados son una penalización de creación de salto = 50 (nucleótidos)/8 (aminoácidos), una penalización de extensión de salto = 3 (nucleótidos)/2 (aminoácidos), y una matriz de puntuación "nwsgapdna" (nucleótidos) o "blosum62" (aminoácidos). GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias a lo largo de toda su longitud, maximizando el número de emparejamientos y minimizando el número de saltos. Los parámetros por defecto son una penalización de creación de salto (50) (nucleótidos)/8 (proteínas) y una penalización de extensión de salto = 3 (nucleótidos)/2 (proteínas). Para nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto usada es "nwsgapdna", y para proteínas la matriz de puntuación por defecto es "blosum62" (Henikoff y Henikoff, 1992). De forma similar, el porcentaje de similitud de secuencia se puede obtener en tales alineamientos usando software estándar, que indica no sólo el porcentaje de restos idénticos sino también incluye restos que difieren pero son de naturaleza similar (tal como diferencias en

aminoácidos conservativos, como se define aquí, para alineamientos de proteínas). Los ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al. (1977) y Altschul et al. (1990).

5 Estas y/u otras realizaciones de esta invención se reflejan en las reivindicaciones, que forman parte de la descripción de la invención.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención, y no se proporcionan para limitar la invención o la protección buscada. El listado de secuencias citado en los Ejemplos, las Reivindicaciones y la Descripción es como sigue:

SEC ID NO: 1: secuencia codificante de AND y secuencia de aminoácidos del gen *islp1*

SEC ID NO: 2: secuencia de aminoácidos de la proteína ISLP1

10 SEC ID NO: 3: cebador de PCR ISLP1Xder

SEC ID NO: 4: cebador de PCR ISLP1Xrev

SEC ID NO: 5: cebador de PCR BSLX-1

SEC ID NO: 6: cebador de PCR BSLX-4

SEC ID NO: 7: cebador de PCR BSLX-3

15 SEC ID NO: 8: cebador de PCR BSLX-2

SEC ID NO: 9: cebador de PCR BSLN-5

SEC ID NO:10: cebador de PCR BSLN-6

SEC ID NO:11: cebador de PCR BSLP-8

SEC ID NO:12: cebador de PCR BSLP-7

20 SEC ID NO:13: cebador de PCR EAGB-4

SEC ID NO:14: secuencia de aminoácidos del término N de la proteína ISLP1 madura aislada

SEC ID NO:15: secuencia de aminoácidos del término N del fragmento tríptico de alrededor de 50 kDa de la proteína ISLP1

25 Excepto que se señale de otro modo en los Ejemplos, todas las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo según protocolos estándar como se describen en Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, en los Volúmenes 1 y 2 de Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA y en los Volúmenes I y II de Brown (1998) Molecular Biology LabFax, Segunda Edición, Academic Press (UK). Los materiales y métodos estándar para el trabajo molecular con plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.D.D. Croy, conjuntamente  
30 publicado por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK. Los materiales y métodos estándar para las reacciones en cadena de la polimerasa se pueden encontrar en Dieffenbach y Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y en McPherson et al. (2000) PCR - Basics: From Background to Bench, Primera Edición, Springer Verlag, Alemania.

35 Se debe entender que lo anterior es simplemente una descripción detallada de realizaciones particulares de esta invención. Por lo tanto, la descripción anterior no pretende limitar el alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención se ha de determinar sólo por las reivindicaciones anejas.

## EJEMPLOS

Materiales y métodos.

40 Cepas bacterianas. Se aislaron cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) a partir de muestras de insectos (*Epilachna varivestis*) muertos mediante el método de selección con acetato (Travers et al., 1987). Los cuerpos muertos de *E. varivestis* se lavaron dos veces con hipoclorito sódico al 1% y con agua estéril antes de la homogeneización y aislamiento de las cepas de Bt.

45 Bioensayos. Los bioensayos frente a *E. varivestis* se realizaron con suspensiones de esporas/cristales usando la técnica de inmersión de hojas. Se sumergieron hojas vegetales de *Phaseolus vulgaris* en dilución de toxina y se dejaron secar. Se ensayaron diferentes concentraciones de proteína con cinco larvas de la primera fase por hoja tratada. Se realizaron cuatro repeticiones por concentración. La mortalidad y el daño a las hojas se determinó tras 6 días. Los bioensayos frente a larvas de primera fase de *Manduca sexta* o *Spodoptera frugiperda* se realizaron en

dieta artificial como se describió previamente (Bravo et al., 1998). Los bioensayos frente a larvas de mosquitos *Aedes aegypti* se realizaron en 100 ml de H<sub>2</sub>O como se describe por Ibarra et al. (2003).

Purificación de la inclusión cristalina presente en la cepa de ISLP1. La cepa de ISLP1 se hizo crecer en cápsulas de Petri que contienen medio de esporulación con caldo nutriente sólido (Lereclus et al., 1995). La mezcla de esporas/cristales se recogió en 5 ml de agua estéril. Se centrifugó 10 min. a 10.000 rpm, el sobrenadante se recuperó, y se desechó el pelete que contiene sólo esporas. Esta etapa se repitió 5 veces a fin de eliminar todas las esporas de la suspensión. Finalmente, las inclusiones cristalinas se recuperaron mediante centrifugación durante 30 min. a 19.000 rpm. Las proteínas cristalinas se solubilizaron en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, pH 10,5, 0,2% de beta-mercaptoetanol, y se purificaron mediante cromatografía de intercambio aniónico en una columna Q-sefarosa FPLC Pharmacia (Hill, 1983).

Secuenciación N-terminal. La secuenciación N-terminal de la proteína producida por la cepa ISLP1 se realizó en la instalación de microquímica de Harvard de la Universidad de Harvard (Cambridge, Massachusetts) tras SDS-PAGE 7% y transferencia sobre membranas de polidifluoruro de vinilideno (Millipore Co., Bedford, MA) en una cámara de transferencia semiseca según se establece por el fabricante. La secuencia N-terminal también se realizó a partir de un fragmento de tripsina de la proteína cristalina ISLP1 que se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular HPLC (Güereca Y Bravo, 1999).

Inmunización de conejos. Se inmunizó un conejo blanco Nueva Zelanda con la proteína ISLP1 mediante inyecciones subcutáneas. Se emulsionó 1 mg de la proteína ISLP1 en PBS con adyuvante completo de Freund, y se inyectó en cinco sitios en la espalda del conejo. El conejo se revacunó tres veces con 1 mg de la proteína ISLP1, mezclada con adyuvante incompleto, a intervalos de 15 días. Se aisló una muestra de la sangre 40 días después de la inmunización primaria.

Determinación de la secuencia de ADN del gen ISLP1. Basándose en la secuencia N-terminal de la proteína ISLP1, se diseñaron dos cebadores de PCR, ISLP1Xder (ACGCTCTAGATAGCAGGTAAATCATTCCCAGACG, SEC ID NO. 3) y ISLP1Xrev (ACGCTCTAGATCGCCGTATTGGTCAGTTGTTAC, SEC ID NO.4), amplificando un producto de PCR de 1536 pb. Las reacciones de PCR se realizaron mediante técnicas estándar (Sambrook et al., 1989) con ADN polimerasa de *Pfu* (Stratagene La Jolla, CA) debido a su elevada fidelidad. Se extrajo ADN total de la cepa de ISLP1 (Msadek et al., 1990), y se usó como molde en todas las reacciones de PCR. El producto de la PCR se usó para el análisis Blast, y se obtuvieron dos secuencias relacionadas de los genes de la capa S (números de acceso u38842 y x99724). El alineamiento de estas secuencias demostró que compartieron extremos 5' y 3' similares. Se diseñaron cuatro cebadores de la PCR a partir de los extremos terminales 5' y 3' de estos genes de la capa S y a partir de la secuencia interna del fragmento amplificado de ISLP1. Los cebadores BSLX-1 (GCTCTAGATGAGAGTGCTTTATAGGAAAAT, SEC ID NO: 5) y BSLX-4 (GCTCTAGATCTTCAGCCGGAGCGTATGTACC, SEC ID NO: 6) amplifican un fragmento de extremo 5' de 553 pb, y los cebadores BSLX-3 (GCTCTAGACTGCTGAGGCTGCTGGTGAGG, SEC ID NO: 7) y BSLX-2 (GCTCTAGATCCTCGACCTGCTTCACTATCA, SEC ID NO: 8) amplifican un fragmento de 3' de 1372 pb. Cada fragmento de la PCR se digirió con *Xba*1 (New England BioLabs, Beverly, MA) y se clonó en pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA) previamente digerido con *Xba*1. Los productos de ligación se purificaron mediante extracción con fenol/cloroformo, se precipitaron con etanol y se electroporaron en células electrocompetentes de *Escherichia coli* TG1 (Lereclus et al., 1989). Las colonias de transformantes se hicieron crecer en placas de agar LB, suplementadas con ampicilina (100 µg/ml), las colonias se mezclaron con glicerol (20%) y se almacenaron a -70°C. Estos plásmidos denominados ISLP1-SL1, ISLP1-SL2 e ISLP1-SL3, y sus insertos de ADN, se secuenciaron usando instalaciones de secuenciación de ADN automáticas.

Clonación y expresión de la proteína ISLP1 en *B. thuringiensis*. El gen *islp1* completo se reconstituyó clonando tres fragmentos de PCR en el plásmido pHT315 (Lereclus et al., 1989). El primer producto de la PCR que contiene la región promotora se obtuvo con los cebadores BSLX-1 y BSLN-5 (TCTTTGCCATGGTATAAAATTTCTCCTTC, SEC ID NO: 9). El cebador BSLX-1 tiene 10 pb extra en el extremo 5' que contiene un sitio de restricción *Xba*1, y el cebador BSLN-5 tiene un sitio de restricción *Nco*1 interno. El segundo fragmento de la PCR se obtuvo con el cebador BSLN-6 (TTATACCATGGCAAAGACTAACTCTTAC, SEC ID NO:10), que contiene un sitio de restricción *Nco*1 interno, y el cebador BSLP-8 (AAAAGTGCAGAAGTACCGTCAGCACTTGCTTC, SEC ID NO:11), que incluye el sitio de restricción *Pst*1 único del gen *islp1*. Finalmente, el tercer fragmento de la PCR se amplificó con el cebador BSLP-7 (AACGCTGCAGTTGTAACACTTGGTGGTAAAG, SEC ID NO: 12) que también incluye el sitio de restricción *Pst*1 único, y el cebador EAGB-4 (CGGGATCCTCCTCGACCTGCGTCACTATCA, SEC ID NO: 13) que es similar a BSLX-2 pero tiene 8 pb extra que contienen un sitio de restricción *Bam*HI en el extremo 5'. Cada producto de la PCR se purificó y digirió con las enzimas de restricción correspondientes, y se subclonó separadamente en pBluescript KS. Los fragmentos de ADN contenidos en estos plásmidos se purificaron, se ligaron y se insertaron en el plásmido pHT315, previamente digerido con *Xba*1 y *Bam*HI. El producto de la reacción de ligación se transformó directamente en la cepa 407 de *Bacillus thuringiensis* acristalífera (Lereclus et al., 1989), que fue proporcionada amablemente por Dr. Didier Lereclus (Instituto Pasteur, Francia), y se hizo crecer a 30°C en LB suplementado con 7,5 µg/ml de eritromicina. El plásmido resultante se denominó pHT-ISLP1. La cepa de Bt que contiene pHT-ISLP1 se hizo crecer en cápsulas de Petri que contienen medio HCT sólido suplementado con eritromicina. La mezcla de esporas/cristales se recogió en 2 ml de agua estéril y se usó en experimentos de transferencia Western. La detección se realizó con anticuerpo policlonal anti-SL-ISLP1 (1/10.000; 1 h), y se visualizó con un anticuerpo anti-

conejo de cabra acoplado con peroxidasa de rábano picante (HR) (Sigma, St. Louis, MO) (1/7.500; 1 h), seguido por el sustrato quimioluminiscente SuperSignal (Pierce, Rockford, IL) como se describe por el fabricante.

#### Extracción química de la proteína de la capa S

5 La cepa de ISLP1, la cepa de Bt que contiene pHT-ISLP1, y la cepa 407 de Bt acristalífera se hicieron crecer en medio de caldo BHI (Difco) hasta 0,9 O.D. a 600 nm, a fin de tener células exclusivamente vegetativas. Las células se pelletizaron mediante centrifugación (10 min. a 10.000 rpm). Los peletes se lavaron y se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de 1, 1,5 ó 2 M de hidrocloreuro de guanidinio (pH 2,5), como se describe por Luckevich y Beveridge (1989), para extraer específicamente las proteínas ancladas a la superficie celular. Las muestras se centrifugaron 10 min. a 10.000 rpm, los peletes que contienen las células bacterianas y los sobrenadantes que  
10 contienen las proteínas extraídas se precipitaron entonces añadiendo ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final de 10% (20 min. a -20°C), se centrifugaron 10 min. a 10.000 rpm, se lavaron dos veces con agua y se suspendieron en NaOH 0,03 N. Se añadió un volumen igual de tampón de carga de muestra de Laemmli 2X. Las muestras se hirvieron durante 5 min. y se cargaron en dos geles de SDS-PAGE al 10%. Un gel se tiñó con azul brillante de Coomassie, y el gel duplicado se electrotransfirió a membranas Immobilon de polidifluoruro de vinilideno (PVDF) (Amersham Biosciences) para la detección mediante transferencia Western usando anticuerpo policlonal anti-SL-ISLP1 como se describe anteriormente.

#### Resultados

Aislamiento de cepas de Bt activas frente a *Epilachna varivestis*. Se usaron cuatro cepas de Bt aisladas en Méjico de cuerpos muertos de *E. varivestis* en ensayos de toxicidad frente a larvas de *E. varivestis* (Coleoptera:Coccinellidae).  
20 Estas cepas fueron muy similares, puesto que todas ellas produjeron un cristal similar compuesto de una proteína de 100 kDa y tuvieron un patrón de proteína total idéntico. Las cuatro cepas mostraron 100% de mortalidad frente a larvas de *E. varivestis* cuando se ensayaron a 100 y 1000 ng/cm<sup>2</sup>. Se seleccionó una de estas cepas, denominada ISLP1, y se purificó la inclusión cristalina mediante centrifugación sucesiva como se describe en los Materiales y Métodos, seguido de la cromatografía de intercambio aniónico. Los bioensayos frente a larvas de *E. varivestis*  
25 realizados con mezcla de esporas/cristales de esta cepa mostraron una concentración letal (LC<sub>50</sub>) de 16ng/ cm<sup>2</sup> *E. varivestis* (7-25 de límites de confianza del 95%). Con proteína cristalina pura, se encontró una LC<sub>50</sub> de 8,6 ng/cm<sup>2</sup> (4-14 de límites de confianza de 95%). El cristal puro o la mezcla de esporas/cristales (hasta 10.000 ng/cm<sup>2</sup>) no mostró actividad tóxica frente a larvas de primera fase de los insectos lepidópteros *Manduca sexta* o *Spodoptera frugiperda*, y no se encontró toxicidad frente a larvas de 4<sup>a</sup> fase del díptero *Aedes aegypti*.

30 La cepa de ISLP1 se caracterizó mediante reacciones de PCR usando cebadores generales y específicos para genes *cry1*, *cry3*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry13*, *cry14*, y *cyt1A* (Bravo et al., 1998; Ceron et al., 1994; Ceron et al., 1995). Todas las reacciones de PCR fueron negativas. El gen de 16S ARNr de la cepa de ISLP1 se amplificó entonces usando los cebadores diseñados por Aguino de Muro y Priest (Aguino de Muro y Priest, 1993). El análisis de Blast de la secuencia de 16S ADN confirmó que la cepa de ISLP1 pertenece al grupo de *Bacillus thuringiensis*.

35 Caracterización de la proteína ISLP1 encontrada en inclusiones cristalinas.

La proteína de 100 kDa producida mediante la cepa de ISLP1 se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico, se transfirió a Immobilon P<sup>SO</sup>, y se obtuvo la secuencia aminoterminal de la proteína. Esta secuencia de aminoácidos (AGKSFPDVPAGH, SEC ID NO: 14) corresponde a los primeros 12 aminoácidos tras el péptido líder de un precursor de proteína de la capa S procedente de *OlpA* de *B. licheniformis* (número de acceso GenBank U38842, número de acceso GenPept AAC44405) y EA1 de *B. anthracis* (número de acceso GenBank X99724, número de acceso GenPept CAA68063). Se realizó una digestión con tripsina de la proteína ISLP1 pura, y se purificó un fragmento de alrededor de 50 kDa mediante cromatografía de exclusión molecular HPLC. Se obtuvo una secuencia interna de 18 aminoácidos que también se encontró en las proteínas de la capa S *Olp1* y EA1: KLPVTFVTTDQYGDOPYGAN (SEC ID NO: 15).

45 Se diseñaron cebadores de PCR (ISLP1Xder e ISLP1Xrev) a partir de las dos secuencias N-terminales obtenidas de esta proteína, y se usaron para la amplificación de un fragmento interno que se secuenció en su ADN. El análisis de Blast de la secuencia resultante mostró una puntuación elevada con secuencias de dos genes de la capa S *olpA* y *eag* (números de acceso de GenBank u38842 y x99724). Usando esta información y el alineamiento de las secuencias de ADN de estos genes, se diseñaron nuevos cebadores de la PCR para amplificar otros dos productos de PCR solapantes. Uno incluye 500 pb en dirección 5' del codón ATG, a fin de tener el promotor putativo, y el otro incluyó 200 pb tras el codón de parada putativo. Se obtuvo la secuencia del gen *islp1* completo (SEC ID NO: 1). El marco de lectura abierto (ORF) encontrado en esta secuencia contenía 2.589 nucleótidos, estaba precedido por una secuencia de Shine-Dalgarno. Se observó una estructura palindrómica 22 nucleótidos en dirección 3' desde el codón de parada. La comparación del término N de la proteína secuenciada y de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica confirmó que esta proteína también se sintetiza como un prepolipéptido con un péptido señal de 29 aminoácidos. El término N de la proteína madura con secuencia señal eliminada está en la posición 30 de aminoácidos en SEC ID NO: 2. En la secuencia proteica hay tres motivos de homología de la capa S (SLH), el primero se observó entre la región de la posición 34 a 76 de aminoácidos, la segunda en la región de la  
55

posición 95-136 de aminoácidos, y la tercera en la región de la posición 162-198 de aminoácidos (todas son posiciones de aminoácidos en SEC ID NO: 2).

Finalmente, el gen *islp1* completo se clonó directamente en la cepa 407 de *B. thuringiensis* acristalífera, amplificando tres fragmentos de PCR que solapan en un sitio de restricción *NcoI* y *PstI*, respectivamente, como se describe en los Materiales y Métodos. No fue posible obtener transformantes de *E. coli* con este constructo. Otros autores encontraron que en muchos casos la clonación del gen de la capa S en *E. coli* con su región reguladora podría conducir a problemas (Mesnage et al., 2001; Sun et al., 2001). La cepa de Bt resultante expresó la proteína ISLP1 según se juzga mediante inmunodetección de la proteína usando un anticuerpo policlonal provocado contra la proteína ISLP1 pura. Un cultivo esporulado de esta cepa mostró 100% de mortalidad de las larvas de *E. varivestis* cuando se ensayaron a 100 y 1000 ng/cm<sup>2</sup>, en contraste con la cepa de control transformada con el vector lanzadera pHT315, que no expresa la proteína y el ISLP1 y no mostró ninguna toxicidad para las larvas de *E. varivestis*.

Expresión de ISLP1 en la cepa de ISLP1.

Se analizó la expresión de la proteína ISLP1 durante el crecimiento en medio de esporulación SP. Esta proteína se expresa durante la fase vegetativa y de esporulación del crecimiento. Durante la fase de crecimiento vegetativa, la proteína se asoció a la bacteria, puesto que toda la proteína detectada mediante transferencia Western se encontró en el pelete bacteriano obtenido tras la centrifugación del cultivo. Sin embargo, durante la fase de esporulación, también se encontró la proteína ISLP1 en el sobrenadante de cultivos centrifugados.

Luckevich y Beveridge (1989) describieron un procedimiento de extracción específica para la proteína de la capa S de *B. thuringiensis* subsp. *galleria*. Se usó este método para ensayar si la proteína ISLP1 tiene la capacidad para unirse a la superficie celular a partir de la cepa original y en la cepa transformante. El tratamiento de células vegetativas con 2 M de agente caotrópico a pH bajo dio como resultado la extracción específica de la proteína SL-ISLP1 según se juzga mediante el SDS-PAGE y el análisis de transferencia Western de la proteína extraída. La proteína SL-ISLP1 sólo estuvo presente en la cepa de ISLP1 y en la cepa del transformante de Bt, estando ausente esta proteína en la cepa acristalífera 407. De forma similar como se da a conocer por Luckevich y Beveridge (1989), la proteína ISLP1 se extrajo solamente con el tratamiento de 2 M de reactivo caotrópico, y los tratamientos con concentraciones menores de reactivo caotrópico (1-1,5 M) no extrajeron la proteína de las células bacterianas.

La detección mediante transferencia Western de esta proteína también se realizó en otras cepas de Bt como Bt subs kurstaki HD1 y HD73, Bt subs israelinsis HD567, Bt subs aizawai HD137, Bt subs tolworthi HD125, Bt subs morrisoni tenebrionis, mostrando que esta proteína no es producida por estas cepas. El análisis de PCR de estas cepas, usando los cebadores ISLP1Xder e ISLP1Xrev, también confirmó que estas cepas de Bt no cosechan la secuencia codificante de ISLP1.

La proteína ISLP1 (SEC ID NO: 2) tiene una elevada identidad de secuencia con la proteína de la capa S EA1 de *Bacillus anthracis* (92% de identidad de secuencia para la proteína, incluyendo el péptido señal) y con la proteína CTC2 dada a conocer en *B. thuringiensis* (89% de identidad de secuencia para la proteína, incluyendo el péptido señal). La identidad de secuencia de aminoácidos de la proteína ISLP1 con la otra proteína de la capa S de *B. anthracis* SAP es sólo 32%.

Referencias:

Aguino de Muro y Priest. (1993) FEMS Microbiol Lett. 112: 205-210.

Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402.

Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410.

An et al. (1996) Plant J. 10, 107.

Aoyama y Chua (1997) Plant Journal 11:605-612

Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, Vol. 1 y 2, USA.

Bennetzen & Hall (1982) J. Biol. Chem. 257, 3026-3031

Bendtsen et al. (2004) J. Mol. Biol., 340:783-795.

Bernhard, K. y Utz, R. (1993) "Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses", en *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, p. 255-267, eds. Entwistle, P.F., Cory, J.S., Bailey, M.J. y Higgs, S., John Wiley and Sons, Nueva York.

Beveridge et al. (1997) FEMS Microbiol Rev 20: 99-149

Bih et al. (1999), J. Biol. Chem. 274, 22884-22894.

- Bravo *et al.* (1998) *Appl. Environm. Microbiol.* 64: 4965-4972
- Brown (1998) *Molecular Biology LabFax*, Volúmenes I y II, Segunda edición, Academic Press (UK)
- Callis *et al.* (1987) *Genes Developm.* 1:1183-1200
- Ceron *et al.* (1994) *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 353-356.
- 5 Ceron *et al.* (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3826-3831.
- Christensen *et al.* (1992) *Plant Mol. Biol.* 18, 675-689.
- Cordera *et al.* (1994) *The Plant Journal* 6, 141.
- Cornejo *et al.* (1993) *Plant Mol. Biol.* 23, 567-581.
- Cornelissen *et al.* (1986) *EMBO J.* 5, 37-40.
- 10 Crickmore *et al.* (1998). *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 807-813.
- Crickmore *et al.* (2005). [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)
- Croy R.D.D. (1993) *Plant Molecular Biology Labfax* publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (UK) y Blackwell Scientific Publications, UK.
- Datta *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8, 736-740.
- 15 De Pater *et al.* (1992) *Plant J.* 2, 834-844.
- Depicker *et al.* (1982) *J. Molec. Appl. Genetics* 1, 561-573.
- Dieffenbach y Dveksler (1995) *Cebador PCR: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Dulmage, H.T. (1981) "Production of Bacteria for Biological Control of Insects" en *Biological Control in Crop Production*, Ed. Paparizas, D.C., Osmun Publishers, Totowa, N.J., USA, p. 129-141.
- 20 Estruch *et al.* (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5389-94.
- Estruch *et al.* (1996) *PNAS USA* 93(11), 5389-5394.
- Franck *et al.* (1980) *Cell* 21, 285-294.
- French *et al.* (1986) *Anal.Biochem.* 156, 417-423
- Ffrench-Constant and Bowen (2000) *Cell Mol Life Sci* 57, 828-33.
- 25 Fromm *et al.* (1990) *Bio/Technology* 8, 833-839
- Gardner *et al.* (1981) *Nucleic Acids Research* 9, 2871-2887
- Gielen *et al.* (1984) *EMBO J* 3, 835-845
- Gordon-Kamm *et al.* (1990) *The Plant Cell* 2, 603-618
- Gould *et al.* (1991) *Plant Physiol.* 95, 426-434
- 30 Guereca y Bravo. (1999) *Biochim. Biophys. Acta.* 1429: 342-350
- Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Manual Laboratory*, Cold Spring Harbor Lab Press NY
- Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Academy Science* 89 (10):915-919
- Hesse *et al.* (1989), *EMBO J.* 8 2453-2461.
- Hill (1983) *Epilachna spp.* En: *Agricultural Insect pests of the tropics and their control.* Cambridge University press. p. 438. ISBN 0 521 24638 5.
- 35 Ho *et al.* (1989). *Gene* 77, 51-59.
- Hofte *et al.* (1988) *Appl. and Environm. Microbiol.* 54, 2010-2017
- Hull y Howell (1987) *Virology* 86, 482-493

- Ibarra *et al.* (2003) *Appl. Environm Microbiol.* 69:5269-5274
- Itakura *et al.* (1977). *Science* 198, 1056-1063.
- Keil *et al.* (1986), *Nucl. Acids Res.* 14, 5641-5650.
- Klosgen *et al.* (1989), *Mol. Gen. Genet.* 217, 155-161.
- 5 Klosgen y Weil (1991), *Mol. Gen. Genet.* 225, 297-304.
- Kota *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1840-1845.
- Kotiranta *et al.* (1998) *Infect Immunol.* 66: 4895-4902.
- Last *et al.* (1990) *Theor. Appl. Genet.* 81, 581-588
- Lereclus *et al.* (1989) *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 211-218.
- 10 Lereclus *et al.* (1995) *Bio/Technology* 13, 67-71.
- Luckevich y Beveridge (1989) *J. Bacteriol.* 171, 6656-6667.
- Mahillon *et al.* (1989), *FEMS Microbiol. Letters* 60, 205-210.
- Maxam y Gilbert (1980) *Methods in Enzymol.* 65, 499-560.
- McBride *et al.* (1995) *Bio/Technology* 13, 362
- 15 McPherson *et al.* (2000) *PCR - Basics: From Background to Bench*, Primera Edición, Springer Verlag, Alemania
- Mesnage *et al.* (1998) *J. Bacteriol.* 180: 52-58
- Mesnage, S. *et al.* (2001) *Microbiology* 147: 1343-1351
- Mignot *et al.* (2002) *Mol. Microbiol.* 43: 1615-1627
- Morris *et al.* (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 328-333.
- 20 Msadek *et al.* (1990) *J. Bacteriol.* 172: 824-834
- Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Research* 17(2), 477-498.
- Nakamura *et al.* (2000) *Nucl. Acids Res.* 28, 292.
- Algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443-453
- Neuhaus & Rogers (1998) *Plant Mol. Biol.* 38, 127-144.
- 25 Odell *et al.* (1985) *Nature* 313, 810-812.
- Oelmuller *et al.* (1993) *Mol. Gen. Genet.* 237, 261-272.
- Park *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6876-6881.
- Pei y Blaser. (1990) *J. Clin Invest.* 85: 1036-1043
- 30 Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY
- Sanger (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74(12), 5463-5467.
- Sara y Sleytr (2000) *J. Bacteriol.* 182: 859-868
- 35 Schnepf *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Shcherban *et al.* (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92, 9245-9249.
- Shimamoto *et al.* (1989) *Nature* 338, 274-276

- Sleytr y Beveridge (1999) Trends in Microbiology 7, 253-260.
- Stanssens *et al.*(1989) Nucleic Acids Research 12, 4441-4454.
- Sun *et al.* (2001) Acta Microbiol Sin. 41: 141-147.
- Sutliff *et al.* (1991) Plant Molec. Biol. 16, 579-591.
- 5 Tavladoraki *et al.* (1998), FEBS Lett. 426, 62-66.
- Terashima *et al.* (1999), Appl. Microbiol. Biotechnol. 52, 516-523.
- Travers *et al.* (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53: 1263-1266.
- Vaeck *et al.* (1987) Nature 328, 33-37.
- Van Den Broeck *et al.* (1985) Nature 313, 358.
- 10 Van Rie *et al.* (1990) Science 247, 72.
- Velten *et al.* (1984) EMBO J 3, 2723-2730
- Velten y Schell (1985), Nucleic Acids Research 13, 6981-6998
- Verdaguer *et al.* (1998), Plant Mol. Biol. 37, 1055-1067
- Von Heijne, Gunnar (1986) Nucleic Acids Research. 14:11, 4683-4690
- 15 Wada *et al.* (1990). Nucl. Acids Res. 18, 2367-1411.
- Waterfield *et al.*(2001) Trends Microbiol 9, 185-91.
- White *et al.*(1989). Trends in Genet. 5, 185-189
- Wong *et al.*(1992), Plant Molec. Biol.20, 81-93.
- Xu *et al.* (2004) Parasitology Research 92(1):53-7.
- 20 Zhang *et al.* (1991) The Plant Cell 3, 1155-1165.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Instituto de Biotecnología

<120> Nueva proteínas bacterianas con actividad plaguicida

<130> PCT06/1128

5 <150> US 60/697,391

<151 > 08/07/2005

<160> 15

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

10 <211> 3117

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221 > CDS

15 <222> (325)..(2916)

<400> 1

actttattca ttttatattt gagtattact gatataataa taatacgatt aaaagactga 60

attatcagaa tgtgtcgaat ctcttttga gaaagttctt gataacgaat ggttttgat 120

agtatgatga actgtttca gaaaatggta tttaaacctt atattfacat ctaacggttt 180

atatcatttt ttatgtgaa ctactttca ttatagtatt ttgtttatg tttttatgt 240

ttatggctt ttctaactag ctagttttca aatttaatat gatgtgaaac tagtagcata 300

ttcctgaagg aggaaattta taaa atg gca aag act aac tct tac aaa aaa	351
Met Ala Lys Thr Asn Ser Tyr Lys Lys	
1 5	
gta atc gca ggt aca atg aca gca gca atg gta gca ggt gtt gtt tct	399
Val Ile Ala Gly Thr Met Thr Ala Ala Met Val Ala Gly Val Val Ser	
10 15 20 25	
cca gta gca gca gca ggt aaa tcg ttc cca gac gtt cca gct ggt cat	447
Pro Val Ala Ala Ala Gly Lys Ser Phe Pro Asp Val Pro Ala Gly His	
30 35 40	
tgg gga tta gat tct atc aat tac tta gta gat aaa ggt gca atc gaa	495
Trp Gly Leu Asp Ser Ile Asn Tyr Leu Val Asp Lys Gly Ala Ile Glu	
45 50 55	
ggt aag cca gat ggt aca tac gct ccg gct gaa gaa att gat cgt gct	543
Gly Lys Pro Asp Gly Thr Tyr Ala Pro Ala Glu Glu Ile Asp Arg Ala	
60 65 70	
tct gct gcg aaa att atg gca att aca tta ggt tta aaa gtt gaa gag	591
Ser Ala Ala Lys Ile Met Ala Ile Thr Leu Gly Leu Lys Val Glu Glu	
75 80 85	
ggt gca caa cca tct ttc aaa gat gct aaa aat cat tgg gct tct aaa	639
Gly Ala Gln Pro Ser Phe Lys Asp Ala Lys Asn His Trp Ala Ser Lys	
90 95 100 105	
tac att gca gcg gtt gaa aaa gcg ggt gtt gtt aga ggt gat ggt aaa	687
Tyr Ile Ala Ala Val Glu Lys Ala Gly Val Val Arg Gly Asp Gly Lys	
110 115 120	
gaa aac ttc tct cca gat aaa aag att gac cgt gct tct ttc gct tct	735
Glu Asn Phe Ser Pro Asp Lys Lys Ile Asp Arg Ala Ser Phe Ala Ser	
125 130 135	

atg atc gta ggt gct tat aac tta aaa gat aaa gtt aac ggc gag tta	783
Met Ile Val Gly Ala Tyr Asn Leu Lys Asp Lys Val Asn Gly Glu Leu	
140 145 150	
gtt aca aaa ttt gaa gat tta tta gac cat tgg ggt gaa gaa aaa gct	831
Val Thr Lys Phe Glu Asp Leu Leu Asp His Trp Gly Glu Glu Lys Ala	
155 160 165	
aac atc cta atc cat ctt gga ctt tct gaa gga aca gga gga aac aag	879
Asn Ile Leu Ile His Leu Gly Leu Ser Glu Gly Thr Gly Gly Asn Lys	
170 175 180 185	
tgg gag cca aat aaa tct gta tct cgt gca gaa gca gct aaa ttt atc	927
Trp Glu Pro Asn Lys Ser Val Ser Arg Ala Glu Ala Ala Lys Phe Ile	
190 195 200	
gca gta gca gat aaa aaa tat ggc aaa aaa gat aat gca caa gca tat	975
Ala Val Ala Asp Lys Lys Tyr Gly Lys Lys Asp Asn Ala Gln Ala Tyr	
205 210 215	
gta act gat gtg aaa gtt tct gaa cca acg aaa tta aca tta act ggt	1023
Val Thr Asp Val Lys Val Ser Glu Pro Thr Lys Leu Thr Leu Thr Gly	
220 225 230	
act ggt tta gat aag ctt gct gct gaa gat gta act ctt gag gga gac	1071
Thr Gly Leu Asp Lys Leu Ala Ala Glu Asp Val Thr Leu Glu Gly Asp	
235 240 245	
aaa gct gtt gcg att gaa gca agt gct gac ggt act tct gca gtt gta	1119
Lys Ala Val Ala Ile Glu Ala Ser Ala Asp Gly Thr Ser Ala Val Val	
250 255 260 265	
aca ctt ggt ggt aaa gtt gct cca aat aaa aat ctt act gta aaa gtg	1167
Thr Leu Gly Gly Lys Val Ala Pro Asn Lys Asn Leu Thr Val Lys Val	
270 275 280	

aaa aat caa tca ttc gta acg aaa ttt gta tac gaa gtg aaa aaa tta	1215
Lys Asn Gln Ser Phe Val Thr Lys Phe Val Tyr Glu Val Lys Lys Leu	
285 290 295	
gca gta gaa aaa ctt aca ttt gat gat gat cgt gct ggt caa gca gtt	1263
Ala Val Glu Lys Leu Thr Phe Asp Asp Asp Arg Ala Gly Gln Ala Val	
300 305 310	
gct ttc aaa tta aac gat gaa aaa ggt aac gct gat gtt gaa tac tta	1311
Ala Phe Lys Leu Asn Asp Glu Lys Gly Asn Ala Asp Val Glu Tyr Leu	
315 320 325	
aac tta gca gac cat gac gtc aaa ttt gta gca aat aac tta gat ggt	1359
Asn Leu Ala Asp His Asp Val Lys Phe Val Ala Asn Asn Leu Asp Gly	
330 335 340 345	
tca tca gca aac atc ttt gaa ggt gga gta gct act tct act aca ggc	1407
Ser Ser Ala Asn Ile Phe Glu Gly Gly Val Ala Thr Ser Thr Thr Gly	
350 355 360	
aaa cta gct gtt ggc att aaa cca gct gac tac aaa gta gaa gta caa	1455
Lys Leu Ala Val Gly Ile Lys Pro Ala Asp Tyr Lys Val Glu Val Gln	
365 370 375	
gtt aca aaa cgc ggt ggt tta aca gtt tct aac act ggt att att aca	1503
Val Thr Lys Arg Gly Gly Leu Thr Val Ser Asn Thr Gly Ile Ile Thr	
380 385 390	
gtg aaa aac ctt gat aca cca gct tct gca atc aaa aat gct gta ttt	1551
Val Lys Asn Leu Asp Thr Pro Ala Ser Ala Ile Lys Asn Ala Val Phe	
395 400 405	
gca tta gat gct gat aat gat ggt gtt gta aac tac ggt agc aaa ctt	1599
Ala Leu Asp Ala Asp Asn Asp Gly Val Val Asn Tyr Gly Ser Lys Leu	
410 415 420 425	

tct ggt aaa gac ttt gct tta aat agc caa aac tta gtt gtt ggt gaa	1647
Ser Gly Lys Asp Phe Ala Leu Asn Ser Gln Asn Leu Val Val Gly Glu	
430 435 440	
aaa gca tct ctt aat aaa tta gtt gct aca att gct gga gaa gat aaa	1695
Lys Ala Ser Leu Asn Lys Leu Val Ala Thr Ile Ala Gly Glu Asp Lys	
445 450 455	
gta gtt gat cca gga tca att agc att aag tct tca aac cac ggt att	1743
Val Val Asp Pro Gly Ser Ile Ser Ile Lys Ser Ser Asn His Gly Ile	
460 465 470	
att tct gla gta aat aac tac att act gct gag gct gct ggt gag gca	1791
Ile Ser Val Val Asn Asn Tyr Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Glu Ala	
475 480 485	
aca ctt act att aaa gta ggt gac gca acg aaa gat gtt aaa ttt aaa	1839
Thr Leu Thr Ile Lys Val Gly Asp Ala Thr Lys Asp Val Lys Phe Lys	
490 495 500 505	
gta acg act gat tct cgt aaa tta gca tca gta aaa gct aac cca gat	1887
Val Thr Thr Asp Ser Arg Lys Leu Ala Ser Val Lys Ala Asn Pro Asp	
510 515 520	
aaa tta caa gtt gtt caa aat aaa aaa tta cct gtt aca ttc gta aca	1935
Lys Leu Gln Val Val Gln Asn Lys Lys Leu Pro Val Thr Phe Val Thr	
525 530 535	
act gac caa tat ggc gat cca ttt ggt gct aac cca gat gca att aaa	1983
Thr Asp Gln Tyr Gly Asp Pro Phe Gly Ala Asn Pro Asp Ala Ile Lys	
540 545 550	
gaa gtt ctt ccg aaa act ggt gta gtt gca gaa ggt gga tta gat gta	2031
Glu Val Leu Pro Lys Thr Gly Val Val Ala Glu Gly Gly Leu Asp Val	
555 560 565	



gaa atc gtc caa gag aca att gct att aaa tct gta aac ttc aaa cca	2511
Glu Ile Val Gln Glu Thr Ile Ala Ile Lys Ser Val Asn Phe Lys Pro	
715                      720                      725	
gtt caa aca gaa aac ttc gtt gag aag aaa atc aac atc ggt act gtg	2559
Val Gln Thr Glu Asn Phe Val Glu Lys Lys Ile Asn Ile Gly Thr Val	
730                      735                      740                      745	
tta gag ctt gag aag agt aac ctt gat gat atc gta aaa ggt att aac	2607
Leu Glu Leu Glu Lys Ser Asn Leu Asp Asp Ile Val Lys Gly Ile Asn	
750                      755                      760	
tta acg aaa gat aca caa cat aaa gta cgt gtt gta aaa tct ggt gac	2655
Leu Thr Lys Asp Thr Gln His Lys Val Arg Val Val Lys Ser Gly Asp	
765                      770                      775	
gag caa ggt aaa ctt tac tta gat aga aac ggc gat gct gta ttt aac	2703
Glu Gln Gly Lys Leu Tyr Leu Asp Arg Asn Gly Asp Ala Val Phe Asn	
780                      785                      790	
gct ggc gat gta aac ctt ggt tat gta aca gta tct caa aca agt gat	2751
Ala Gly Asp Val Asn Leu Gly Tyr Val Thr Val Ser Gln Thr Ser Asp	
795                      800                      805	
tct gca ctt cca aac ttc aag gca gac ctt tac gat act tta act act	2799
Ser Ala Leu Pro Asn Phe Lys Ala Asp Leu Tyr Asp Thr Leu Thr Thr	
810                      815                      820                      825	
aag tac act gac aaa ggt aca tta gta ttc aaa gta tta ggt gag aaa	2847
Lys Tyr Thr Asp Lys Gly Thr Leu Val Phe Lys Val Leu Gly Glu Lys	
830                      835                      840	
gat gtt cta aca agc gaa att ggt tca caa gct gta cac gtg aac gtt	2895
Asp Val Leu Thr Ser Glu Ile Gly Ser Gln Ala Val His Val Asn Val	
845                      850                      855	

ctt aac aac cca aat cta taa gtcgattata gataaagtga aaaatcagtg 2946  
 Leu Asn Asn Pro Asn Leu  
 860

gggatgaatt cccactgatt ttttgctgt caatagcgaa aagaagcctc ttgtgaaaaa 3006  
 tacaagaggc tcctttctat ttcttaaact taaacatac cccactcaaa ttogaatcac 3066  
 tatacacgaa caataccatg ttaatgtgt tgccttcat gtattgatat a 3117

<210> 2

<211> 863

<212> PRT

5 <213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 2

Met Ala Lys Thr Asn Ser Tyr Lys Lys Val Ile Ala Gly Thr Met Thr  
 1 5 10 15

Ala Ala Met Val Ala Gly Val Val Ser Pro Val Ala Ala Ala Gly Lys  
 20 25 30

Ser Phe Pro Asp Val Pro Ala Gly His Trp Gly Leu Asp Ser Ile Asn  
 35 40 45

Tyr Leu Val Asp Lys Gly Ala Ile Glu Gly Lys Pro Asp Gly Thr Tyr  
 50 55 60

Ala Pro Ala Glu Glu Ile Asp Arg Ala Ser Ala Ala Lys Ile Met Ala  
 65 70 75 80

Ile Thr Leu Gly Leu Lys Val Glu Glu Gly Ala Gln Pro Ser Phe Lys  
 85 90 95

Asp Ala Lys Asn His Trp Ala Ser Lys Tyr Ile Ala Ala Val Glu Lys  
100 105 110

Ala Gly Val Val Arg Gly Asp Gly Lys Glu Asn Phe Ser Pro Asp Lys  
115 120 125

Lys Ile Asp Arg Ala Ser Phe Ala Ser Met Ile Val Gly Ala Tyr Asn  
130 135 140

Leu Lys Asp Lys Val Asn Gly Glu Leu Val Thr Lys Phe Glu Asp Leu  
145 150 155 160

Leu Asp His Trp Gly Glu Glu Lys Ala Asn Ile Leu Ile His Leu Gly  
165 170 175

Leu Ser Glu Gly Thr Gly Gly Asn Lys Trp Glu Pro Asn Lys Ser Val  
180 185 190

Ser Arg Ala Glu Ala Ala Lys Phe Ile Ala Val Ala Asp Lys Lys Tyr  
195 200 205

Gly Lys Lys Asp Asn Ala Gln Ala Tyr Val Thr Asp Val Lys Val Ser  
210 215 220

Glu Pro Thr Lys Leu Thr Leu Thr Gly Thr Gly Leu Asp Lys Leu Ala  
225 230 235 240

Ala Glu Asp Val Thr Leu Glu Gly Asp Lys Ala Val Ala Ile Glu Ala  
245 250 255

Ser Ala Asp Gly Thr Ser Ala Val Val Thr Leu Gly Gly Lys Val Ala  
260 265 270

Pro Asn Lys Asn Leu Thr Val Lys Val Lys Asn Gln Ser Phe Val Thr  
 275 280 285

Lys Phe Val Tyr Glu Val Lys Lys Leu Ala Val Glu Lys Leu Thr Phe  
 290 295 300

Asp Asp Asp Arg Ala Gly Gln Ala Val Ala Phe Lys Leu Asn Asp Glu  
 305 310 315 320  
 Lys Gly Asn Ala Asp Val Glu Tyr Leu Asn Leu Ala Asp His Asp Val  
 325 330 335

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

Gly Gly Val Ala Thr Ser Thr Thr Gly Lys Leu Ala Val Gly Ile Lys  
 355 360 365

Pro Ala Asp Tyr Lys Val Glu Val Gln Val Thr Lys Arg Gly Gly Leu  
 370 375 380

Thr Val Ser Asn Thr Gly Ile Ile Thr Val Lys Asn Leu Asp Thr Pro  
 385 390 395 400

Ala Ser Ala Ile Lys Asn Ala Val Phe Ala Leu Asp Ala Asp Asn Asp  
 405 410 415

Gly Val Val Asn Tyr Gly Ser Lys Leu Ser Gly Lys Asp Phe Ala Leu  
 420 425 430

Asn Ser Gln Asn Leu Val Val Gly Glu Lys Ala Ser Leu Asn Lys Leu  
 435 440 445

Val Ala Thr Ile Ala Gly Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Gly Ser Ile  
 450 455 460

Ser Ile Lys Ser Ser Asn His Gly Ile Ile Ser Val Val Asn Asn Tyr  
 465                      470                      475                      480

Ile Thr Ala Glu Ala Ala Gly Glu Ala Thr Leu Thr Ile Lys Val Gly  
                                  485                      490                      495

Asp Ala Thr Lys Asp Val Lys Phe Lys Val Thr Thr Asp Ser Arg Lys  
                                  500                      505                      510

Leu Ala Ser Val Lys Ala Asn Pro Asp Lys Leu Gln Val Val Gln Asn  
                                  515                      520                      525

Lys Lys Leu Pro Val Thr Phe Val Thr Thr Asp Gln Tyr Gly Asp Pro  
                                  530                      535                      540

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

Val Val Ala Glu Gly Gly Leu Asp Val Val Thr Thr Asp Ser Gly Ser  
                                  565                      570                      575

Ile Gly Thr Lys Thr Leu Asp Val Thr Gly Asn Glu Val Gly Glu Gly  
                                  580                      585                      590

Thr Val His Phe Gln Asn Gly Asn Gly Ala Thr Leu Gly Ser Leu Tyr  
                                  595                      600                      605

Val Asn Val Thr Glu Gly Asn Val Ala Phe Lys Asn Phe Glu Leu Val  
                                  610                      615                      620

Ser Lys Val Gly Gln Tyr Gly Ala Ser Pro Asp Thr Lys Leu Asp Leu  
 625                      630                      635                      640

Asn Val Ser Asp Thr Val Ala Tyr Gln Leu Ser Lys Tyr Thr Ser Asp  
                                  645                      650                      655

Arg Val Tyr Ser Asp Pro Glu Asn Leu Glu Gly Tyr Ala Val Glu Ser  
 660 665 670

Lys Asn Glu Lys Val Ala Thr Ala Lys Ile Val Gly Asn Lys Val Val  
 675 680 685

Val Thr Gly Lys Ala Pro Gly Lys Val Asp Ile His Leu Thr Lys Asn  
 690 695 700

Gly Ala Thr Ala Gly Lys Ala Thr Ile Glu Ile Val Gln Glu Thr Ile  
 705 710 715 720

Ala Ile Lys Ser Val Asn Phe Lys Pro Val Gln Thr Glu Asn Phe Val  
 725 730 735

Glu Lys Lys Ile Asn Ile Gly Thr Val Leu Glu Leu Glu Lys Ser Asn  
 740 745 750

Leu Asp Asp Ile Val Lys Gly Ile Asn Leu Thr Lys Asp Thr Gln His  
 755 760 765

Lys Val Arg Val Val Lys Ser Gly Asp Glu Gln Gly Lys Leu Tyr Leu  
 770 775 780

Asp Arg Asn Gly Asp Ala Val Phe Asn Ala Gly Asp Val Asn Leu Gly  
 785 790 795 800

Tyr Val Thr Val Ser Gln Thr Ser Asp Ser Ala Leu Pro Asn Phe Lys  
 805 810 815

Ala Asp Leu Tyr Asp Thr Leu Thr Thr Lys Tyr Thr Asp Lys Gly Thr  
 820 825 830

Leu Val Phe Lys Val Leu Gly Glu Lys Asp Val Leu Thr Ser Glu Ile  
 835 840 845

Gly Ser Gln Ala Val His Val Asn Val Leu Asn Asn Pro Asn Leu

850

855

860

<210> 3

<211> 34

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 3

acgctctaga tagcaggtaa atcattccca gacg 34

10 <210> 4

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador de PCR

<400> 4

acgctctaga tcgccgtatt ggtcagttgt tac 33

<210> 5

<211> 30

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR

<400> 5

25 gctctagatg agagtgcttt ataggaaaat 30

<210> 6

<211>31

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador de PCR

<400> 6

gctctagatc ttcagccgga gcgtatgtac c 31

<210> 7

35 <211>31

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 5 <400> 7  
 gctctagata ctgctgaggc tgctggtgag g 31  
 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 8  
 gctctagatc ctcgacctgc ttactatca 30  
 15 <210> 9  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador de PCR  
 <400> 9  
 tctttgcat ggtataaatt tcctcctc 29  
 <210> 10  
 <211> 28  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 10  
 30 ttataccatg gcaaagacta actcttac 28  
 <210> 11  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 11

aaaactgcag aagtaccgtc agcacttgct tc 32  
 <210> 12  
 <211>31  
 <212> ADN  
 5 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador de PCR  
 <400> 12  
 aacgctgcag ttgtaacact tggtggtaaa g 31  
 10 <210> 13  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador de PCR  
 <400> 13  
 cgggatcctc ctcgacctgc gtcactatca 30  
 <210> 14  
 <211> 12  
 20 <212> PRT  
 <213> *Bacillus thuringiensis*  
 <400> 14  
**Ala Gly Lys Ser Phe Pro Asp Val Pro Ala Gly His**  
**1 5 10**  
 <210> 15  
 25 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus thuringiensis*  
 <400> 15  
**Lys Leu Pro Val Thr Phe Val Thr Thr Asp Gln Tyr Gly Asp Pro Tyr**  
**1 5 10 15**  
 30 Gly Ala Asn

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de una proteína insecticida para controlar plagas de insectos, en el que dicha proteína se caracteriza por:
  - a) ser insecticida para *Epilachna varivestis*, y
  - b) tener al menos 70% de identidad de secuencia con la proteína de la capa S de SEC ID No. 2.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha proteína se caracteriza por:
  - a) tener al menos 80% de identidad de secuencia con la proteína de la capa S de SEC ID No. 2, y
  - b) un peso molecular de alrededor de 50 a alrededor de 120 kDa.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha proteína tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la proteína de SEC ID NO: 2.
- 10 4. El uso de la reivindicación 2, en el que dicha proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2 desde una posición de aminoácidos entre la posición 1 de aminoácidos y la posición 31 de aminoácidos a la posición 863 de aminoácidos.
5. El uso de la reivindicación 2, en el que dicha proteína comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.
- 15 6. Uso de un ADN que codifica la proteína citada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para controlar plagas de insectos.
7. Uso de un gen quimérico que comprende:
  - a) una secuencia codificante que comprende el ADN citado en la reivindicación 6, y
  - b) un promotor que permite la expresión en células vegetales, para controlar plagas de insectos.
- 20 8. El uso de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia codificante es una secuencia de ADN sintética que se ha optimizado para la expresión en una planta hospedante.
9. Uso de una planta, semilla o célula vegetal transgénica que comprende el gen quimérico citado en la reivindicación 7 u 8, para controlar plagas de insectos.
10. El uso de la reivindicación 9, en el que dicha planta, semilla o célula se selecciona del grupo de: maíz, algodón, soja, arroz, colza, coliflor, y repollo.
- 25 11. Un método para proteger plantas frente al daño provocado por plagas de insectos de plantas, que se alimentan de la especie vegetal a la que dichas plantas pertenecen, que comprende la etapa de expresar el gen quimérico citado en la reivindicación 7 u 8 en células de dichas plantas.
12. Un método para obtener una planta protegida frente al daño provocado por plagas de insectos de plantas, que se alimentan de la especie vegetal a la que pertenece dicha planta, que comprende la etapa de transformar dicha planta con el gen quimérico citado en la reivindicación 7 u 8.
- 30 13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha proteína se produce en una planta, o el uso de la reivindicación 7 u 8, en el que el gen quimérico se expresa en una planta.
14. Un procedimiento para aislar proteínas insecticidas tóxicas para *Epilachna varivestis*, comprendiendo tal procedimiento la etapa de identificar cultivos de bacilos insecticidas para genes de la proteína de la capa S, en el que dichos genes son reconocidos usando tecnología de PCR y cebadores específicos para las regiones de homología de la capa S en SEC ID NO: 1, en el que dichas regiones de homología de la capa S son las regiones en SEC ID NO: 1 que codifican las siguientes regiones en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2: la región de la posición 34 a 76 de aminoácidos, la región de la posición 95 a 136 de aminoácidos, y la región de la posición 162 de aminoácidos a la posición 198 de aminoácidos, en el que dichos genes de la proteína de la capa S se transforman en bacterias, y dichas bacterias se seleccionan para la expresión de la proteína de la capa S, y las bacterias o las proteínas de la capa S purificadas o semipurificadas se ensayan para determinar la actividad frente a *E. varivestis*.
- 35 40 15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que dichos bacilos son negativos para los genes Cry o VIP en el análisis de PCR.
- 45 16. Un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a la proteína de SEC ID No. 2.

17. Una proteína insecticida que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID No. 2, en la que dicha proteína es insecticida para *Epilachna varivestis*.