

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 145**

51 Int. Cl.:

**A01N 43/50** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C07K 14/325** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10712218 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2419441**

54 Título: **Toxinas Cry insecticidas DIG-3**

30 Prioridad:

**17.04.2009 US 170189 P**

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

**24.03.2015**

73 Titular/es:

**DOW AGROSCIENCES LLC (100.0%)  
9330 Zionsville Road  
Indianapolis, IN 46268-1054, US**

72 Inventor/es:

**LIRA, JUSTIN;  
BUTLER, HOLLY;  
SMITH, DOUG;  
NARVA, KENNETH y  
MEADE, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 532 145 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

Toxinas Cry insecticidas DIG-3.

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 Esta solicitud reivindica utilidad a la solicitud de patente provisional de EE.UU. No.61/170.189, presentada el 17 de abril de 2009.

**Campo de la invención**

Esta invención se refiere a nuevas toxinas Cry insecticidas y a su empleo para controlar insectos.

**Antecedentes de la invención**

10 El *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) es una bacteria que lleva la tierra vegetal, que produce proteínas cristal pesticidas conocidas como delta endotoxinas o proteínas Cry. Las proteínas Cry son intoxicantes orales que ejercen su función actuando sobre células del intestino medio de insectos susceptibles. Una lista extensa de delta endotoxinas se mantiene y actualiza regularmente en [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/intro.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html).

15 El barrenador europeo del maíz (ECB), *Ostrinia nubilalis* (Hübner), es la plaga de insectos más dañina del maíz en los Estados Unidos y Canadá, y ocasiona una pérdida de ingresos estimada en 1 billón de dólares cada año debida a pérdida del rendimiento de cultivos y a los gastos ocasionados para el control de los insectos (Witkowski et al., 2002). Genes que expresan maíz transgénico codifican las proteínas Cry, más especialmente las Cry1Ab, Cry1Ac o Cry1F, que proporcionan niveles comerciales de eficacia contra ECB,

20 A pesar del éxito del maíz transgénico resistente a ECB, la posibilidad del desarrollo de poblaciones resistentes a insectos amenaza la durabilidad a largo plazo de proteínas Cry en el control de ECB y crea la necesidad de descubrir y desarrollar nuevas proteínas Cry para el control de ECB y otras plagas. La resistencia de insectos a proteínas Cry de *B.t.* puede desarrollarse mediante varios mecanismos (Heckel et al., 2007, Pigott y Ellar, 2007). Clases de proteínas receptoras múltiples de proteínas Cry han sido identificadas dentro de insectos, y existen muchos ejemplos dentro de cada clase de receptores. La resistencia a una proteína Cry particular puede desarrollarse, por ejemplo, por medio de una mutación dentro de la parte de unión de la toxina de un dominio de cadherina de una proteína receptora. Otros medios de resistencia pueden obtenerse a través de una proteasa que procesa una protoxina. Así pues, la resistencia a toxinas Cry en especies de lepidópteros tiene una base genética compleja, con al menos cuatro genes de resistencia diferentes, importantes. Insectos lepidópteros resistentes a proteínas Cry han sido desarrollados en el campo dentro de las especies *Plutella xylostella* (Tabashnik, 1994), *Trichoplusia ni* (Janmaat y Myers 2003, 2005), y *Helicoverpa zea* (Tabashnik et al., 2008). El desarrollo de nuevas proteínas Cry de alta potencia proporcionaría útiles adicionales para la regulación de ECB y otras plagas de insectos. Las proteínas Cry con modos de acción diferentes producidas en combinación con maíz transgénico evitarían desarrollo de resistencia de insectos a ECB y protegería la utilidad a largo plazo de la metodología a *B.t.* para el control de plagas de insectos.

**Compendio breve de la invención**

35 La presente solicitud se refiere a toxinas Cry insecticidas, que incluyen la toxina designada en esta memoria como DIG-3 así como variantes de DIG-3, ácidos nucleicos que codifican estas toxinas, métodos de regulación de plagas empleando las toxinas, métodos de producción de las toxinas en células de huéspedes transgénicos, y plantas transgénicas que producen las toxinas. La secuencia de aminoácidos predicha de la toxina DIG-3 de tipo natural se indica en SEQ ID NO:2.

40 Como se describe en el Ejemplo 1, se aisló un ácido nucleico que codifica la proteína DIG-3 de una cepa de *B.t.* diseñada internamente por Dow AgroScience LLC como PS46L. Se determinó la secuencia de ácidos nucleicos de la región codificante de longitud total y se dedujo la secuencia de proteínas de longitud total de la secuencia de ácidos nucleicos. La toxina DIG-3 tiene alguna semejanza con Cry1BII (Genbank Accession No. AAM93496) y otras proteínas de tipo Cry1B de *B. thuringiensis* ([http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/Bt/intro.html](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html)).

45 También se describen en esta memoria variantes activas como insecticida de la toxina DIG-3, y se denominan colectivamente como toxinas DIG-3.

50 Las toxinas DIG-3 pueden emplearse también en combinación con metodologías de RNAi para el control de otras plagas de insectos. Por ejemplo, puede emplearse DIG-3 en plantas transgénicas en combinación con un dsRNA para la expresión de un gen esencial en la raíz de maíz o de un gen esencial en una plaga de insectos. Tales genes diana incluyen, por ejemplo, ATPase, ARF-1, Act42A, CHD3, EF-1 $\alpha$  y TFIIB vacuolares. Un ejemplo de un gen diana adecuado es ATPase vacuolar, descrito en el documento WO2007/035.650.

Se indica en esta memoria que las toxinas DIG-3 son activas contra poblaciones de barrenador europeo del maíz y la palomilla dorso de diamante que son resistentes a las toxinas Cry1F y Cry1A, Por consiguiente, las toxinas DIG-3 son candidatos ideales para emplear para controlar plagas de lepidópteros. Las toxinas pueden emplearse solas o

en combinación con otras toxinas Cry tales como Cry1F, Cry1Ab y Cry1Ac, para controlar el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes.

Fragmentos activos desde el punto de vista insecticida de SEQ ID NO:2 y nucleótidos que codifican tales fragmentos, son aspectos de la invención.

5 En una realización la invención proporciona un polipéptido de toxina DIG-3 aislado que comprende un segmento de toxina de núcleo seleccionado entre el grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de restos 113 a 643 de SEQ ID NO: 2;

(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de 90% con la secuencia de aminoácidos de restos 113 a 643 de SEQ ID NO: 2;

10 (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de restos 113 a 643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones o modificaciones que no afectan adversamente a la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO: 2.

En una realización la invención proporciona un polipéptido de toxina DIG-3 aislado que comprenden un segmento de toxina de núcleo seleccionado del grupo que consiste en:

15 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de restos 73 a 643 de SEQ ID NO:2;

(b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de 90% con la secuencia de aminoácidos de restos 73 a 643 de SEQ ID NO:2;

20 (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de restos 73 a 643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones o modificaciones que no afectan adversamente a la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO:2.

En otra realización la invención proporciona un polipéptido de toxina DIG-3 aislado que comprende un segmento de toxina de núcleo de DIG-3 seleccionado de grupos que consisten en:

(a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de restos 1 a 643 de SEQ ID NO:2;

25 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de secuencia de 90% con la secuencia de aminoácidos de restos 1 a 643 de SEQ ID NO:2;

(c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de restos 1 a 643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones o modificaciones que no afectan adversamente a la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO:2.

30 Por "aislado" los solicitantes indican que las moléculas de polipéptido o de DNA han sido retiradas de su medio ambiente nativo y han sido colocadas en un medio ambiente diferente por la mano del hombre.

En otra realización la invención proporciona una planta que comprende una toxina DIG-3.

En otra realización la invención proporciona un método para regular una población de plaga que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad eficaz como pesticida de una toxina DIG-3.

En otra realización la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica una toxina DIG-3.

35 En otra realización la invención proporciona una construcción de DNA que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina de DIG-3 ligada de modo operable a un promotor que no procede de *Bacillus thuringiensis* y que es capaz de impulsar expresión en una planta. La invención proporciona asimismo una planta transgénica que comprende la construcción de DNA incorporada de modo estable en su genoma y un método de protección de una planta de una plaga que comprende introducir la construcción en dicha planta.

#### 40 Descripción breve de las secuencias

SEQ ID NO:1 Secuencia de DNA que codifica toxina DIG-3 de longitud total; 3771 nt.

SEQ ID NO:2 Secuencia de una proteína DIG-3 de longitud total; 1256 aa.

SEQ ID NO:3 Secuencia de DNA de DIG-3 de longitud total optimizada en una planta; 3771 nt,

SEQ ID NO:4 Segmento de protoxina Cry1Ab; 545 aa.

45 SEQ ID NO:5 Toxina química: Segmento de toxina de núcleo DIG-3/segmento de protoxina Cry1Ab; 1188 aa.

SEQ ID NO:6 Secuencia de DNA optimizada en dicotiledóneas que codifica el segmento de protoxina Cry1Ab; 1635 nt.

SEQ ID NO:7 Secuencia de DNA optimizada en el maíz que codifica el segmento de protoxina Cry1Ab; 1635 nt.

### Descripción detallada de la invención

5 Toxinas DIG-3 y variantes activas como insecticida.- Además de la toxina DIG-3 de longitud total de SEQ ID NO:2 la invención comprende variantes activas como insecticida. Por el término "variante" los solicitantes entienden incluir fragmentos, ciertos mutantes de delección e inserción, y ciertas proteínas de fusión. DIG-3 es una toxina Cry de tres dominios. clásica. Como preámbulo para describir variantes de la toxina DIG-3 que están incluidas en la invención, será útil revisar brevemente la arquitectura de las toxinas Cry de tres dominios, en general, y de la toxina de la proteína DIG-3 en particular.

10 La mayoría de las moléculas de proteína cristal delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* están compuestas de dos segmentos funcionales. La toxina de núcleo que resiste a proteasas es el primer segmento y corresponde a aproximadamente la primera mitad de la molécula de proteína. La molécula de protoxina de ~130 kDa completa es procesada rápidamente al segmento de núcleo resistente por proteasas en el tracto intestinal del insecto. El segmento que ha sido sometido a delección por este tratamiento se denominará en esta memoria como el "segmento de protoxina". Se opina que el segmento de protoxina participa en la formación del cristal de la toxina (Arvidson et al., 1989). El segmento de protoxina puede por tanto transportar una especificidad parcial para el insecto de la toxina limitando la accesibilidad del núcleo al insecto reduciendo el tratamiento de proteasa de la molécula de toxina (Haider et al., 1986) o reduciendo la solubilidad de la toxina (Aronson et al., 1991). Las toxinas de *B.t.*, incluso dentro de una cierta clase, varían en alguna extensión en longitud y en la posición precisa de la transición desde el segmento de toxina de núcleo al segmento de protoxina. La transición desde el segmento de toxina del núcleo al segmento de protoxina ocurre típicamente entre aproximadamente el 50% y aproximadamente el 60% de la toxina de longitud completa. SEQ ID NO:2 describe la secuencia de .1.256 aminoácidos del polipéptido de DIG-3 de longitud total, del que los 643 aminoácidos del extremo N terminal comprenden el segmento de toxina del núcleo de DIG-3. Los 1.929 nucleótidos del 5' terminal de SEQ ID NO:1 comprenden la región codificadora del segmento de toxina de núcleo.

Se han determinado las estructuras cristalinas tridimensionales de Cry1Aa1, Cry2Aa1, Cry3Aa1, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1. Estas estructuras de las toxinas de núcleo son notablemente similares y están compuestas de tres dominios distintos con las características descritas más adelante (revisada por de Maagd et al., 2003).

30 El Dominio I es un haz de siete hélices alfa donde la  $\alpha$ -hélice 5 está rodeada por seis hélices anfipáticas. Este dominio ha sido implicado en la formación de poros y comparte homología con otras proteínas formadoras de poros que incluyen hemolisinas y colicinas. El Dominio I de la proteína de DIG-3 comprende restos de aminoácidos 56 a 278 de SEQ ID NO:2.

35 El Dominio II está formado por tres hojas beta antiparalelas, empaquetadas juntamente en un prisma beta. Los lazos de este dominio desempeñan papeles importantes en la unión de receptores al intestino medio de insectos. En las proteínas Cry1A, los lazos expuestos en la superficie en los ápices de las hojas beta de Dominio II están implicados en la unión a receptores de cadherina de lepidópteros. El Dominio II de Cry3Aa se une a una metaloproteasa asociada a la membrana de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (escarabajo de la patata de Colorado) de un modo similar (Ochoa-Campuzano et al., 2007). El Dominio II comparte homología con ciertas proteínas que se unen a hidratos de carbono incluyendo vitelina y jacalina. El Dominio II de la proteína de DIG-3 comprende restos de aminoácidos 283 a 493 de SEQ ID NO.2.

40 El Dominio III es un sándwich beta de dos hojas beta antiparalelas. Estructuralmente este dominio está relacionado con los dominios de unión a hidratos de carbono de proteínas tales como glucanasas, galactosa oxidasa, sialidasa y otras. El Dominio III se une a ciertas clases de proteínas receptoras y participa acaso en la inserción de un pre-poro de una toxina oligómera que interacciona con una segunda clase de receptores, ejemplos de los cuales con aminopeptidasa y fosfatasa alcalina en el caso de las proteínas Cry1A (Pigott y Ellarm 2007). Receptores análogos del Dominio III de Cry han tenido todavía que ser identificados en coleópteros. Los bloques 2 y 3 conservados de la secuencia de *B. t.* se mapean cerca del término N y del término C del Dominio 2, respectivamente. De aquí, estos bloques 2 y 3 de secuencia conservada son regiones fronteras aproximadas entre los tres dominios funcionales. Estas regiones de DNA y homología de proteínas conservadas han sido utilizadas para llevar a cabo toxinas de *B.t.* recombinante (Patente de EE.UU. No. 6.090.931, y documentos WO 91/01.087, WO 95/06.730 y WO 1.998.022.595). El Dominio III de la proteína DIG-3 comprende restos de aminoácidos 503 a 641 de SEQ ID NO: 2.

45 Se ha indicado que la  $\alpha$ -hélice 1 del Dominio I se separa después de unión al receptor. Aronson et al (1999) han demostrado que Cry1Ac unida a BBMW estaba protegida de la escisión de la proteinasa K que comienza en el resto 59, justo después de la  $\alpha$ -hélice 1: resultados similares han sido citados para Cry1Ab. Gomez et al., (2002) han encontrado que oligómeros de Cry1Ab formados por unión al receptor BBMY carecían de la parte de  $\alpha$ -hélice 1 del Dominio I. También Soberon et al., (2007) han expuesto que mutantes de delección del extremo N terminal de Cry1Ab y Cry1Ac que carecen de aproximadamente 60 aminoácidos que componen la  $\alpha$ -hélice 1 en la estructura

tridimensional de Cry, son capaces de ensamblar monómeros de peso molecular de aproximadamente 60 kDa en pre-poros en ausencia de unión a cadherinas. Estos mutantes de delección del extremo N terminal se indicó que eran activos sobre larvas de insectos resistentes a Cry. Además, Diaz-Mendoza et al., (2007) han descrito fragmentos de Cry1Ab de 43 kDa y 46 kDa que retenían actividad sobre el barrenador de maíz mediterráneo (*Sesamia nonagrioides*). Se ha demostrado que estos fragmentos incluían restos de aminoácidos 116 a 423; sin embargo las secuencias de aminoácidos precisas no se habían aclarado y el mecanismo de actividad de estos fragmentos proteolíticos es desconocido. Los resultados de Gomez et al., (2002), Soberon et al., (2007) y Diaz-Mendoza et al., (2007) contrastan con los de Hofte et al., (1986) que indicaron que la delección de 36 aminoácidos del extremo N terminal de Cry1Ab daba por resultado la pérdida de actividad insecticida.

- 10 Los solicitantes han deducido los comienzos y finales de  $\alpha$ -hélice 1,  $\alpha$ -hélice 2A,  $\alpha$ -hélice 2B y  $\alpha$ -hélice 3, y la ubicación de las regiones espaciadoras entre las del Dominio I de la toxina DIG-3 comparando la secuencia de la proteína DIG-3 con la secuencia proteínica de Cry8Ea1, para lo cual se conoce la estructura. Estas ubicaciones están descritas en la Tabla 1.

Tabla 1

- 15 Coordenadas de aminoácidos de  $\alpha$ -hélices proyectadas de proteína DIG-3

	$\alpha$ -hélice 1	espaciador	$\alpha$ -hélice 2A	espaciador	$\alpha$ -hélice 2B	espaciador	$\alpha$ -hélice 3
Restos de SEQ ID NO:2	53 - 70	71 -76	77 - 91	92 - 99	100 - 108	109 - 113	114 - 138

- 20 Variantes de delección del terminal amino de DIG-3.- En uno de sus aspectos la invención proporciona variantes de DIG-3 en las que la totalidad o parte de  $\alpha$ -hélice 1,  $\alpha$ -hélice 2A y  $\alpha$ -hélice 2B se han sometido a delección para mejorar la actividad insecticida y evitar el desarrollo de resistencia por insectos. Estas modificaciones se realizan para dar lugar a variantes de DIG-3 con atributos mejorados, tales como espectro mejorado para plagas diana, potencia, y tratamientos de resistencia de insectos. En algunas realizaciones de la invención, las modificaciones expuestas pueden afectar a la eficacia de la activación de protoxinas y a la formación de poros, llevando a intoxicación de insectos. Más específicamente, para proporcionar variantes de DIG-3 con atributos mejorados, se describen delecciones por etapas que separan parte de la secuencia de ácidos nucleicos que codifican el extremo N terminal de la proteína DIG-3. Las delecciones separan toda la  $\alpha$ -hélice 1 y la totalidad o parte de la  $\alpha$ -hélice 2 del Dominio I, al tiempo que mantienen la integridad estructural de las  $\alpha$ -hélices 3 a 7. La invención expuesta se refiere en parte, por tanto, a mejoras de la eficacia de la proteína Cry obtenida por realización de los componentes  $\alpha$ -helicales de Dominio I para una formación de poros más eficaz. Más específicamente, la invención expuesta se refiere en parte a proteínas DIG-3 mejoradas, diseñadas para delecciones del extremo N terminal en regiones con homología de la estructura secundaria putativa para la  $\alpha$ -hélice 1 y la  $\alpha$ -hélice 2 del Dominio I de proteínas Cry 1.

Las delecciones para mejorar las propiedades insecticidas de las toxinas DIG-3 pueden iniciarse antes que el comienzo predicho de  $\alpha$ -hélice 2A y pueden terminar después del final de  $\alpha$ -hélice 2B, pero preferiblemente no se extienden a  $\alpha$ -hélice 3.

- 35 En el diseño de secuencias codificadoras de variantes por delección del extremo N terminal, un codón iniciador de ATG, que codifica metionina, se inserta en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos ideada para codificar la variante de delección. Para secuencias diseñadas para emplear en plantas transgénicas, puede ser de utilidad adherirse a la "regla N-final" de Varshavsky (1997). Se opina que algunos aminoácidos pueden contribuir a la inestabilidad y degradación de proteínas en células eucarióticas cuando se exponen como el resto N-terminal de una proteína. Por ejemplo, los resultados recogidos de observaciones en células de levadura y de mamíferos indican que los aminoácidos que desestabilizan el extremo N-terminal son F, L, W, Y, R, K, H, I, N, Q, D, E y, posiblemente, P. Aun cuando las especificidades de los mecanismos de degradación de proteínas pueden diferir algo entre organismos, la conservación de identidad de aminoácidos que desestabilizan el extremo N-terminal indicada anteriormente, sugiere que mecanismos similares pueden actuar en células de plantas. Por ejemplo, Worley et al., (1998) han encontrado que en algunas plantas, la regla N-final incluye restos básicos y aromáticos. Existe la posibilidad de que la escisión proteolítica por proteasas de plantas cerca del comienzo de  $\alpha$ -hélice 3 de proteínas insecticidas de *B.t.* expuestas, puedan exponer un aminoácido N-terminal desestabilizante. Tal tratamiento puede hacer que las proteínas escindidas sufran un decaimiento rápido y limiten la acumulación de las proteínas insecticidas de *B.t.* a niveles insuficientes para realizar un control de insectos eficaz. Por consiguiente, para variantes de delección del extremo N terminal que comienzan con uno de los aminoácidos desestabilizantes, los solicitante prefieren añadir un codón que especifica un aminoácido G (glicina) entre la metionina de iniciación de la traducción y el aminoácido desestabilizante.

El Ejemplo 2 proporciona ejemplos específicos de variantes de delección del terminal amino de DIG-3 según la invención. Fragmentos útiles adicionales que retienen toxicidad pueden identificarse por digestión con tripsina o quimotripsina de la proteína cristalina de longitud total solubilizada. Otros ejemplos de fragmentos tóxicos de

proteína DIG-3 pueden codificarse por fragmentos de la región codificadora de DIG-3. Variantes de DIG-3 activas en insectos tendrán en su mayor parte una truncación corta N-terminal y una truncación larga C-terminal. El extremo N-terminal del fragmento tóxico más pequeño se identifica convenientemente por determinación de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína cristal soluble tratada con tripsina o quimotripsina mediante métodos de los que se dispone rutinariamente en la técnica.

Toxinas quiméricas.- Se han indicado previamente proteínas quiméricas que utilizan el segmento de toxina de núcleo de una toxina Cry fusionado al segmento de protoxina de otra toxina Cry.. Las variantes de DIG-3 incluyen toxinas que comprenden un segmento de toxina de núcleo N-terminal de una toxina DIG-3 (que puede ser de longitud total o tener las deleciones N-terminales anteriormente descritas) fusionado a un segmento de protoxina heteróloga en algún punto pasado el extremo del segmento de toxina de núcleo. La transición al segmento de protoxina heterólogo puede ocurrir en aproximadamente la unión de toxina de núcleo nativa/protoxina o, en la alternativa, una parte de la protoxina nativa (que se extiende pasado el segmento de toxina de núcleo) puede quedar retenida con la transición a la protoxina heteróloga que ocurre aguas abajo. Como ejemplo, una toxina quimérica de la invención expuesta tiene el segmento de toxina de núcleo total de DIG-3 (aminoácidos 1 - 643) y un segmento heterólogo de protoxina (aminoácidos 643 al término C). En una realización preferida el segmento heterólogo de protoxina proviene de una delta-endotoxina Cry1-Ab, como se ilustra en SEQ ID NO:5.

La SEQ ID NO:4 describe la secuencia de 545 aminoácidos de un segmento de protoxina de Cry1Ab útil en variantes de DIG-3 de la invención. Se presta atención a los últimos, aproximadamente 100 a 150 aminoácidos, de este segmento de protoxina, que son los más críticos para incluir en la toxina quimérica de la invención expuesta.

Variantes de sensibilidad de proteasas.- Las proteasas del tracto digestivo de insectos actúan ayudando al insecto a obtener los aminoácidos necesarios de la proteína de la dieta. Las proteasas digestivas de insectos mejor estudiadas son proteasas de serina que parece ser el tipo más común (Englemann y Geraerts (1980); particularmente en especies de lepidópteros. Los insectos coleópteros tienen tractos digestivos que son más neutros a los ácidos de lo que son los tractos digestivos de los lepidópteros. La mayoría de las larvas y adultos de coleópteros, por ejemplo el escarabajo de la patata de Colorado, tienen tractos digestivos medios ligeramente ácidos, y las proteasas de cisteína proporcionan la mayor actividad proteolítica (Wolfson y Murdock, 1990). Más precisamente, Thie y Houseman (1990) han identificado y caracterizado las proteasas de cisteína, semejantes a la catepsina B y a la catepsina H y a la proteasa de aspartilo, semejante a la catepsina D en el escarabajo de la patata de Colorado. Gillikin et al.,(1992) han caracterizado la actividad proteolítica en los tractos digestivos de larvas de las orugas de la raíz de maíz occidental y han encontrado principalmente proteasas de cisteína. La patente de EE.UU. No. 7.230.167 describe que una actividad de proteasa atribuida a la catepsina G existe en la oruga de la raíz del maíz occidental. La diversidad y los niveles de actividad diferentes de las proteasas de los tractos digestivos de insectos pueden influir en la sensibilidad de los insectos para una toxina de *B.t.* particular.

En otra realización de la invención, pueden obtenerse sitios de escisión de proteasas en ubicaciones deseadas que afectan al tratamiento con proteínas dentro del tracto digestivo medio de larvas susceptibles de ciertas plagas de insectos. Estos sitios de escisión por proteasas pueden ser introducidos por métodos tales como síntesis génica química o corte y empalme sobrepuestos por PCR (Horton et al., 1989). Las secuencias de reconocimiento por proteasas de serina, por ejemplo, pueden ser insertadas opcionalmente en sitios específicos de la estructura proteínica de Cry llevando a cabo el tratamiento de la proteína en puntos de deleción deseados dentro del tracto digestivo medio de larvas susceptibles. Las proteasas de serina que pueden utilizarse de tal modo incluyen proteasas de serina del tracto digestivo medio de lepidópteros, tales como tripsina o enzimas similares a tripsina, quimotripsina, elastasa, etc., (Christeller et al., 1992). Además, sitios de deleción identificados empíricamente por secuenciación de productos de digestión de proteínas Cry generados con preparaciones de proteasas del tracto digestivo de larvas sin fraccionar o por unión a vesículas en cepillo de la membrana frontera de células, pueden obtenerse para llevar a efecto la activación de proteínas. Las proteínas Cry modificadas, generadas o bien por deleción génica o por introducción de sitios de escisión por proteasas, poseen una actividad mejorada sobre plagas de lepidópteros que incluyen *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea grandiosella*, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*. *Spodoptera fragiperda*, *Spodoptera exigua*, *Diatraea saccharalis*, *Loxagrotis albicosta* y otras plagas diana.

Las proteasas de serina de coleópteros tales como tripsina, quimotripsina y proteasa similar a catepsina G, proteasas de cisteína de coleópteros tales como catepsinas (proteasas similares a B, similares a L, similares a O y similares a K) (Koiwa et al., (2000) y Bown et al., (2004), metaloproteasas de coleópteros tales como ADAM10 [Ochoa-Campuzano et al., (2007)] y proteasas de ácido aspártico de coleópteros tales como catepsinas similares a D y similares a E, pepsina, plasmepsina y quimosina, pueden utilizarse adicionalmente obteniendo secuencias de reconocimientos apropiadas en sitios de tratamiento deseados que afectan al procesamiento de proteínas Cry dentro del tracto digestivo medio de larvas susceptibles de ciertas plagas de insectos.

Una colocación preferida para la introducción de tales sitios de escisión por proteasas puede ser dentro de la región "espaciadora" entre la  $\alpha$ -hélice 2B y la  $\alpha$ -hélice 3, por ejemplo, dentro de los aminoácidos 109 a 113 de la proteína DIG-3 de longitud total (SEQ ID NO:2 y Tabla 1). Las proteínas Cry modificadas generadas o bien por deleción génica o por introducción de sitios de escisión por proteasas, poseen una actividad mejorada sobre plagas de insectos que incluyen, pero no se limitan a oruga de la raíz de maíz occidental, oruga de la raíz de maíz meridional, oruga de la raíz de maíz del norte, y similares.

Existen diversas tecnologías que permiten la determinación de la secuencia de los aminoácidos que comprenden los restos N terminal o C terminal de polipéptidos. Por ejemplo, puede emplearse la metodología de la degradación de Edman automatizada de modo secuencial para determinar la secuencia de aminoácidos N-terminal de hasta 30 restos de aminoácidos con una exactitud de 98% por resto. Además, también es posible la determinación de la secuencia de los aminoácidos que comprenden el extremo carboxilo de polipéptidos [Bailey et al., (1992); patente de EE.UU. No. 6.046.053]. Así, en algunas realizaciones, proteínas Cry de *B.t.* que han sido activadas por medios de tratamiento proteolítico, por ejemplo, por proteasas preparadas desde el tracto digestivo de un insecto, pueden caracterizarse y determinarse los aminoácidos N-terminales o C-terminales del fragmento de toxina activado identificado. Variantes de DIG-3 producidas por introducción o eliminación de sitios de procesamiento de proteasas en posiciones apropiadas de la secuencia codificadora permiten, o eliminan, la escisión proteolítica de una proteína variante de mayor longitud por proteasas de insectos, plantas o microorganismos que están dentro del alcance de la invención. Ha de entenderse que el resultado final de tal manipulación es la generación de moléculas de fragmentos de toxina que tienen la misma o mejor actividad que la proteína de la toxina intacta (longitud total).

Dominios de la toxina DIG-3.- Se cuenta con que los dominios separados de la toxina DIG-3 (y variantes que son 90%, 95% o 97% idénticas a tales dominios) sean útiles para formar combinaciones con dominios de otras toxinas Cry que proporcionan toxinas nuevas con un espectro aumentado de toxicidad plaguicida, potencia mejorada o estabilidad aumentada de las proteínas. El Dominio I de la proteína DIG-3 consiste en los restos de aminoácidos 56 a 278 de SEQ ID NO:2. El Dominio II de la proteína DIG-3 consiste en los restos de aminoácidos 283 a 493 de SEQ ID NO:2. El Dominio III de la proteína DIG-3 consiste en los restos de aminoácidos 593 a 641 de SEQ ID NO:2. El intercambio o el arrastre de dominios es un mecanismo que genera proteínas delta endotoxinas alteradas. Los Dominios II y III pueden ser intercambiados entre proteínas delta-endotoxinas, dando por resultado toxinas híbridas o quiméricas con actividad pesticida o espectro de dianas mejorados. El Dominio II está implicado en la unión a receptores, y el Dominio III de DIG-3 es muy divergente de otras toxinas Cry1B. El Dominio III se une a ciertas clases de proteínas de receptores y acaso participa en la inserción de un pre-poro de una toxina oligómera. Se ha expuesto que algunas sustituciones del Dominio III en otras toxinas producen una toxicidad superior frente a *Spodoptera exigua* (de Maagd et al., 1996) y existe pauta sobre el diseño de los cambios de dominios de toxinas Cry (Knighy et al., 2004).

Métodos para generar proteínas recombinantes y ensayarlas para determinar su actividad pesticida, son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones de Naimov et al., (2001), de Maagd et al., (1996), Ge et al., (1991), Schnepf et al., (1990), Rang et al., (1999). El Dominio 1 de las proteínas Cry1A y Cry3A ha sido estudiado por la disponibilidad para insertar y formar poros en membranas. La  $\alpha$ -hélice 4 y la  $\alpha$ -hélice 5 del Dominio I desempeñan papeles en la inserción de membranas y en la formación de poros [Walters et al., (1993), Gazit et al., (1998); Nunez-Valdes et al., (2001)], con las otras alfa hélices propuestas para ponerse en contacto con la superficie de membranas similares al varillaje de un paraguas (Bravo et al., (2007); Gazit et al., (1998)).

Variantes de DIG-3 creadas realizando un número limitado de deleciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos.- Deleciones, sustituciones y adiciones de aminoácidos a la secuencia de SEQ ID NO:2 pueden realizarse fácilmente de un modo secuencial y los efectos de tales variaciones sobre la actividad insecticida pueden ensayarse por bioanálisis. Teniendo en cuenta que el número de cambios está limitado en número, tal ensayo no lleva consigo una experimentación irrazonable. La invención incluye variantes activas como insecticidas del segmento de toxina de núcleo (aminoácidos 1 - 643 de SEQ ID NO:2 o aminoácidos 73 - 643 de SEQ ID NO:2), en que se han llevado a cabo hasta 10, hasta 15 o hasta 20 adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos independientes.

La invención incluye variantes de DIG-3 que poseen un segmento de toxina de núcleo que es 90%, 95% o 97% idéntico a los aminoácidos 1-643 de SEQ ID NO:2 o a los aminoácidos 73-643 de SEQ ID NO:2.

Las variantes pueden obtenerse realizando mutaciones aleatorias, o las variantes pueden diseñarse. En el caso de mutantes diseñadas, existe una alta probabilidad de generación de variantes con actividad similar a la de la toxina nativa cuando se mantiene la identidad de los aminoácidos en regiones críticas de la toxina que cuentan para la actividad biológica o que están implicados en la determinación de una configuración tridimensional que, en último lugar, es responsable de la actividad biológica. También puede tener lugar una alta probabilidad de retención de actividad si las sustituciones son conservativas. Pueden colocarse aminoácidos de las clases siguientes: no polares, polares sin carga, básicos y ácidos. Las sustituciones conservativas en las que un aminoácido de una clase ha sido reemplazado por otro aminoácido del mismo tipo, son menos probablemente que alteren materialmente la actividad biológica de la variante. La Tabla 2 proporciona un listado de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada una de esas clases..

Tabla 2

Clase de aminoácido	Ejemplos de aminoácidos
Cadenas laterales no polares	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp(W)
Cadenas laterales polares sin carga	Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
Cadenas laterales ácidas	Asp (D), Glu (E)
Cadenas laterales básicas	Lys (K), Arg (R), His (H)
Cadenas laterales beta-ramificadas	Thr, Val, Ile
Cadenas laterales aromáticas	Tyr, Phe, Trp, His

5 En algunos casos, pueden realizarse también sustituciones no conservativas. El factor crítico es que estas sustituciones no hagan disminuir significativamente la actividad biológica de la toxina. Las variantes incluyen polipéptidos que se diferencian en las secuencias de aminoácidos debida a mutagénesis. Las proteínas variantes comprendidas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, a saber, la retención de la actividad pesticida.

10 Las proteínas variantes pueden diseñarse asimismo para que difieran en el nivel de secuencias pero que retengan la misma estructura tridimensional esencial global o similar, la distribución de la carga superficial, y similares. Véanse, p.ej., patente de EE.UU. No. 705.815; Larson et al., (2002); Stemmer (1994a, 1994b, 1995); y Cramer et al., (1996a, 1996b, 1997).

15 Ácidos nucleicos.- Los ácidos nucleicos aislados que codifican toxinas DIG-3 son un aspecto de la presente invención. Este aspecto incluye ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5 y sus complementos. así como otros ácidos nucleicos que codifican variantes insecticidas de SEQ ID NO: 2. Debido a la redundancia del código genético, una diversidad de secuencias de DNA diferentes pueden codificar las secuencias de aminoácidos que se describen en esta memoria. Está dentro de la experiencia de una persona entrenada en la técnica crear estas secuencias de DNA alternativas que codifican las mismas, o especialmente las mismas, toxinas.

20 Síntesis de genes.- Pueden realizarse secuencias de DNA que codifican proteínas Cry mejoradas descritas en la presente memoria mediante una variedad de métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden realizarse segmentos génicos sintéticos y genes sintéticos mediante química de fosfito tri-éster y fosforoamidita (Caruthers et al., 1987), y se encuentran disponibles suministradores comerciales para efectuar las síntesis de DNA, a petición. Las secuencias que codifican proteínas DIG-3 de longitud total pueden reunirse por una diversidad de modos que incluyen, por ejemplo, la ligación de fragmentos de restricción o el montaje de reacción en cadena de la polimerasa de oligonucleótidos que se solapan (Stewart y Burgin, 2005). Además, pueden obtenerse secuencias que codifican 25 delecciones terminales por amplificación de PCR utilizando oligonucleótidos terminales específicos del sitio.

30 Los ácidos nucleicos que codifican toxinas DIG-3 pueden prepararse, por ejemplo, mediante construcción sintética por métodos practicados actualmente por cualquiera de diversos suministradores comerciales. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. NO: 7.482.119 B2). Estos ácidos nucleicos o partes o variantes de los mismos, pueden construirse también sintéticamente, por ejemplo, por empleo de un sintetizador génico, y los métodos de diseño de, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 5.380.831. Alternativamente, pueden construirse fácilmente variaciones de genes sintéticos o naturales empleando técnicas biológicas moleculares normales para llevar a cabo mutaciones puntuales. También pueden prepararse fragmentos de estos genes utilizando exonucleasas o endonucleasas de las que se dispone en el comercio según procedimientos operatorios normales. Por ejemplo, pueden emplearse 35 enzimas tales como *Bal31* o mutagénesis dirigida al sitio para cortar sistemáticamente nucleótidos desde los extremos de estos genes. Asimismo, pueden obtenerse fragmentos génicos que codifican fragmentos de toxinas activos utilizando una diversidad de enzimas de restricción.

40 Dada la secuencia de aminoácidos de una toxina DIG-3, puede diseñarse una secuencia codificadora por traducción inversa de la secuencia codificadora, utilizando codones preferidos por el huésped interesado, y purificando luego la secuencia utilizando codones alternativos para separar secuencias que pudieran ocasionar problemas y proporcionando codones de detención periódicos para eliminar secuencias codificadoras abiertas, largas, de los marcos de lectura sin codificar.

45 Cuantificación de la identidad de secuencias.- Para determinar la identidad por ciento de dos secuencia de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para realizar una comparación óptima. La identidad por ciento entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, identidad por ciento = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (p.ej. posiciones que se solapan) x 100. En una realización, las dos secuencias son de la misma longitud. La identidad por ciento entre dos secuencias puede determinarse empleando técnicas similares a las descritas más adelante, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad por ciento se toman en cuenta, típicamente, parejas exactas

La determinación de la identidad por ciento entre dos secuencias puede obtenerse empleando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitativo de un algoritmo tal es el de Karlin y Altschul (1990), modificado por Karlin y Altschul (1993), e incorporado en los programas BLASTN y BLASTX. Las búsquedas de BLAST pueden emplearse convenientemente para identificar homólogos de secuencias (similares) con una secuencia marcada en bases de datos nucleicos o proteínicos. Pueden realizarse búsquedas por BLASTN (señal = 100, longitud de palabras = 12) para identificar secuencias de nucleótidos con homología para reivindicar moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas BLASTX pueden realizarse (señal = 50, longitud de palabras = 3) para identificar secuencias de aminoácidos con homología para reivindicar moléculas de proteínas insecticidas de la invención.

BLAST con huecos (Altschul et al., 1997) puede utilizarse para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación. Alternativamente, puede emplearse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas (Altschul et al., 1997). Cuando se utilizan programas BLAST, programas BLAST con huecos (Gapped BLAST) y PSI-Blast, pueden utilizarse los parámetros con defecto de los programas respectivos. Véase [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Un ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de las secuencias de aminoácidos o de DNA, y por tanto pueden proporcionar datos de resultados en torno a la conservación de secuencias de la secuencia entera de aminoácidos o de la secuencia de nucleótidos. El algoritmo ClustalW se emplea en diversos soportes lógicos de que se dispone habitualmente, de análisis de DNA/aminoácidos, tales como el modelo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Cuando se alinean secuencias de aminoácidos con ALIGNX puede usarse convenientemente el tiempo de asentamiento por defecto con una penalidad abierta de Gap de 10, una penalidad extendida de Gap de 0,1 y la matriz de comparación blosum63mt2 para apreciar la semejanza (consenso) por ciento de aminoácidos o la identidad entre las dos secuencias. Cuando se alinean secuencias de DNA con ALIGNX pueden emplearse convenientemente los tiempos de asentamiento por defecto con una penalidad abierta de Gap de 15, una penalidad extendida de Gap de 6,6 y la matriz de comparación swgapdnamt para apreciar la identidad por ciento de las dos secuencias.

Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias, es el de Myers y Miller (1988). Tal algoritmo está incorporado en el programa wSTRETCHER, que es parte del soporte lógico de alineación de secuencia wEMBOSS (disponible en <http://emboss.sourceforge.net/>). wSTRETCHER calcula una alineación global óptima de dos secuencias empleando una modificación del algoritmo de programación dinámica clásico que utiliza espacio lineal. Pueden especificarse la matriz de sustitución, la penalidad de inserción de huecos y la penalidad de extensión de huecos empleada para calcular la alineación. Cuando se utiliza el programa wSTRETCHER para comparar secuencias de nucleótidos, una penalidad abierta Gap de 16 y una penalidad de extensión Gap de 4, pueden emplearse con el archivo de la matriz de señal EDNAFULL. Cuando se emplea para comparar secuencias de aminoácidos, pueden emplearse una penalidad abierta Gap de 12 y una penalidad de extensión Gap de 2 con el archivo de la matriz de señal EBLOSUM62.

Otro ejemplo no limitativo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el de Needleman y Wunsch (1970), que está incorporado en los soportes lógicos de alineación de secuencias GAP Version 10 y wNEEDLE (<http://emboss.sourceforge.net/>). GAP Version 10 puede emplearse para determinar la identidad de secuencias o emplear similarmente los parámetros siguientes: para una secuencia de nucleótidos, % de identidad y % de semejanza se encuentran empleando GAP Weight de 50 y Length Weight de 3. y la matriz de señal de cmp, nwsgapdna. Para la comparación de secuencias de aminoácidos, se determinan % de identidad o % de semejanza empleando la carga GAP de 8 y la carga de largo de 2, y el programa de señal BLOSUM62.

wNEEDLE lee dos secuencias de entrada, encuentra la alineación óptima (incluyendo los huecos) junto con la longitud total, y escribe para archivar su alineación de secuencia global óptima. El algoritmo explora todas las alineaciones posibles y escoge la mejor empleando una matriz de señal que contiene valores para todos los restos posibles o de parejas de nucleótidos. wNEEDLE encuentra la alineación con la máxima señal posible, donde la señal de una alineación es igual a la suma de las parejas tomadas de la matriz de señal, menos las penalidades que surgen de los huecos de apertura y extensión de las secuencias alienadas. La matriz de sustitución y las penalidades de apertura y extensión de los huecos son especificadas por el usuario. Cuando se comparan secuencias de aminoácidos se emplean una penalidad de apertura Gap de 10 una penalidad de extensión de Gap de 0,5 y la matriz de comparación EBLOSUM62. Cuando se comparan secuencias de DNA empleando wNEEDLE se emplean una penalidad de apertura Gap de 10, una penalidad de extensión Gap de 0,5 y la matriz de comparación EDNAFULL.

También pueden emplearse programas equivalentes, Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, por cualquiera de las dos secuencias en cuestión, genera una alineación que posee parejas idénticas de nucleótidos o de restos de aminoácidos, y una identidad de secuencia por ciento idéntica cuando se compara con la alineación correspondiente generada por ALIGNX, wNEEDLE, o wSTRETCHER. El % de identidad es el porcentaje de parejas idénticas entre las dos secuencias en la región alienada indicada (que incluye los huecos en la longitud) y el % de semejanza es el porcentaje de parejas entre las dos secuencias en la región alienada indicada (con inclusión de cualesquiera huecos existentes en la longitud).

La alineación también puede realizarse manualmente por inspección.

Huéspedes recombinantes.- Los genes que codifican toxinas de la invención de esta memoria pueden ser introducidos en una amplia variedad de huéspedes microbianos o de plantas. La expresión del gen de toxina da por resultado, directa o indirectamente, la producción intracelular y el mantenimiento de la proteína pesticida. Con huéspedes microbianos adecuados, p.ej. *Pseudomonas*, los microbios pueden aplicarse al medio ambiente de la plaga, donde pueden proliferar y ser ingeridos. El resultado es un control de la plaga. Alternativamente, el microbio que aloja el gen de toxina puede tratarse en condiciones que prolonguen la actividad de la toxina y estabilicen la célula. La célula tratada, que retiene la actividad tóxica, puede aplicarse luego al medio ambiente de la plaga diana.

5  
10  
15

Cuando el gen de toxina de *B.t.* se introduce mediante un vector adecuado en un huésped microbiano, y se aplica dicho huésped al medio ambiente en estado vivo, es esencial que se empleen ciertos microbios huéspedes. Se seleccionan huéspedes de microorganismos que se sabe que ocupan la "fitoesfera" (filoplano, filofera, rizofera, y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos son seleccionados para que sean capaces de competir con éxito en el medio ambiente particular (cultivo y otros hábitats de insectos) con los microorganismos innatos de tipo natural, proporcionando el mantenimiento y la expresión estables del gen que expresa el pesticida polipeptídico, y, deseablemente, proporcionando una protección mejorada del pesticida proporcionada por la degradación e inactivación del medio ambiente.

20  
25  
30

Se conoce un gran número de microorganismos que habitan el filoplano (la superficie de las hojas de las plantas) y/o la rizofera (el terreno que rodea las raíces de las plantas) de una amplia variedad de cultivos importantes. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. Son de interés particular microorganismos, tales como bacterias, p. ej., los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Metylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levadura, p.ej. los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. De interés particular son tales especies bacterianas de fitoesferas como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Sinorhizobium meliloti* (antiguamente *Rhizobium meliloti*), *Alcaligenes eutrophus*, y *Azotobacter vinelandii*; y especies de levaduras de fitoesferas tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odorus*, *Kluyveromyces veronae*, y *Aureobasidium pollulans*. Son de interés particular los microorganismos pigmentados.

Métodos de control de plagas de insectos

35

Cuando un insecto se pone en contacto con una cantidad eficaz de toxina transmitida mediante la expresión de una planta transgénica, la composición o composiciones de proteínas formuladas, la composición o composiciones de proteínas rociables, una matriz de cebo u otro sistema de transmisión, los resultados son, típicamente, la muerte del insecto, o los insectos no se alimentan con la fuente alimenticia que hace a las toxinas disponibles para los insectos.

40  
45

Las toxinas de las proteínas expuestas pueden "aplicarse" o proporcionarse para ponerse en contacto con los insectos diana en una diversidad de modos. Por ejemplo, pueden utilizarse y son bien conocidas en la técnica plantas transgénicas (en donde la proteína es producida por y presente en la planta). La expresión de los genes de toxina puede conseguirse también selectivamente en tejidos específicos de las plantas, tales como las raíces, las hojas, etc. Esto puede conseguirse mediante el uso de promotores específicos del tejido, por ejemplo, Las aplicaciones de rociadura sobre la planta son otro ejemplo y también se conocen en la técnica. Las proteínas expuestas pueden formularse apropiadamente para el uso final deseado, y rociarse después (o aplicarse de otro modo) sobre la planta y/o en torno a la planta y/o a la vecindad de la planta que ha de protegerse - antes de descubrir una infestación, después de descubrir insectos diana, tanto antes como después, y similares. También pueden emplearse y se conocen en la técnica gránulos de cebo, por ejemplo.

Plantas transgénicas

50

Las proteínas expuestas en esta invención pueden emplearse para proteger prácticamente cualquier tipo de planta del daño ocasionado por un insecto lepidóptero. Como ejemplos no limitativos de tales plantas se incluyen el maíz, girasol, soja, algodón, colza, arroz, sorgo, trigo, cebada, productos vegetales, productos ornamentales, pimientos (con inclusión de pimientos picantes), remolachas azucareras, frutos y césped, para nombrar algunos. Métodos para transformar plantas son bien conocidos en la técnica, y se describen en los ejemplos métodos de transformación ilustrativos.

55

Una realización preferida de la invención de esta memoria es la transformación de plantas con genes que codifican la proteína insecticida de la invención o sus variantes. Las plantas transformadas son resistentes al ataque por una plaga de insectos diana en virtud de la presencia de cantidades reguladoras de la proteína insecticida de la invención o de sus variantes, en las células de la planta transformada. Por incorporación del material genético que codifica las propiedades insecticidas de las toxinas insecticidas de *B.t.* en el genoma de una planta que sirve de alimento de una plaga particular de un insecto, el adulto o la larva podrían morir después de consumir la planta

alimenticia. Se han transformado numerosos miembros de las clasificaciones de monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los cultivos agronómicos transgénicos así como también frutos y productos vegetales, tienen interés comercial. Tales cultivos incluyen, pero no se limitan a maíz, arroz, soja, colza, girasol, alfalfa, sorgo, trigo, algodón, cacahuetes, tomates, patatas, y similares. Existen varias técnicas que introducen un material genérico extraño en células de plantas, y para obtener plantas que mantienen y expresan establemente el gen introducido. Tales técnicas incluyen la aceleración de material genético revestido sobre micropartículas directamente en las células (patente de EE.UU. No. 4.945.050 y patente de EE.UU. No. 5.141.131). Las plantas pueden ser transformadas utilizando la tecnología de *Agrobacterium*, véanse la patente de EE.UU. No. 5.177.010, la patente de EE.UU. No. 5.104.310, la solicitud de patente europea No. 0.131.624B1, la solicitud de patente europea No. 120.516, solicitud de patente europea No. 159.418B1, solicitud de patente europea No. 176.112, patente de EE.UU. No. 5.149.645, patente de EE.UU. No. 5.469.976, patente de EE.UU. No. 5.464.763, patente de EE.UU. No. 4.940.838, patente de EE.UU. No. 4.693.970, solicitud de patente europea No. 116.718, solicitud de patente europea No. 290.799, solicitud de patente europea No. 320.500, solicitud de patente europea No. 604.662, solicitud de patente europea No. 627.752, solicitud de patente europea No. 0.267.159, solicitud de patente europea No. 0.292.435, patente de EE.UU. No. 5.231.019, patente de EE.UU. No. 5.463.174, patente de EE.UU. No. 4.762.785, patente de EE.UU. No. 5.004.863, y patente de EE.UU. No. 5.159.135. Otra tecnología de transformación incluye la tecnología WHISKERS™, véanse la patente de EE.UU. No. 5.302.253 y la patente de EE.UU. No. 5.464.765. Asimismo ha sido empleada la tecnología de electroporación para transformar plantas, véanse los documentos WO 87/06.614, la patente de EE.UU. No. 5.472.869, la patente de EE.UU. No. 5.384.253, WO 9.209.696 y WO 9.321.335.

Además de numerosas tecnologías para transformar plantas, el tipo de tejido que se pone en contacto con los genes extraños puede variar también. Tal tejido podría incluir, pero no se limitaría, a tejido embrionario, tejido de callo tipos I y II, hipocotilo, meristemo, y similares. Casi todos los tejidos de plantas pueden transformarse durante la dediferenciación empleando técnicas apropiadas dentro de la experiencia de un experto.

Genes que codifican toxinas de DIG-3 pueden insertarse en células de plantas utilizando una diversidad de métodos que son bien conocidas en la técnica según se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, un gran número de vectores de clonación que comprenden un marcador que permite la selección de las células microbianas transformadas y un sistema de replicación funcional en *Escherichia coli*, están disponibles para la preparación y modificación de genes extraños para su inserción en plantas superiores. Tales manipulaciones pueden incluir, por ejemplo, la inserción de mutaciones, truncaciones, adiciones o sustituciones según se desee para el uso pretendido. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, la serie pUC, la serie M13mp, pACYC184, etc. Por consiguiente, la secuencia que codifica la proteína Cry o variantes puede insertarse en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido que resulta se emplea para la transformación de células de *E. coli*, cuyas células están cultivadas en un medio nutritivo adecuado, y luego se cosechan y lisan para recuperar cantidades del plásmido que puedan trabajarse. Los análisis de secuencias, análisis de fragmentos de restricción, electroforesis y otros métodos biológicos moleculares bioquímicos, son generalmente llevados a cabo como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de DNA utilizada puede ser escindida y unirse a la siguiente secuencia de DNA. Cada secuencia de DNA manipulada puede clonarse en el mismo u otros plásmidos.

El uso de vectores que contienen T-DNA para la transformación de células de plantas, ha sido intensamente investigado y está suficientemente descrito en la patente europea EP 120.516; Lee y Gelvin (2008), Fraley et al., (1986) y An et al., (1985), y está bien establecido en el campo

Una vez que el DNA insertado ha sido integrado en el genoma de la planta, es relativamente estable a lo largo de generaciones subsiguientes. El vector utilizado para transformar la célula de la planta contiene, normalmente, un gen marcador seleccionable que codifica una proteína que confiere a las células de la planta transformada resistencia a un herbicida o un antibiótico, tal como bialafós, kanamicina, G418, bleomicina o higromicina, entre otros. El gen marcador seleccionable empleado individualmente debe permitir, por consiguiente, la selección de células transformadas, mientras que el crecimiento de células que no contienen el DNA insertado está suprimido por el compuesto selectivo.

Se encuentran disponibles gran número de técnicas para insertar DNA en una célula vegetal huésped. Estas técnicas incluyen la transformación con T-DNA procedente de *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como el agente de transformación. Adicionalmente, pueden emplearse la fusión de protoplastos de plantas con liposomas que contienen el DNA que ha de liberarse, inyección directa del DNA, transformación biolística (bombardeo con micropartículas), o electroporación, así como también otros métodos posibles.

En una realización preferida de la invención expuesta, se transformarán plantas con genes en donde el uso del codón de la región codificadora de la proteína ha sido optimizado para plantas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5.380.831. Asimismo, ventajosamente, pueden emplearse plantas que codifican una toxina truncada. La toxina truncada codificará típicamente aproximadamente el 55% a aproximadamente el 80% de la toxina de longitud total. Métodos de creación de genes de *B.t.* sintéticos de uso en plantas, son conocidos en la técnica (Stewart, 2007).

Independientemente de la técnica de transformación, el gen se incorpora preferiblemente en un vector de transferencia génica adaptado para expresar los genes de toxina insecticida de *B.t.* y sus variantes en la célula de plantas por inclusión en el vector de un promotor de plantas. Además de los promotores de plantas, pueden utilizarse eficazmente promotores procedentes de una diversidad de orígenes en células de plantas que expresan genes extraños. Por ejemplo, pueden emplearse promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de octopino sintasa, el promotor de nopalino sintasa, y el promotor de manopino sintasa. Pueden utilizarse promotores de origen de virus de plantas, por ejemplo, los promotores 35S y 19S del Virus del Mosaico de la Coliflor, un promotor del Virus del Mosaico del Nervio de la Mandioca, y similares. Los promotores de plantas incluyen, pero no se limitan a una subunidad pequeña (ssu) de carboxilasa de ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP), promotor de beta-conglicina, promotor de faseolina, promotor ADH (dehidrogenasa alcohólica), promotores de descarga térmica, promotor ADF (factor de despolimerización de actina), promotor de ubiquitina, promotor de actina, y promotores específicos de tejidos. Los promotores pueden contener también ciertos elementos de secuencias intensificadoras que pueden mejorar la eficiencia de la transcripción. Los intensificadores típicos incluyen, pero no se limitan a ADH1-intron 1 y ADH1-intron 6. Pueden emplearse promotores constitutivos. Los promotores constitutivos dirigen una expresión génica continua en casi todos los tipos de células y en casi todos los tiempos (por ejemplo, actina, ubiquitina, CaMV 35S). Los promotores específicos de tejidos son responsables de expresión génica en tipos específicos de células o tejidos, tales como las hojas o las semillas (por ejemplo, promotores de zeína, oleosina, napina, y ACP (Proteína del Soporte de Acilo) y también pueden emplearse estos promotores. También pueden emplearse promotores que son activos durante una cierta etapa del desarrollo de las plantas así como activos en tejidos y órganos específicos de plantas. Como ejemplos de tales promotores se incluyen pero no se limitan, a promotores que son específicos de las raíces, específicos del polen, específicos de embriones, específicos de las barbas del maíz, específicos de las fibras del algodón, específicos del endospermo de las semillas, específicos de la floema, y similares..

En ciertas circunstancias puede ser deseable emplear un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica tal como :un estímulo físico (p.ej. genes de desencadenamiento de calor); luz (p.ej. carboxilasa de RUBP), hormona (p.ej. un glucocorticoide), un antibiótico (p.ej. tetraciclina); metabolitos; y tensión (p.ej. sequía). Pueden emplearse otros elementos deseables de transcripción y traducción que actúan en plantas, tales como secuencias conductoras sin conducir de 5', secuencias de terminación de la transcripción de RNA y secuencias de señales de adición de poli-adenilato. Se conocen en la técnica numerosos vectores de transferencia génica específicos de plantas.

Cultivos transgénicos que contienen rasgos de resistencia a insectos (IR) son predominantes en plantas de maíz y de algodón en toda Norte América y el uso de estos rasgos está expansionándose globalmente. Cultivos transgénicos comerciales que combinan rasgos IR y de tolerancia a herbicidas (HT) han sido desarrollados por muchas compañías de simientes .Estos incluyen combinaciones de rasgos IR comunicados por proteínas insecticidas de *B.t.* y rasgos HT tales como tolerancia a inhibidores de Acetolactato Sintasa (ALS) tales como sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidina, sulfonanilidas, y similares Inhibidores de Glutamina Sintetasa (GS) tales como bialafós, glufosinato, y similares, inhibidores de 4-HidroxiFenilPiruvato Dioxigenasa (HPPD), tales como mesotriona, isoxaflutol, y similares, inhibidores de 5-EnolPiruvilShikimato-3-Fosfato Sintasa (EPSPS) tales como glifosato y similares, e inhibidores de Acetil-Coenzima A Carboxilasa (ACCCase) tales como haloxifop, quizalofop, diclofop, y similares. Se conocen otros ejemplos en los que proteínas proporcionadas transgénicamente proporcionan tolerancia de plantas a clases químicas de herbicidas tales como herbicidas de ácidos fenoxilados y herbicidas de auxinas de piridiloxiacetatos (véase el documento WO 2007/053.482 A2) o herbicidas de ácidos fenoxilados y ariloxifenoxipropionatos (véase el documento WO 2005/107.437 A2, A3)). La capacidad de regular problemas de plagas múltiples mediante rasgos IR es un concepto de productos comerciales valiosos, y la conveniencia de que este concepto de producto se intensifica si los rasgos de control de insectos y los rasgos de control de malezas se combinan en la misma planta. Además, puede obtenerse un valor mejorado mediante combinaciones en una planta sola de rasgos IR comunicados por una proteína insecticida de *B.t.* tal como la de invención expuesta, con uno o más rasgos HT adicionales tales como los anteriormente citados, más uno o más rasgos adicionales de entrada (p.ej. otra resistencia de insectos comunicada por proteínas insecticidas derivadas de *B.t.* u otras proteínas, resistencia de insectos comunicada por mecanismos tales como RNAi y similares, resistencia a nematodos, resistencia a enfermedades, tolerancia a tensiones, utilización mejorada del nitrógeno, y similares), o rasgos de salida (p.ej. alto contenido de aceites, composición de aceites saludables, mejora nutritiva, y similares). Tales combinaciones pueden obtenerse o bien mediante crianza convencional (montón de crianza) o unión, como nuevo acontecimiento de transformación que lleva consigo la introducción simultánea de muchos genes (montón molecular). Los beneficios incluyen la capacidad de regular plagas de insectos y un control mejorado de la maleza en una planta de cultivo que proporciona utilidades secundarias al productor y al consumidor. Por tanto, la invención expuesta puede emplearse en combinación con otros rasgos para proporcionar un paquete agronómico completo de calidad mejorada de un cultivo, con la condición de un control eficazmente flexible y de costo, de cualquier número de experiencias agronómicas.

#### 60 Plagas diana

Las toxinas DIG-3 de la invención son particularmente adecuadas para emplear en el control de insectos lepidópteros. Los lepidópteros son un grupo importante de plagas agrícolas, hortícolas y domésticas que causan daños muy grandes cada año. Este orden de insectos incluye larvas y adultos que se alimentan de las hojas y de

las raíces. Las plagas de insectos lepidópteros incluyen, pero no se limitan a: *Achoroia grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ipsilon* (gusano cortador negro), *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Anticarsia gemmatalis*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Atheris mindara*, *Bombyx mori*, *Bacculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*,  
 5 *Choristoneura* sp., *Cochylis hospes*. *Colias eurytheme*, *Corcyra cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*,  
*Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia feneralis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*,  
*Diatraea grandiosella* (barrenador meridional del maíz), *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar),  
*Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Esphestia elutella*, *Erannis tilaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*,  
*Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chryorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*,  
 10 *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Helicoverpa zea* (oruga del maíz), *Heliothis virescens*  
(cogollero del tabaco), *Hemileuca oliviae*, *Homeosoma elecrellum* (polilla del girasol), *Hyphantia cunea*, *Keiferia*  
*lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxagrotis*  
*albicosta* (oruga occidental de la judía), *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyriscalis*, *Malacosoma* sp.,  
*Mamestra brassicae*, *Mamestra configurata* (esciara berta), *Manduca quinquemaculata*, *Manduca sexta* (oruga de  
 15 cuerpos del tabaco), *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operophtera brumata*, *Orgyia* sp., *Ostrinia nubilalis*  
(barrenador europeo del maíz), *Paleacrita vernata*, *Papiapema nebris* (barrenador común del tallo), *Papilio*  
*crephontes*, *Pectinophora gossypiella*, *Phryganidia californica*, *Phyllonorycter blancardella*, *Pieris napi*, *Pieris rapae*,  
*Plathypena scabra*, *Platynota flouendana*, *Platynota stultana*, *Platyptilia carduidactyla*, *Plodia interpunctella*, *Plutella*  
*xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta* (esciara), *Pseudoplasia includens*,  
 20 *Rachiplusia nu* (engazador de Argentina), *Sabulodes aegrotata*, *Schizura concinna*, *Sitotroga cerealella*, *Spilonota*  
*ocellana*, *Spodoptera frugiperda* (esciara otoñal), *Spodoptera exigua* (esciara de la remolacha), *Thaurnstopoea*  
*pityocampa*, *Ensola bisselliella*, *Trichoplusia hi*, *Udea rubigalis*, *Xylomyges curialis*, y *Yponomeuta padella*.

Se contempla asimismo el empleo de toxinas DIG-3 para controlar plagas de coleópteros de plantas de cultivo. En algunas realizaciones, pueden emplearse económicamente proteínas Cry para el control de plagas de insectos, que incluye pero que no se limita a, por ejemplo, orugas de las raíces tales como *Diabrotica undecimpunctata howardi* (oruga meridional de la raíz del maíz), *Diabrotica longicornis barberi* (oruga del norte de la raíz del maíz), y *Diabrotica virgifera* (oruga occidental de la raíz del maíz), y gusanos tales como las larvas de *Cyclocephala borealis* (euforia enmascarada del norte), *Cyclocephala immaculate* (euforia enmascarada meridional) y *Popillia japonica* (escarabajo japonés).

También está contemplado el empleo de las toxinas DIG-3 para controlar nematodos parasíticos que incluyen, pero no se limitan al nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne icognita*) y al nematodo del quiste de la soja (*Heterodera glycines*).

#### Detección con anticuerpos de toxinas DIG-3

Anticuerpos anti-toxinas.- Anticuerpos para las toxinas descritas en la presente memoria, o para toxinas equivalentes, o fragmentos de estas toxinas, pueden prepararse fácilmente utilizando procedimientos operatorios normales en esta técnica. Tales anticuerpos son útiles para detectar la presencia de las toxinas DIG-3.

Una vez que ha sido aislada la toxina insecticida de *B.t.*, pueden obtenerse anticuerpos específicos para la toxina por métodos convencionales que están bien conocidos en la técnica. Inyecciones repetidas en un huésped de elección a lo largo de un período de semanas o meses provocará una respuesta inmunitaria y dará por resultado títulos importantes de suero anti-toxina de *B.t.* Los huéspedes preferidos son especies de mamíferos y más altamente, las especies son conejos, cabras, ovejas y ratones. La sangre extraída de tales animales inmunizados puede tratarse por métodos establecidos obteniendo antisueros (anticuerpos policlonales) reactivos con la toxina insecticida de *B.t.* El antisuero puede entonces ser purificado por afinidad por adsorción a la toxina según procedimientos conocidos en la técnica. El antisuero purificado por afinidad puede ser purificado posteriormente aislando la fracción de inmunoglobulina existente dentro del antisuero utilizando procedimientos operatorios conocidos en la técnica. El material que resulta será una población heterogénea de inmunoglobulinas reactivas con la toxina insecticida de *B.t.*

También pueden generarse anticuerpos anti-toxina de *B.t.* preparando un inmunógeno semisintético que consiste en un fragmento peptídico sintético de la toxina insecticida de *B.t.* conjugado a un soporte inmunógeno- Numerosos esquemas e instrumentos útiles para preparar fragmentos peptídicos son bien conocidos en la técnica. Muchos soportes inmunógenos adecuados tales como la albúmina de suero bovino o la hemocianina de lapa californiana, son también bien conocidos en la técnica, ya que son procedimientos para copular las proteínas del inmunógeno y las del soporte. Una vez construido el inmunógeno semisintético, el procedimiento operatorio para preparar anticuerpos específicos para el fragmento de toxina insecticida de *B.t.* es idéntico al utilizado para preparar anticuerpos reactivos con la toxina de *B.t.* natural.

Anticuerpos monoclonales anti-toxina de *B.t.* (MAbs) se preparan fácilmente utilizando toxina insecticida de *B.t.* purificada. Métodos para producir MAbs han sido puestos en práctica durante más de 20 años y son bien conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. Las inyecciones intraperitoneales o subcutáneas repetidas de toxina insecticida de *B.t.* purificada en un adyuvante, producirá una respuesta inmunitaria en la mayor parte de animales. Los linfocitos B hiperinmunizados son separados del animal y fusionados con una línea celular compañera de fusión,

adecuada, capaz de ser cultivada indefinidamente. Los animales preferidos cuyos linfocitos B pueden ser hiperinmunizados y empleados para la producción de MABs, son los mamíferos. Los animales más preferidos son las ratas y los ratones, y los más preferidos lo constituyen la cepa de ratón BALB/c.

5 Numerosas líneas de células de mamífero son compañeras de fusión adecuadas para la producción de hibridomas. Muchas de tales líneas están disponibles de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y  
 10 suministradores comerciales. Las líneas preferidas de células de compañeras de fusión proceden de mielomas de ratón y la más preferida es la línea de células de mieloma-653 de HL-1® de Friendly (Ventrex, Portland, ME). Una vez realizada la fusión, los hibridomas que resultan se cultivan en un medio de crecimiento selectivo durante una o dos semanas. Dos sistemas de selección bien conocidos están disponibles para eliminar células de mieloma sin  
 15 fusionar, o fusiones entre células de mielomas, procedentes del cultivo de hibridomas mixto. La elección del sistema de selección depende de la cepa de ratón inmunizada y de la compañera de fusión del mieloma utilizado. Puede emplearse el sistema de selección AAT, descrito por Taggart y Samloff (1983); sin embargo, se prefiere el sistema de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina), descrito por Littlefield (1964), debido a su compatibilidad con la cepa de ratón preferida y la compañera de fusión anteriormente mencionada. El medio de crecimiento agotado es  
 20 clasificado para realizar la secreción de un MAB inmuno específico. Los procedimientos operatorios de ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), son mejor adecuados para esta finalidad; también, son aceptables los radioinmunoensayos adaptados para seleccionar volúmenes grandes. Pueden realizarse muchos ensayos adecuados para distribuir consecutivamente el número considerable de cultivos irrelevantes o menos deseados. Los cultivos que secretan MABs reactivos con la toxina insecticida de *B.t.* pueden ser seleccionados por reactividad cruzada con toxinas insecticidas de *B.t.* conocidas. Los MABs que se unen preferentemente a la toxina insecticida de *B.t.* preferida pueden ser isotipados utilizando ensayos de los que se dispone en el comercio. Los MABs preferidos son de la clase IgG y los Mabs más altamente preferidos son los de los subtipos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2a</sub>.

25 Los cultivos de hibridomas que secretan los MABs preferidos pueden ser subclonados varias veces para establecer la monoclonalidad y la estabilidad. Métodos bien conocidos para subclonar cultivos celulares no adherentes, eucarióticos, incluyen técnicas de separación de dilución limitante, agarosa blanda y células activadas por fluorescencia. Después de cada subclonación, los cultivos que resultan son, preferiblemente, vueltos a analizar para determinar la secreción y el isotipo de anticuerpo y asegurar que se ha establecido un cultivo de secreción de Mab preferido, estable.

30 Los anticuerpos anti-toxina de *B.t.* son útiles en diversos métodos de detección de la toxina insecticida de *B.t.* reivindicada de la presente invención y variantes y fragmentos de la misma. Es bien sabido que los anticuerpos marcados con un grupo informador pueden emplearse para identificar la presencia de antígenos en una diversidad de medios. Anticuerpos marcados con radioisótopos han sido empleados durante décadas en radioinmunoensayos para identificar, con gran precisión y sensibilidad, la presencia de antígenos en una diversidad de fluidos biológicos. Más recientemente, se han utilizado anticuerpos marcados con enzimas como sustitutos de anticuerpos  
 35 radiomarcados en el ensayo ELISA. Además, anticuerpos inmunorreactivos para la toxina insecticida de *B.t.* de la presente invención, pueden unirse a una sustancia inmovilizante tal como un pocillo o una partícula de poliestireno y utilizarse en inmunoensayos para determinar si la toxina de *B.t.* está presente en una muestra de ensayo.

#### Detección empleando sondas de ácidos nucleicos

40 Un método adicional para identificar las toxinas y genes de la invención de esta memoria, es mediante el empleo de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de nucleótidos detectables. Estas secuencias pueden hacerse detectables en virtud de un marcador radiactivo apropiado o pueden hacerse fluorescentes inherentemente como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 6.268.132. Como es bien sabido en la técnica, si la molécula de sonda y la muestra de ácido nucleico se hibridan formando uniones fuertes de parejas de base entre las dos moléculas, puede suponerse razonablemente que la sonda y la muestra tienen una homología sustancial en  
 45 cuanto a la secuencia. Preferiblemente, la hibridación se lleva a cabo en condiciones restrictivas por procedimientos bien conocidas en la técnica, como se ha descrito, por ejemplo, por Keller y Manak (1993). La detección de la sonda proporciona medios para determinar de un modo conocido si ha tenido lugar hibridación. Tal análisis de sondas proporciona un método rápido de identificación de genes que codifican toxinas de la invención expuesta. Los segmentos de nucleótidos que se emplean como sondas según la invención, pueden sintetizarse empleando un sintetizador de DNA y procedimientos operatorios normales. Estas secuencias de nucleótidos pueden emplearse  
 50 asimismo como cebadores de PCR para amplificar genes de la invención de esta memoria.

#### Hibridación de ácidos nucleicos

Como es bien conocido por los expertos en biología molecular, la semejanza de dos ácidos nucleicos puede caracterizarse por su tendencia a hibridarse. Como se emplea en esta memoria se entiende que las expresiones  
 55 "condiciones restrictivas" o "condiciones de hibridación restrictivas" aluden a condiciones bajo las que una sonda puede hibridarse con su secuencia diana en un grado detectablemente mayor de lo que lo hacen otras secuencias (p.ej., al menos un fondo mayor que el doble). Las condiciones restrictivas dependen de las secuencias y serán diferentes en circunstancias diferentes. Regulando la resistividad de la hibridación y/o las condiciones de lavado, pueden identificarse secuencias diana que son complementarias en 100% con la sonda (sondeo homólogo).  
 60 Alternativamente, las condiciones restrictivas pueden ajustarse para permitir algún desapareamiento de las

secuencias por lo que son detectados grados menores de semejanza (sondeo heterólogo). Generalmente, una sonda tiene menos que aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

5 Típicamente, las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración salina sea menor que aproximadamente una concentración de iones Na 1,5 M, típicamente aproximadamente una concentración de iones Na (u otras sales) 0,01 a 1,0 M en pH 7,0 a pH 8,3, y la temperatura es al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (p.ej. 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (p.ej. mayores de 50 nucleótidos). Pueden conseguirse también condiciones restrictivas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Las condiciones restrictivas bajas, ejemplares, incluyen hibridación con una solución tampón de 30% a 35% de formamida, NaCl 1 M, SDS (dodecil sulfato sódico) al 1%, a 37°C y un lavado con SSC 1X a 2X 10 (SSC 20X = NaCl 3,0 M/citrato trisódico 3 M) en 50°C a 55°C. Las condiciones restrictivas moderadas ejemplares incluyen la hibridación en formamida de 40% a 45%, NaCl 1,0 M, SDS al 1%, a 37°C y un lavado con SSC 0,5X a 1X en 55°C a 60°C. Las condiciones restrictivas altas, ejemplares, incluyen hibridación en formamida de 50%, NaCl 1 M, SDS al 1%, a 37°C y un lavado con SSC 0,1X en 60°C a 65°C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender SDS de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1%. La duración de la hibridación es generalmente 15 menor que aproximadamente 24 horas, habitualmente, aproximadamente, 4 a aproximadamente 12 horas.

La especificidad es típicamente la función de lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución final de lavado. Para híbridos de DNA/DNA, el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) es la temperatura (en una fuerza iónica y un pH definidos) en la que el 50% de una secuencia diana 20 complementaria se hibrida con una sonda perfectamente apareada. La  $T_m$  se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de desapareamiento; por tanto, las condiciones de hibridación de  $T_m$ , y/o la condiciones de lavado pueden ajustarse para facilitar la hibridación de extremos complementarios de secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con identidad >90%, la  $T_m$  puede hacerse disminuir 10°C. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C inferiores a la  $T_m$  de la secuencia 25 específica y su complemento en una fuerza iónica y un pH definidos. Sin embargo, las condiciones altamente restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado en 1°C, 2°C, 3°C o 4°C menores que la  $T_m$ ; las condiciones moderadamente restrictivas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 6°C, 7°C, 8°C, 9°C o 10°C menores que la  $T_m$  y las condiciones restrictivas bajas pueden utilizar una hibridación y/o un lavado a 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C o 20°C menores que la  $T_m$ .

30 La  $T_m$  (en °C) puede determinarse experimentalmente o puede aproximarse por cálculo. Para híbridos de DNA-DNA, la  $T_m$  puede aproximarse partiendo de la ecuación de Meinkoth y Wahl /1984):

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\%GC) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 500/L;$$

35 donde M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina del DNA, % de formamida es el porcentaje de formamida de la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases.

Alternativamente, la  $T_m$  se describe mediante la fórmula que sigue (Beltz et al., 1983).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81,5 + 16,6(\log[\text{Na}^+]) + 0,41(\%GC) - 0,61(\% \text{ de formamida}) - 600/L.$$

40 donde  $[\text{Na}^+]$  es la molaridad de iones sodio, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina del DNA, % de formamida es el porcentaje de formamida de la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases.

Utilizando las ecuaciones, las composiciones de hibridación y de lavado, y la  $T_m$  deseadas, los de experiencia ordinaria comprenderán que variaciones en cuanto a la calidad restrictiva de la hibridación y/o de las soluciones de lavado están descritas inherentemente. Si resulta el grado deseado de desapareamiento de una  $T_m$  de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC para que pueda emplearse una temperatura más alta. Una pauta extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) y Ausubel et al., (1995). Véase también Sambrook et al (1989).

La hibridación de DNA inmovilizado en transferencias Southern con sondas específicas de genes marcadas radiactivamente, puede llevarse a cabo mediante métodos normales (Sambrook et al., referencia anterior). Los isótopos radiactivos empleados para marcar sondas de polinucleótidos pueden incluir  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ , o  $^3\text{H}$ . La 50 incorporación de isótopos radiactivos en moléculas de sondas de polinucleótidos puede realizarse por cualquiera de varios métodos bien conocidos por los expertos en el campo de la biología molecular (Véase, p.ej. la referencia de Sambrook et al., anterior). En general, la hibridación y los lavados subsiguientes pueden llevarse a cabo en condiciones restrictivas que permitan la detección de secuencias diana con homología para los genes reivindicados que codifican toxinas. Para sondas de genes de DNA de doble cadena, la hibridación puede llevarse a cabo durante la noche a 20 - 25°C por debajo de la  $T_m$  del híbrido de DNA en SSPE 6X, solución de Denhardt 5X, SDS al 0,1%, DNA desnaturalizado, 0,1 mg/ml [SSPE 20X en NaCl 3M,  $\text{NaHPO}_4$  0,2 M, y EDTA 0,02M (sal sódica del ácido etilendiaminotetraacético); la Solución de Denhardt es Polivinilpirrolidona 20 g/l, Ficoll tipo 400 10 g/l y Albúmina de Suero Bovino 20 g/l (fracción V)].

Los lavados pueden llevarse a cabo como sigue:

Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en SSPE 1X, SDS al 0,1% (lavado restrictivo bajo);

Una vez a  $T_m - 20^\circ\text{C}$  durante 15 minutos en SSPE 0,2X, SDS al 0,1% (lavado restrictivo moderado).

- 5 Para sondas de oligonucleótidos, la hibridación puede llevarse a cabo durante la noche a  $10^\circ\text{-}20^\circ\text{C}$  por debajo de la  $T_m$  del híbrido en SSPE 6X, solución de Denhardt 5X, SDS al 0,1% y DNA desnaturalizado 0,1 mg/ml. La  $T_m$  de sondas de oligonucleótidos puede determinarse mediante la fórmula siguiente (Suggs et al., 1981).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{número de pares de bases de T/A}) + 4(\text{número de pares de bases de G/C})$$

Los lavados pueden llevarse a cabo típicamente como sigue:

Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos SSPE 1X, SDS al 0,1% (lavado restrictivo bajo).

- 10 Una vez en la temperatura de hibridación durante 15 minutos en SSPE 1X, SDS al 0,1% (lavado restrictivo moderado).

Las moléculas de sondas para la hibridación y las moléculas híbridadas formadas entre las moléculas de sonda y las diana pueden hacerse detectables por medios distintos del marcado radiactivo. Tales métodos alternativos se entiende que están dentro del alcance de esta invención.

- 15 A menos que se indique o implique específicamente, los términos y expresiones "un", "una" y "el" significan "al menos uno" como se emplea en esta memoria. Por el uso de la expresión "material genético" se entiende que incluye todos los genes, ácidos nucleicos, DNA y RNA

- 20 Para designaciones de restos de nucleótidos de polinucleótidos, DNA, RNA, oligonucleótidos, y cebadores, y para designaciones de restos de aminoácidos de proteínas, se emplean en todo este documento las abreviaturas normales de IUPAC. Las secuencias de ácidos nucleicos se presentan en la dirección normal de 5' a 3', y las secuencias de proteínas se presentan en la dirección estándar de terminal amino (N) a terminal carboxi (C).

- 25 La exposición que sigue son ejemplos que ilustran procedimientos operatorios ilustrativos para practicar la invención. Ha de entenderse que los ejemplos y las realizaciones que se describen en esta memoria son solamente con fines ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios de los mismos se sugerirán a los expertos en la técnica y que han de incluirse dentro de la extensión de esta solicitud y del alcance de las reivindicaciones que figuran como apéndice. Estos ejemplos no deben ser interpretados como limitaciones. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de las mezclas de disolventes son en volumen a menos que se indique de otro modo. Todas las temperaturas están en grados Celsius.

### Ejemplos

- 30 Ejemplo 1

Aislamiento de un gen que codifica toxina DIG-3.

- 35 El ácido nucleico que codifica la proteína Cry insecticida designada en esta memoria como DIG-3, se aisló de DNA genómico de la cepa PS46L de *B.t.* por PCR utilizando un cebador directo degenerado que se hibridó con las bases 1.286 a 1.311 de SEQ ID NO:1, y un cebador inverso desapareado que se hibridó con el complemento de las bases 2.480 a 2.499 de SEQ ID NO:1. Esta pareja de cebadores se empleó para amplificar un fragmento de 1.214 bp que correspondía a los nucleótidos 1.286 a 2.499 de SEQ ID NO:1. Esta secuencia se usó como el punto de ancla para comenzar métodos que usan ambulantes genómicos adaptados del GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech, Palo Alto, CA). Se determinó la secuencia del ácido nucleico de un fragmento que extiende la región codificadora de DIG-3. SEQ ID NO:1 es la secuencia de nucleótido de 3.771 bp que codifica la longitud total de la proteína DIG-3. .
- 40 SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína DIG-3 de longitud total deducida de SEQ ID NO:1. Ha de apreciarse que en especies de *Bacillus*, regiones que codifican proteínas tales como la de SEQ ID NO:1 pueden iniciarse con el codón TTG que representa, como traducción, la metionina del aminoácido

Ejemplo 2

Deleción de  $\alpha$ -hélices del Dominio I de DIG-3

- 45 Para mejorar las propiedades insecticidas de la toxina DIG-3, se realizaron deleciones en serie, por etapas, cada una de las cuales separa parte del término N de la proteína DIG-3. Las deleciones separan parte o toda la  $\alpha$ -hélice 1 y parte o toda la  $\alpha$ -hélice 2 del Dominio I, al tiempo que mantiene la integridad estructural de la  $\alpha$ -hélice 3 hasta la  $\alpha$ -hélice 7.

- 50 Las deleciones fueron diseñadas como sigue. Este ejemplo utiliza la secuencia de DNA quimérica de longitud total que codifica la proteína DIG-3 de longitud total, p.ej. SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente, para ilustrar los

principios del diseño con 67 variantes específicas. Esto utiliza la secuencia química de SEQ ID NO:5 (DNA que codifica el segmento de toxina de núcleo de DIG-3 fusionado al segmento de protoxina de Cry1Ab) proporcionando unas 67 variantes específicas adicionales. Un experto en la técnica puede realizar que otras secuencias de DNA que codifican todas o una parte del terminal N de la proteína DIG-3, pueden manejarse de modo similar para conseguir el resultado deseado. Para trazar la primera variante de delección que codifica secuencia, se separan todas las bases que codifican  $\alpha$ -hélice 1 hasta el codón del resto de prolina cercano al comienzo de  $\alpha$ -hélice 2A (es decir, P73 para la proteína DIG-3 de longitud total de SEQ ID NO:2). Por tanto, la eliminación de bases 1 a 216 de SEQ ID NO: 1 separa la secuencia codificadora de los aminoácidos 1 a 72 de SEQ ID NO: 2. La reintroducción de un codón ATG (metionina) que inicia la traducción en el comienzo (es decir, en frente del codón que corresponde al aminoácido 73 de la proteína de longitud total) proporciona la secuencia codificadora de la variante de delección que comprende un marco de lectura abierto de 3.555 bases que codifica una proteína DIG-3 variante de delección que comprende 1.185 aminoácidos (es decir, metionina más los aminoácidos 73 a 1256 de la proteína DIG-3 de longitud total). Delecciones en serie, por etapas, que separan codones adicionales de un solo aminoácido que corresponden a los restos 73 a 112 de la proteína DIG-3 de longitud total de SEQ ID NO:2, proporcionan variantes que carecen de parte o de la totalidad de  $\alpha$ -hélice 2A y  $\alpha$ -hélice 2B. Así pues una segunda secuencia codificadora de una variante de delección diseñada requiere la eliminación de bases 1 a 219 de SEQ ID NO: 1, separando con ello la secuencia codificadora de los aminoácidos 1-73. La restauración de un marco de lectura abierto funcional se consigue de nuevo por reintroducción de un codón de metionina de iniciación de la traducción al comienzo de la secuencia codificadora restante, proporcionando de este modo una segunda secuencia codificadora de una variante de delección que tiene un marco de lectura abierto de 3.552 bases que codifica una proteína DIG-3 variante de delección que comprende 1184 aminoácidos (es decir, metionina más los aminoácidos 74 a 1.256 de la proteína DIG-3 de longitud total). La última secuencia codificadora de una variante de delección diseñada, requiere la separación de bases 1 a 336 de SEQ ID N:1 eliminando por tanto la secuencia codificadora de los aminoácidos 1 a 112, y, después de reintroducción de un codón de metionina de iniciación de la traducción, proporcionando una secuencia codificadora de una variante de delección que tiene un marco de lectura abierto de 3.435 bases que codifica una proteína DIG-3 variante de delección de 1.145 aminoácidos (es decir, metionina más los aminoácidos 113 a 1.256 de la proteína DIG-3 de longitud total). Como puesto de ejemplo, después de la eliminación de la secuencia de delección, se añade un codón de metionina iniciador al comienzo de la secuencia codificadora que queda, para restaurar un marco de lectura abierto funcional. También, como se describe, ha de añadirse un codón de glicina adicional entre el codón de metionina y el codón para el aminoácido que determina inestabilidad en el caso de que la separación de la secuencia de delección deje expuesto en el termino N de la parte restante de la proteína de longitud total uno de los aminoácidos que determinan inestabilidad como se ha indicado anteriormente.

La Tabla 3 describe variantes específicas diseñadas de acuerdo con la estrategia descrita anteriormente

Tabla 3

35 Secuencias de proteínas variantes de delección de la proteína DIG-3 de longitud total de SEQ ID NO:2 y la secuencia de proteínas de fusión de SEQ ID NO:5

Variante de delección de DIG-3	Restos añadidos al término NH2	Restos de SEQ ID NO:2	Variante de delección de DIG-3	Restos añadidos al término NH2	Restos de SEQ ID NO:5
1	M	73-1256	68	M	73-1188
2	MG	73-1256	69	MG	73-1188
3	M	74-1256	70	M	74-1188
4	MG	74-1256	71	MG	74-1188
5	M	75-1256	72	M	75-1188
6	M	76-1256	73	M	76-1188
7	M	77-1256	74	M	77-1188
8	M	78-1256	75	M	78-1188
9	MG	78-1256	76	MG	78-1188
10	M	79-1256	77	M	79-1188
11	M	80-1256	78	M	80-1188
12	M	81-1256	79	M	81-1188
13	MG	81-1256	80	MG	81-1188
14	M	82-1256	81	M	82-1188
15	MG	82-1256	82	MG	82-1188
16	M	83-1256	83	M	83-1188
17	M	84-1256	84	M	84-1188
18	MG	84-1256	85	MG	84-1188
19	M	85-1256	86	M	85-1188

ES 2 532 145 T3

20	MG	85-1256	87	MG	85-1188
21	M	86-1256	88	M	86-1188
22	M	87-1256	89	M	87-1188
23	M	88-1256	90	M	88-1188
24	M	89-1256	91	M	89-1188
25	MG	89-1256	92	MG	89-1188
26	M	90-1256	93	M	90-1188
27	MG	90-1256	94	MG	90-1188
28	M	91-1256	95	M	91-1188
29	MG	91-1256	96	MG	91-1188
30	M	92-1256	97	M	92-1188
31	M	93-1256	98	M	93-1188
32	M	94-1256	99	M	94-1188
33	M	95-1256	100	M	95-1188
34	MG	95-1256	101	MG	95-1188
35	M	96-1256	102	M	96-1188
36	MG	96-1256	103	MG	96-1188
37	M	97-1256	104	M	97-1188
38	MG	97-1256	105	MG	97-1188
39	M	98-1256	106	M	98-1188
40	MG	98-1256	107	MG	98-1188
41	M	99-1256	108	M	99-1188
42	MG	99-1256	109	MG	99-1188
43	M	100-1256	110	M	100-1188
44	MG	100-1256	111	MG	100-1188
45	M	101-1256	112	M	101-1188
46	MG	101-1256	113	MG	101-1188
47	M	102-1256	114	M	102-1188
48	MG	102-1256	115	MG	102-1188
49	M	103-1256	116	M	103-1188
50	MG	103-1256	117	MG	103-1188
51	M	104-1256	118	M	104-1188
52	M	105-1256	119	M	105-1188
53	MG	105-1256	120	MG	105-1188
54	M	106-1256	121	M	106-1188
55	MG	106-1256	122	MG	106-1188
56	M	107-1256	123	M	107-1188
57	MG	107-1256	124	MG	107-1188
58	M	108-1256	125	M	108-1188
59	MG	108-1256	126	MG	108-1188
60	M	109-1256	127	M	109-1188
61	MG	109-1256	128	MG	109-1188
62	M	110-1256	129	M	110-1188
63	MG	110-1256	130	MG	110-1188
64	M	111-1256	131	M	111-1188

65	MG	111-1256	132	MG	111-1188
66	M	112-1356	133	M	112-1356
67	M	113-1256	134	M	113-1188

Los ácidos nucleicos que codifican las toxinas descritas en la Tabla 3, han sido diseñados de acuerdo con los principios generales de genes sintéticos destinados a la expresión en plantas, según se ha discutido anteriormente.

#### Ejemplo 3

- 5 Diseño de una versión optimizada en planta de la secuencia codificadora de la proteína insecticida de *B.t.* DIG-3.

Se diseñó una secuencia de DNA que tiene una preferencia de codón de planta, y se sintetizó para producir la proteína DIG-3 en plantas transgénicas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se calculó una tabla de uso de codón para maíz (*Zea mays* L.) a partir de 706 secuencias codificadoras de proteínas (CDs) obtenidas de secuencias depositadas en GenBank. Las tablas de uso de codón para tabaco (*Nicotiana tabacum*), 1.268 CDs), colza (*Brassica napus*, 530 CDs), algodón (*Gossypium hirsutum*, 197 CDs) y soja (*Glycine max*: aprox. 1.000 CDs) fueron descargadas de datos del sitio website <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Se calculó un conjunto de codones preferentes que comprende codones muy utilizados comunes para los conjuntos de datos tanto para el maíz como para las dicotiledóneas, en cantidades relativas medias pesadas, apropiadas, después de omitir cualquier colón redundante utilizado menos que aproximadamente 10% de usos totales de codones para el aminoácido de cada uno de los dos tipos de plantas. Para derivar una secuencia optimizada en una planta que codifique la proteína DIG-3, se realizaron sustituciones de codones para la secuencia de DNA de DIG-3 determinada experimentalmente, de modo que la secuencia de DNA que resultó tuviera la composición global de codones de la tabla preferente de codones optimizados en la planta. Se llevaron a cabo purificaciones adicionales de la secuencia para eliminar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción indeseable, sitios potenciales de corte y empalme de intrones de planta, operaciones largas de restos A/T o C/G, y otros motivos que pudieran interferir con la estabilidad de RNA, transcripción o traducción de la región codificadora en células de planta. Se llevaron a cabo otros cambios para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción deseadas, y eliminar largos Marcos de Lectura Abiertos internos largos (marcos distintos de +1). Todos estos cambios fueron realizados dentro de las reservas de retener la composición de codones preferente en la planta. La síntesis de la secuencia diseñada se llevó a cabo por medio de un suministrador comercial (DNA2.0, Menlo Park, CA).

Una pauta adicional que considera la producción de genes sintéticos puede encontrarse, por ejemplo, en el documento WO 97/13.402 y en la Patente de EE.UU. No. 5.380.831.

Una secuencia de DNA optimizada para la planta que codifica la toxina DIG-3 de longitud total, se proporciona en SEQ ID NO:3. Una secuencia de DNA optimizada para dicotiledóneas que codifica el segmento de protoxina Cry1Ab, está descrita como SEQ ID NO:6. Una secuencia de DNA optimizada para el maíz que codifica el segmento de protoxina Cry1Ab, está descrita en SEQ ID NO:7.

#### Ejemplo 4

Construcción de plásmidos de expresión que codifican toxina insecticida DIG-3 y expresión en huéspedes bacterianos

35 Se emplearon métodos de clonación normales para la construcción de plásmidos de expresión de *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) preparados para producir proteínas DIG-3 de longitud total codificadas por regiones codificadoras optimizadas en plantas. Se obtuvieron endonucleasas de restricción de New England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) y se empleó ligasa de T4 DNA (Invitrogen) para la ligación de DNA. Las preparaciones de los plásmidos se llevaron a cabo utilizando el NucleoBond® Xtra Kit /Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA) o el Plasmid Midi Kit® (Qiagen), siguiendo las instrucciones de los suministradores. Los fragmentos de DNA se purificaron utilizando el cartucho DA de Millipore Ultrafree® (Billerica, MA) después de electroforesis con gel de Tris-acetato de agarosa.

La estrategia de clonación básica aseguró la subclonación de la secuencia codificadora de toxina DIG-3 (CDS) en pDOW 1169 en los sitios de restricción *SpeI* y *XhoI*, con lo que se coloca bajo el control de expresión del promotor *Ptac* y el terminador *rrnBT1T2* del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). El pDOW 1169 es un plásmido de copia medio con el origen de replicación RSF1010, un gen *pyrF* y un sitio de unión de ribosoma que precede a los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción en que pueden ser introducidos fragmentos de DNA que contienen regiones codificadoras de proteína, (Solicitud US 20080183974). El plásmido de expresión, diseñado pDAB4171, se transformó por electroporación en DC454 (una cepa de *P. fluorescens* de tipo natural cercana a la que posee mutaciones  $\Delta pyrF$  y  $lsc::lacI^{Q1}$ ), o sus derivados, recuperados en un medio hidrolizado de soja-SOC, y depositados en placa sobre un medio selectivo (agar de glucosa M9 que carece de uracilo, Sambrook et al., referencia anterior). Detalles de las manipulaciones microbiológicas están disponibles en las publicaciones de Squires et al., (2004), solicitud de patente de EE.UU. 20060008877, solicitud de patente de EE.UU. 20080193974, y solicitud de patente de EE.UU. 20080058262. Las colonias fueron primeramente clasificadas por PCR y luego se

analizaron clones positivos por digestión de restricción de DNA plasmídico minipreparado. Se secuenció el DNA plasmídico de clones seleccionados que contenía inserciones o bien utilizando Big Dye<sup>®</sup> Terminator versión 3,1 recomendado por el proveedor (Applied Biosystems/Invitrogen), o bien por contacto con un suministrador comercial de secuencias (MWG Biotech, Huntsville, AL). Los datos de las secuencias fueron reunidos y analizados utilizando el soporte lógico Sequencher<sup>™</sup> (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

10 Análisis de crecimiento y expresión en frascos agitados.- La producción de toxina DIG-3 para caracterización y bioensayo en insectos se llevó a cabo mediante cepas de *P. fluorescens* en crecimiento en frascos agitados que alojaban construcciones de expresión (p.ej. el clon DP2826). Se emplearon cultivos de semillas hechos crecer en medio M9 suplementado con glucosa al 1% y elementos traza para inocular 50 ml de medio mínimo definido con glicerina al 5% (Teknova Catalog. No. 3D7426, Hollister, CA). La expresión del gen de toxina DIG-3 mediante el promotor *P<sub>tac</sub>* se indujo por adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) después de una incubación inicial de 24 horas a 30°, con agitación. Se tomaron muestras de los cultivos en el tiempo de inducción y en varios momentos después de la inducción. La densidad celular se midió por densidad óptica a 600 nm (OD<sub>600</sub>). Pueden utilizarse asimismo otros medios de cultivo adecuados para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, como se describe en la publicación de Huang et al., (2007) y en la Solicitud de Patente de EE.UU. 20060008877.

20 Fraccionamiento de células y análisis por SDS-PAGE de muestras de frascos agitados.- En cada momento de toma de muestras la densidad celular de la muestra se ajustó a OD<sub>600</sub> = 20 y se centrifugaron alícuotas de 1 ml a 14.000 x g durante cinco minutos. Los agregados (pelets) de células se congelaron a -80°. Las fracciones solubles e insolubles procedentes de muestras de pelets de células de los frascos agitados congeladas fueron generadas empleando La Solución de Extracción de Proteínas Bacterianas EasyLyse<sup>™</sup> (EPICENTRE<sup>®</sup> Biotechnologies, Madison, WI). Cada pelet celular se volvió a suspender en 1 ml de solución EasyLyse<sup>™</sup>, se diluyó después 1:4 en tampón de lisis y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. El lisado se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4° y se recuperó el sobrenadante como la fracción soluble. El pelet (fracción insoluble) se resuspendió luego en un volumen igual de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11,9 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4).

30 Las muestras se mezclaron 1:1 con tampón de muestra Laemmli 2X que contenía β-mercaptoetanol (Sambrook et al., publicación anterior) y se hirvió durante 5 minutos antes de cargar en geles al 12% de Bis-Tris Criterion XT<sup>®</sup> (Bio-Rad Inc., Hercules, CA). Se realizó electroforesis en el tampón XT MOPS recomendado. Los geles fueron teñidos con Tinción Coomassie Bio-Safe según el protocolo del fabricante (Bio-Rad) y se determinó la imagen usando el sistema Alpha Innotech Imaging (San Leandro, CA).

35 Preparación de corpúsculos de inclusión.- Se realizaron preparaciones de corpúsculos de inclusión (IB) de proteína Cry sobre células de fermentaciones de *P. fluorescens* que producían proteína insecticida insoluble de *B.t.* demostrado por SDS-PAGE y MALDI-MS (Desorción por láser asistido por matriz / Espectrometría de masas de ionización). Los pelets de fermentación de *P. fluorescens* fueron descongelados en un baño de agua a 37°. Las células fueron resuspendidas en tampón de lisis al 25% p/v (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, sal disódica de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 20 mM, Tritón X-100 al 1% y ditiotreitól (DTT) 5 mM; 5 ml/l de reunión de inhibidor de proteasa bacteriana (P8465 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se añadieron justamente antes del uso). Las células se suspendieron utilizando un homogeneizador manual a la fijación más baja (Tissue-Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Se añadió a la suspensión de células lisozima (25 mg de Sigma L7651, de clara de huevo de gallina) mezclando con una espátula metálica, y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La suspensión se enfrió en hielo durante 15 minutos, después se sometió a sonicación utilizando un Branson Sonifier 250 (dos sesiones de 1 minuto, en un ciclo de funcionamiento de 50%, salida 30%). Las lisis de células se comprobaron por microscopía. Se añadió si era necesario, una cantidad adicional de 25 mg de lisozima, y se repitieron la incubación y la sonicación. Cuando se confirmó la lisis de células por microscopía, el lisado se centrifugó a 11.500 x g durante 25 minutos (4°) para formar el pelet de IB, y se desechó el sobrenadante. El pelet de IB se volvió a suspender con 100 ml de tampón de lisis, se homogeneizó con el mezclador manual y se centrifugó como anteriormente. El pelet de IB se lavó repetidamente por resuspensión (en 50 ml de tampón de lisis), homogeneización, sonicación y centrifugación hasta que el sobrenadante se hizo incoloro y el pelet de IB se hizo firme y de color casi blanco. Para el lavado final el pelet de IB se volvió a suspender en agua destilada filtrada estéril (0,22 μm) que contenía EDTA 2 mM, y se centrifugó. El pelet final se resuspendió en agua destilada filtrada estéril que contenía EDTA 2 mM y se guardó en partes alícuotas de 1 ml a -80°.

55 El análisis por SDS-PAGE y la cuantificación de proteína en preparaciones de IB, se llevó a cabo descongelando una alícuota de 1 ml del pelet de IB y diluyendo 1:20 con agua destilada filtrada estéril. La muestra diluida se hirvió entonces con tampón de muestra de reducción 4X [Tris 250 mM, pH 6,8, glicerina al 40% (v/v), azul de bromofenol al 0,4% (p/v), SDS al 8% (p/v) y β-mercaptoetanol al 8% (v/v)]. y se cargó en una operación en gel de 12+2 pocillos de Tris-Glicina 4-20% de Novex<sup>®</sup> (Invitrogen) con tampón de Tris/Glicina/SDS (Bio-Rad). El gel se trató durante 60 min a 200 voltios, luego se tiñó con azul de Coomassie (G-250 al 50%/R-250 al 50% en metanol de 45%, ácido acético al 10%) y se destiñó con ácido acético de 7%, metanol al 5%, en agua destilada. La cuantificación de bandas diana se hizo comparando los valores densitométricos de las bandas frente a muestras de Albúmina de Suero Bovino (BSA) realizadas sobre el mismo gel para generar una curva estándar.

Solubilización de corpúsculos de inclusión.- Seis ml de suspensión de corpúsculos de inclusión procedente del clon DP2826 de Pf (que contenían 32 mg/ml de proteína DIG-3) se centrifugaron al máximo asentamiento de una microcentrífuga modelo 5415C de Eppendorf (aproximadamente 14.000 x g) para aglomerar las inclusiones. Se separó el sobrenadante del tampón de memoria y se volvió a colocar con 25 ml de tampón de carbonato sódico 100 mM, pH 11, en un tubo cónico de 50 ml. Las inclusiones fueron resuspendidas utilizando una pipeta y se agitó con formación de vértice para mezclarla a fondo. El tubo se colocó en una plataforma agitada suavemente a 4° durante la noche para extraer la proteína diana. El extracto se centrifugó a 30.000 x g durante 50 minutos a 4°, y el sobrenadante que resultó se concentró 5 veces usando un dispositivo de filtro centrífugo de celulosa regenerado de Amicon Ultra-15 (30.000 Molecular Weight Cutoff; Millipore). El tampón de muestra se cambió entonces a CAPS [ácido 3-(ciclohexamino)1-propanosulfónico] 10 mM, pH 10, utilizando columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

Electroforesis en gel.- El extracto concentrado se preparó para electroforesis diluyendo 1:50 en tampón de muestra LDS de NuPAGE® (Invitrogen) que contenía ditioneitol 5 mM como agente reductor y se calentó a 95° durante 4 minutos. La muestra se cargó en calles duplicadas de gel NuPAGE® al 4-12% a lo largo de 5 tipos de BSA que variaban de 0,2 a 2 µg/calle (para determinar la generación de una curva tipo), Se aplicó voltaje a 200V usando tampón de realización de SDS MOPS (Invitrogen) hasta que la huella de color del seguimiento alcanzó la parte baja del gel. El gel se tiñó con Azul de Coomassie G-250 al 0,2% en metanol de 45%, y ácido acético al 10%, y se destiñó, primero brevemente con metanol de 45%, ácido acético de 10%, y luego, en longitud, con ácido acético de 7%, metanol al 5%, hasta que el fondo aclaró. Después de destiñir el gel se escaneó con un Multimager Fluor-S de Biorad. Se empleó el gel de desarrollo (software) v.4.5.2 de Quantity One del instrumento para obtener volúmenes sustraídos del fondo de las bandas de proteína teñidas y generar la curva tipo de BSA que se empleó para calcular la concentración de proteína DIG-3 de la solución de reserva.

#### Ejemplo 5

##### Actividad insecticida de proteína DIG-3 modificada producida en *Pseudomonas fluorescens*

Se demostró que la toxina insecticida de *B.t.* DIG-3 era activa sobre especies de lepidópteros que incluían el barrenador europeo del maíz (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)); ECB resistente a cryF (rECB), palomilla de dorso de diamante (DBM); *Plutella xylostella* (Linnaeus)), DBM resistente a Cry1A (rDBM), lombriz de tierra de maíz (CEW); *Helicoverpa zea* (Boddie)), gusano cortador negro (BCW; *Agrotis ipsilon* (Hufnagel)), cogollero del tabaco (TBW; *Heliothis virescens* (Fabricius)), y engazador de la col (CL; *Trichoplusia ni* (Hübner)). También se ensayó la proteína DIG-3 para determinar su actividad sobre el cogollero del maíz (FAW, *Spodoptera frugiperda*), FAW resistente a Cry1F (rFAW) y gusano de la raíz del maíz occidental (WCR, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte).

Preparaciones de muestras y bioensayos.- Preparaciones de corpúsculos de inclusión en CAPS 10 mM pH 10, fueron diluidas apropiadamente en CAPS 10 mM pH 10, y todos los bioensayos contenían un tratamiento testigo que consistía en este tampón, que servía como comprobación de fondo de la mortalidad o de la inhibición de crecimiento.

Las concentraciones de proteínas en el tampón de bioensayo se estimaron por electroforesis en gel utilizando BSA para crear una curva tipo de densitometría del gel, que se midió empleando un sistema de representación óptica BioRad (Fluor\_S Multimager con el desarrollo óptico Quantity One versión 4.5.2). Las proteínas de la matriz del gel se tiñeron con color a base de Azul Coomassie y se quitó el color antes de hacer la lectura

Las proteínas purificadas se ensayaron para determinar la actividad insecticida en bioensayos realizados con larvas de lepidópteros neonatos en dieta de insectos artificial. Larvas de BCW, CEW, CL, DBM, rDBM, ECB, FAW y TBW se incubaron partiendo de huevos procedentes de una colonia mantenida por un insectario comercial (Benzon Research Inc., Carlisle, PA), Los huevos de WCR se obtuvieron de Crop Characteristics, Inc. (Farmington, MN). Las larvas de rECB y rFAW se incubaron de huevos obtenidos de colonias de propietarios (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN).

Los bioensayos se llevaron a cabo en bandejas de plástico de 128 pocillos diseñadas específicamente para bioensayos de insectos (C-D International, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía 1,0 ml de dieta de lepidópteros Multi-species (Southland Products, Lake Village, AR). Una alícuota de 40 µl de muestra de proteína se distribuyó por pipeta sobre el 1,5 cm<sup>2</sup> de superficie de la dieta de cada pocillo (26,7 µl/cm<sup>2</sup>). Las concentraciones de la dieta se calcularon como la cantidad (ng) de proteína DIG-3 por centímetro cuadrado (cm<sup>2</sup>) de área superficial del pocillo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una cabina de desplazamiento de humos hasta que el líquido de la superficie de la dieta se había evaporado o se había absorbido en la dieta.

Al cabo de algunas horas de eclosión, se recogieron larvas individuales con un cepillo de pelo de camello humedecido y se depositaron sobre la dieta tratada, una larva por pocillo. Los pocillos infectados fueron precintados después con hojas adhesivas de plástico transparente y ventiladas para permitir el intercambio de gases (C-D International, Pitman, NJ). Las bandejas de bioensayos se mantuvieron en condiciones ambientales reguladas (28°C, ~40% de Humedad Relativa, 16:8 [Luz:Oscuridad] durante 5 días, después de lo cual se registró el número total de insectos expuestos a cada muestra de proteína, el número de insectos muertos y el peso de los insectos

supervivientes. La mortalidad por ciento y la inhibición del crecimiento por ciento se calcularon para cada tratamiento. La inhibición del crecimiento (GI) se calculó como sigue:

$$GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)]$$

donde TWIT es el peso total de insectos empleados en el tratamiento,

5 TNIT es el número total de insectos en el tratamiento,

TWIBC es el peso total de insectos en la Comprobación de Fondo (control de tampón), y

TNIBC es el número total de insectos en la Comprobación de Fondo (control de tampón).

Se determinó la GI<sub>50</sub> para que fuera la concentración de proteína DIG-3 en la dieta en la que el valor de GI era 50%. La LC<sub>50</sub> (Concentración Letal de 50%) se registró como la concentración de proteína DIG-3 en la dieta en la que habían muerto el 50% de insectos de ensayo. El análisis estadístico (ANOVA modo Uno) se realizó empleando el soporte lógico (software) JMP (SAS, Cary, NC).

10

La Tabla 6 presenta los resultados de análisis de bioensayos de proteína DIG-3 sobre barrenador europeo del maíz y barrenador europeo del maíz resistente a Cry1F (rECB). Un descubrimiento inesperado y sorprendente es el de que los insectos de ensayo rECB eran tan susceptibles a la acción de proteína DIG-3 como lo eran los insectos ECB de tipo natural.

15

Tabla 6

Valores de LC<sub>50</sub> y GI<sub>50</sub> calculados para ECB y rECB, con intervalos de confianza (CI) de 95%

Insecto	LC <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )	CI de 95%	GI <sub>50</sub> (ng/cm <sup>2</sup> )	CI de 95%
ECB	591,9	308,1 - 1.315,3	122,6	45,6 - 328,4
rECB	953,6	534 - 1.953,6	270,9	53,0 - 1.382,2

La Tabla 7 presenta los resultados de bioensayos llevados a cabo sobre un espectro amplio de lepidópteros y de una plaga de coleópteros (WCR). La proteína DIG-3 tiene una actividad inesperada y sorprendente sobre la palomilla dorso de diamante así como también rDBM. Además, la proteína Cry DIG-3 es eficaz para controlar el crecimiento de otros varios insectos lepidópteros

20

Tabla 7

Efectos insecticidas e inhibidores de crecimiento de proteína DIG-3 ingerida por insectos de ensayo

Insecto de ensayo	Respuesta a 9.000 ng/cm <sup>2</sup>	Análisis estadístico*
DBM	Mortalidad de 100%	
rDBM	Mortalidad de 100%	
CL	Mortalidad de 75%, GI insignificante	(GI) P<0,001, df = 1, α = 0,05
CEW	GI significativa	(GI) P = 0,02, df = 1, α = 0,05
TBW	GI visible, alguna mortalidad	No disponible
BCW	GI visible	No disponible
FAW	No observada actividad	
rFAW	No observada actividad	
WCR	No observada actividad	

25 \*GI = Inhibición de crecimiento. Valor P = estadística del ensayo, df = Grados de libertad, α (alfa) nivel 0,05 = nivel de significancia del ensayo.

#### Ejemplo 6

##### Transformación de *Agrobacterium*

Se emplearon métodos de clonación normales para la construcción de plásmidos binarios de transformación y expresión en plantas. Se obtuvieron endonucleasas de restricción y la ligasa T4 DNA de NEB. Las preparaciones de plásmidos se obtuvieron empleando el kit de preparación de plásmidos de NucleoSpin® o el kit AX Xtra Midu de NucleoBond® (ambos de Macherey Nagel), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los fragmentos de DNA se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick® o el kit de extracción de gel QIAEX II® (ambos de Qiagen) después de aislamiento de los geles.

30

Los fragmentos de DNA que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican la proteína DIG-3 en formas nativas o modificadas, o sus fragmentos, pueden sintetizarse por un suministrador comercial (p.ej. DNA2.0, Menlo Park, CA) y suministrarse como fragmentos clonados en vectores plasmídicos estándar, o pueden obtenerse mediante manipulaciones estándar de biología molecular u otras construcciones que contengan secuencias de nucleótidos apropiadas. Pueden identificarse sitios de restricción únicos, internos, para una región codificadora de DIG-3 y pueden sintetizarse fragmentos de DNA que comprenden las secuencias entre los sitios de restricción de la región codificadora de DIG-3, cada uno de cuyos fragmentos codifica una delección, inserción u otra variación específica de DIG-3. Los fragmentos de DNA que codifican los fragmentos de DIG-3 modificados pueden unirse a otros fragmentos de regiones codificadoras de DIG-3 u otros fragmentos de regiones codificadoras de Cry en sitios de restricción apropiados para obtener una región codificadora que codifique la proteína DIG-3 de longitud total deseada, una proteína DIG-3 de delección o variante, o una proteína fusionada. Por ejemplo, puede identificarse un sitio de reconocimiento de restricción apropiado en el comienzo de una primera región codificadora de DIG-3, y un segundo sitio de restricción interno para la región codificadora de DIG-3. La escisión de esta primera región codificadora de DIG-3 en estos sitios de restricción, podría generar un fragmento de DNA que comprendiera parte de la primera región codificadora de DIG-3. Un segundo fragmento de DNA flanqueado por sitios de restricción compatibles situados análogamente, específicos de otra región codificadora de DIG-3 u otra región codificadora de Cry, puede emplearse en combinación con el primer fragmento de restricción de DNA para construir un clon variante o fusionado.

En un ejemplo no limitativo, una estrategia de clonación básica puede ser para subclonar secuencias codificadoras de DIG-3 (CDS) de longitud total o modificada, en un plásmido de expresión en plantas en los sitios de restricción. *NcoI* y *SacI*. Las casetes de expresión en las plantas que resultan que contienen la región codificadora de DIG-3 apropiada bajo el control de elementos de expresión en plantas (p.ej. promotores expresivos en plantas, determinantes de adición de poliadenilato y terminación de transcripción del terminal 3', y similares) son subclonadas en un plásmido vector binario, que utiliza, por ejemplo, la tecnología Gateway® o procedimientos operatorios estándar de clonación de fragmentos de enzimas de restricción. LR Clonase™ (Invitrogen), por ejemplo, puede emplearse para recombinar las casetes de expresión en plantas de genes de longitud total y modificados en un plásmido de transformación en plantas binario si se utiliza la tecnología Gateway®. Es conveniente emplear un vector binario de transformación en plantas que aloje un gen bacteriano que confiera resistencia a la espectinomicina antibiótica cuando el plásmido está presente en células de *E. coli* y *Agrobacterium*. También es conveniente emplear un plásmido binario vector que contenga un gen marcador seleccionable expresivo en planta que sea funcional en las plantas huéspedes deseadas. Como ejemplos de genes marcadores seleccionables expresivos en planta, se incluyen, pero no se limitan a aquellos que codifican el gen de aminoglicósido fosfotransferasa (*aphII*) de transposón Tn5, que confiere resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y G418, así como también aquellos genes que codifican resistencia o tolerancia a glifosato, higromicina, metotrexato, y fosfotricina (bialafos), imidazolinonas, sulfonilureas y herbicidas de triazolopirimidina, tales como clorosulfurón, bromoxinil, dalapón y similares.

Se prepararon células electro-competentes de *Agrobacterium tumefaciens* cepa Z707S (un derivado resistente a estreptomomicina de Z707; Hepburn et al., 1985) y se transformaron utilizando electroporación (Weigel y Glazebrook, 2002). Después de electroporación se añadió a la cubeta 1 ml de caldo YEP (g/l: extracto de levadura.10; peptona, 10; NaCl, 5) y la suspensión de células en YEP se hizo pasar a un tubo de cultivo de 15 ml para incubar a 28° en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas. Las células se depositaron en placa sobre agar más YEP (25 g/l) con espectinomicina (200 µg/ml) y estreptomomicina (250 µg/ml) y las placas se incubaron durante 2-4 días a 28°. Se seleccionaron y rayaron las colonias aisladas separadas del pocillo, sobre placas de nueva adquisición de YEP + agar con espectinomicina y estreptomomicina, como antes, y se incubó a 28° durante 1-3 días.

La presencia del gen de DIG-3 inserto en el vector binario de transformación de planta se llevó a cabo por análisis de PCR utilizando cebadores específicos de vectores con DNA plasmídico de molde preparado a partir de colonias seleccionadas de *Agrobacterium*. El pellet de células procedente de una parte alícuota de 4 ml de un cultivo durante la noche de 15 ml crecido en YEP con espectinomicina y estreptomomicina como antes, se extrajo utilizando Mini Preps de Qiagen Spib®, realizado por instrucciones del fabricante. El DNA plasmídico procedente del vector binario utilizado en la transformación por electroporación de *Agrobacterium*, se incluyó como testigo. La reacción de PCR se completó utilizando Taq DNA polimerasa de Invitrogen según las instrucciones del fabricante, en concentraciones de 0,5X. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un MJ Research Peltier Thermal Cycler programado con las condiciones siguientes: Etapa 1) 94° durante 3 minutos; etapa 2) 94° durante 45 segundos, Etapa 3) 55° durante 30 segundos; etapa 4) 72° durante 1 minuto por kb de la longitud esperada del producto; etapa 5) 29 veces a la Etapa 2; Etapa 6) 72° durante 10 minutos. La reacción se mantuvo a 4° después de ciclar. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (p.ej. 0,7% a 1% de agarosa, p/v) y se visualizó por tinción con bromuro de etidio. Se seleccionó una colonia cuyo producto de PCR era idéntico al testigo de plásmido.

Alternativamente, la estructura del plásmido del vector binario de transformación en planta, que contiene el gen de DIG-3 inserto, se efectúa por realización del mapa restricción de huellas dactilares del digerido por restricción del DNA plasmídico preparado a partir de aislados de *Agrobacterium* candidato por métodos estándar de biología molecular bien conocidos por los expertos en la técnica de manejo de *Agrobacterium*.

Los expertos en la técnica de obtención de plantas transformadas por medio de métodos de transformación con mediación de *Agrobacterium*, podrán entender que otras cepas de *Agrobacterium* además de la Z707S pueden emplearse con ventaja, y que la elección de la cepa puede depender de la identidad de la especie de planta huésped que haya de transformarse.

5 Ejemplo 7

Producción de proteínas insecticidas de *B.t.* DIG-3 y variantes en plantas dicotiledóneas.

Transformación de *Arabidopsis*.- Se transforma *Arabidopsis thaliana* Col-01 utilizando el método de inmersión floral (Weigel y Glazebrook, 2002). La colonia de *Aerobacterium* seleccionada se utiliza para inocular 1 ml a 15 ml de cultivo de caldo YEP que contenía antibióticos apropiados de selección. El cultivo se incubaba durante la noche a 28° con agitación constante a 220 rpm. Cada cultivo se emplea para inocular dos cultivos de 500 ml de caldo YEP que contenía antibióticos adecuados de selección y los cultivos nuevos se incuban durante la noche a 28° con agitación constante. Se forman pelets con las células en aproximadamente 8.700 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se desecha el sobrenadante que resulta. El pelet celular se resuspende suavemente en 500 ml de medio de infiltración que contenía sales Murashige y Skoog 1/2x (Sigma-Aldrich), /vitaminas B5 de Gamborg (Gold BioTechnology, St. Louis, MO), sacarosa al 10% (p/v), bencilaminopurina 0,044,µM (10 µl/litro de una solución de reserva de 1 mg/ml en DMSO) y 300 µl/litro de Silver L-77. Las plantas, de aproximadamente 1 mes de edad, se sumergieron en el medio durante 15 segundos, teniendo cuidado de asegurar la sumergencia de la inflorescencia más nueva. Las plantas se dejaron luego sobre sus lados y se recubrieron (transparente u opaco) durante 24 horas, se lavaron con agua y se colocaron en posición vertical. Las plantas se hicieron crecer a 22°, con un período de iluminación de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión se cosecharon las semillas.

Crecimiento y selección de *Arabidopsis*.- Se deja secar semilla T1 recolectada recientemente durante al menos 7 días, a temperatura ambiente, en presencia de un desecante. La semilla se suspende en una solución de agar al 0,1%/agua (Sigma-Aldrich) y luego se estratifica a 4° durante 2 días. Para preparar el plante LP5 de Sunshine Max (Sun Gro Horticulture Inc. Bellevue, WA) en bandejas de germinación de 26,7 cm x 53,3 cm (10,5 pulgadas x 21 pulgadas) (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN) se recubre con vermiculita fina, subirrigada con solución de Hoagland (Hoagland y Amon, 1950) hasta humedecimiento, y después se deja secar durante 24 horas. La semilla estratificada se siembra en la vermiculita y se reviste con cúpulas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá durante 7 días. Las semillas se dejan germinar y las plantas se hacen crecer en un Conviron (Modelos CMP4030 o CMP3244: Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) en condiciones de día largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) en una intensidad de luz de 120-150 µmol/m<sup>2</sup>.sec a temperatura (22°) y humedad (40-50%) constantes. Las plantas se mojan inicialmente con solución de Hoagland y seguidamente con agua desionizada para mantener el suelo mojado pero no humedecido.

Se separan las cúpulas 5-6 días después de la siembra y las plantas se pulverizan con un agente químico de selección para matar las plantas germinadas procedentes de semillas sin transformar. Por ejemplo, si el gen marcador seleccionable que puede expresarse en la planta proporcionado por el vector binario de transformación en la planta, es un gen *pat\_o bar* (Wehrmann et al., 1996), las plantas transformadas pueden seleccionarse por pulverización con una solución de Finale 1000X (5,78% de glufosinato amónico, Farmam Companies Inc., Phoenix, AZ). Dos pulverizaciones subsiguientes se llevaron a cabo en intervalos de 5-7 días. Los sobrevivientes (plantas que crecen activamente) se identificaron 7-10 días después de la pulverización final y se trasplantaron a tuestos preparados con Sunshine Mix LP5. Las plantas trasplantadas se recubrieron con una cúpula de humedad durante 3-4 días y se colocaron en un Conviron en las condiciones de crecimiento anteriormente citadas.

Los expertos en la técnica de transformación de plantas dicotiledóneas comprenderán que están disponibles otros métodos de selección de plantas transformadas cuando se emplean otros genes marcadores seleccionables que pueden expresarse en plantas (p.ej. genes de tolerancia a herbicidas).

Bioensayos en insectos de *Arabidopsis* transgénico.- Se demuestra que líneas de *Arabidopsis* transgénico que expresan proteínas Cry modificadas, son activas frente a especies de insectos sensibles en ensayos de dietas sobrepuestas artificiales. La proteína extraída de líneas de *Arabidopsis* transgénico y no transgénico se cuantifica por métodos apropiados y se ajustan volúmenes de muestras a la concentración de proteína normalizada. Los bioensayos se realizan sobre dieta artificial como se ha mencionado antes. Se incluyen en los ensayos *Arabidopsis* no transgénico y/o tampón y agua, como tratamientos de comprobación de fondo

Ejemplo 8

Transformación de *Agrobacterium* para generación de vectores superbinarios

El sistema superbinario de *Agrobacterium* se emplea convenientemente para la transformación de huéspedes de plantas monocotiledóneas. Las metodologías para construir y validar vectores superbinarios están bien descritas y se incorporan en esta memoria por referencia (Operating Manual for Plasmid pSB1, Versión 3.1 disponible de Japan Tobacco, Inc., Tokio, Japón). Se emplean métodos microbiológicos y de biología molecular estándar para generar

plásmidos superbinarios. La verificación/validación de la estructura del plásmido superbinario se realiza empleando metodologías como las citadas anteriormente para vectores binarios, y pueden modificarse como se sugiere en el Operating Manual for Plasmid pSB1.

Ejemplo 9

5 Producción de proteínas insecticidas de *B.t*.DIG-3 y variantes en plantas monocotiledóneas.

Transformación de maíz por medio de *Agrobacterium*.- Semillas de un cruce de High II F<sub>1</sub> (Armstrong et al., 1991) se plantaron en tiestos de 24 litros (5 galones) que contenían una mezcla de medio de crecimiento limpio de 95% de Metro-Mix 360 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) y 5% de tierra vegetal de arcilla/limo. Las plantas se hicieron crecer en un invernadero que utiliza una combinación de lámparas de haluro de sodio y metal de alta presión con un fotoperíodo de luz:oscuridad de 16:8 horas. Para obtener embriones F inmaduros para la transformación, se llevaron a cabo sib-polinaciones controladas. Se aislaron embriones inmaduros a 8-10 días después de la polinación cuando los embriones tenían un tamaño, aproximadamente, de 1,0 a 2,0 mm.

15 Infección y co-cultivo.- Espigas de maíz son esterilizadas en superficie por agregación con jabón líquido, sumergiendo en etanol de 70% durante 2 minutos, y sumergiendo luego en lejía comercial al 20% (hipoclorito sódico al 0,1%) durante 30 minutos antes ser enjuagadas con agua estéril. Se prepara una suspensión de células de *Agrobacterium* que contenían un vector superbinario, haciendo pasar 1-2 lazos de bacterias hechas crecer en un medio sólido de YEP que contenía 100 mg/l de espectinomicina 10 mg/l de tetraciclina y 250 mg/l de estreptomina, a 28°, durante 2-3 días en 5 ml de medio de infección líquido (LS Basal Medium (Linsmaier y Skoog, 1965), vitaminas N6 (Chu et al., 1975), 1,5 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), & 8,5 g/l de sacarosa, 36,0 g/l de glucosa y 6 mM de L-prolina, pH 5,2) que contenía acetosiringona, 100 µM. La solución se vertió con formación de remolinos hasta conseguir una suspensión uniforme y la concentración se ajustó a una densidad final de aproximadamente 200 unidades Klett, empleando un colorímetro Klett-Summerson con un filtro púrpura, o una densidad óptica de aproximadamente 0,4 a 550 nm. Se aislaron los embriones inmaduros directamente en un tubo de micro-centrífuga que contenía 2 ml del medio de infección. Se separó el medio y se reemplazó con 1 ml de la solución de *Agrobacterium* con una densidad de 200 unidades Klett, y la solución de *Agrobacterium* y embriones se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se hizo pasar a medio de co-cultivo (LS Basal Medium, vitaminas N6, 1,5 mg/l de 2,4-D, 30,0 g/l de sacarosa, L-prolina 6 mM, AgNO<sub>3</sub> 0,85 mg/l, acetosiringona 100 µM, goma gelano 3,0 g/l (*PhytoTechnology Laboratories*, Lenexa, KS), pH 5,8) durante 5 días a 25° en condiciones de oscuridad.

30 Después de co-cultivo, los embriones se hicieron pasar a medio selectivo después de lo cual se obtuvieron aislados transformados durante el curso de aproximadamente 8 semanas. Para la selección de tejidos de maíz transformados con un plásmido superbinario que contenía un gen marcador seleccionable *pat* o *bar* que se expresa en plantas, se empleó un medio Basal LS, vitaminas N6, 2,4-D 1,5 mg/l, MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, monohidrato; *PhytoTechnologies Labr.*) 0,5 g/l, sacarosa 30,0 g/l, L-prolina 6 mM, AgNO<sub>3</sub> 1,0 mg/l, cefotaxima 250 mg/l, goma gelano 2,5 g/l, pH 7,5), con Bialaphos (Gold BioTechnology). Los embriones se hicieron pasar a medios de selección que contenían Bialaphos, 3 mg/l, hasta obtener aislados embriogénicos. Los aislados recuperados se agruparon haciéndolos pasar a medio de selección de nueva aportación en intervalos de 2 semanas para determinar la regeneración y otros análisis.

40 Los expertos en la técnica de transformación de maíz comprenderán que están disponibles otros métodos de selección de plantas transformadas cuando se emplean otros genes marcadores seleccionables que se expresan en plantas (p.ej. genes de tolerancia a herbicidas).

45 Regeneración y producción de semillas.- Para regeneración, los cultivos se hacen pasar a medio de inducción "28" (sales MS y vitaminas, sacarosa 30 g/l, Bencilaminopurina 5 mg/l, 2,4-D 0,25 mg/l, Bialaphos 3 mg/l, cefotaxina 250 mg/l, goma gelano 2,5 g/l, pH 5,7) durante 1 semana en condiciones de luz baja (14 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) y luego 1 semana en condiciones de luz alta (aproximadamente 89 µEm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Los tejidos se hicieron pasar seguidamente a medio de regeneración "36" (el mismo que el medio de inducción excepto que carecía de reguladores del crecimiento de plantas). Cuando las plantitas crecieron hasta 3,5 cm de longitud, fueron hechas pasar a tubos de cultivo de vidrio que contenían medio SHGA (sales de Schenk y Hildebrandt y vitaminas (1972); *PhytoTechnologies Labd.*), *myo*-inositol 1,0 g/l sacarosa 10 g/l y goma gelano 2,0 g/l, pH 5,8) para permitir un crecimiento adicional y un desarrollo del vástago y de las raíces. Las plantas se transplantaron a la misma mezcla de tierra que se ha descrito anteriormente en esta memoria y se cultivaron hasta florecientes en el invernadero. Se llevaron a cabo polinaciones reguladas para la producción de semillas.

Ejemplo 10

Bioensayo de maíz transgénico

55 La bioactividad de la proteína DIG-3 y variantes producidas en células de plantas, se demuestra mediante métodos de bioensayo convencionales (véase, por ejemplo, Huang et al., 2006). Es posible demostrar eficacia, por ejemplo, alimentando diversos tejidos de plantas o piezas de tejidos procedentes de una planta que produce una toxina DIG-3

5 para insectos diana en un medio ambiente de alimentación regulado. Alternativamente, pueden prepararse extractos de proteínas partiendo de diversos tejidos de plantas que proceden de una planta que produce la toxina DIG-3 e incorporar las proteínas extraídas en un bioensayo de dieta artificial como se ha descrito anteriormente en esta memoria. Ha de entenderse que los resultados de tales ensayos de alimentación han de ser comparados con bioensayos llevados a cabo de modo semejante empleando tejidos testigo apropiados procedentes de plantas huésped que no producen la proteína DIG-3 o variantes, o a otras muestras testigo.

## Referencias

- An, G., Watson, B. D., Stachel, S., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. *EMBO J.* 4:277-284.
- 5 Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402.
- Armstrong, C. L., Green, C. E., Phillips, R. L. (1991) Development and availability of germplasm with high Typell culture formation response. *Maize Genet. Coop. Newslett.* 65:92-93.
- 10 Aronson, A.I., Han, E.-S., McGaughey, W., Johnson, D. (1991) The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:981-986.
- Aronson, A. I., Geng, C., Wu. L. (1999) Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2503-2507.
- 15 Arvidson, H., Dunn, P. E., Strand, S., Aronson, A. I. (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved in vivo and in the structure of a purified toxin. *Molec. Microbiol.* 3:1533-1543.
- Ausubel et al., eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York).
- 20 Bailey, J. M., Shenov, N. R., Ronk, M., and Shively, J. E., (1992) Automated carboxy-terminal sequence analysis of peptides. *Protein Sci.* 1:68-80.
- Beltz, G.A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C. (1983) Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods. In Wu, R., Grossman, L., Moldave, K. (eds.) *Methods of Enzymology*, Vol. 100 Academic Press, New York pp.266-285.
- 25 Bown, D. P., Wilkinson, H. S., Jongsma, M. A., Gatehouse, J. A. (2004) Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 34,:305-320.
- Bravo, A., Gill, S. S., Soberon, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423-435.
- 30 Caruthers, M. H., Kierzek, R., Tang, J. Y. (1987) Synthesis of oligonucleotides using the phosphoramidite method. *Bioactive Molecules (Biophosphates Their Analogues)* 3:3-21.
- Christeller, J. T., Laing, W. A., Markwick, N. P., Burgess, E. P. J. (1992) Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22:735-746.
- 35 Chu, C. C., Wand, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y., Bi, F. Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18:659-668.
- Cramer, A., Cwirla, S., Stemmer, W. P. C. (1996a) Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat. Med.* 2:100-103.
- 40 Cramer, A., Dawes, G., Rodriguez, E., Silver, S., Stemmer, W.P.C. (1997) Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nat. Biotech.* 15:436-438.
- Cramer, A., Whitehom, E.A., Tate, E., Stemmer, W. P. C. (1996b) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotech.* 14:315-319.
- 45 de Maagd, R. A., Kwa, M. S., van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J. M., Stiekema, W. J., Bosch, D. (1996) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37:409-433.

- Diaz-Mendoza, M., Farinos, G. P., Castanera, P., Hernandez-Crespo, P., Ortego, F. (2007) Proteolytic processing of native Cry1Ab toxin by midgut extracts and purified trypsins from the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.* 53:428-435.
- 5 Englemann, F., Geraerts, W. P. M., (1980) The proteases and the protease inhibitor in the midgut of *Leucophaea maderae*. *J. Insect Physiol.* 26:703-710.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B. (1986) Genetic transformation in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46.
- Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M. S. P., Shai, Y. (1998) The structure and organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95:12289-12294.
- 10 Ge, A., Rivers, D., Milne, R., Dean, D. H. (1991) Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). *J. Biol. Chem.* 266:17954-17958.
- Gillikin, J. W., Bevilacqua, S., Graham, J. S. (1992) Partial characterization of digestive tract proteinases from western corn rootworm larvae, *Diabrotica virgifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 19:285-298.
- 15 Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberon, M. (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Lett.* 513:242-246.
- Haider, M. Z., Knowles, B. H., Ellar, D. J. (1986) Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal  $\delta$ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.* 20 156:531-540.
- Heckel, D. G., Gahan, L. J., Baxter, S. W., Zhao, J-Z., Shelton, A. M., Gould, F., Tabashnik, B. E. (2007) The diversity of Bt resistance genes in species of *Lepidoptera*. *J. Invert. Pathol.* 95:192-197.
- Hepburn, A. G., White, J., Pearson, L., Maunders, M. J., Clarke, L. E., Prescott, A. G. Blundy, K. S. (1985) The use of pNJ5000 as an intermediate vector for the genetic manipulation of *Agrobacterium* Ti-plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 25 131:2961-2969.
- Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950) The water-culture method of growing plants without soil. *Calif. Agr. Expt. Sta. Circ.* 347.
- Hofte, H., de Greve, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., van Montagu, M., Zabeau, M., Vaeck, M. (1986) "Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715." *Eur. J. Biochem.* 30 161:273-280.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 77:61-68.
- Huang, F., Rogers, L. B., Rhatt, G. H. (2006) Comparative susceptibility of European corn borer, southwestern corn borer, and sugarcane borer (*Lepidoptera*: Crambidae) to Cry1Ab protein in a commercial *Bacillus thuringiensis* corn hybrid. *J. Econ. Entomol.* 35 99:194-202.
- Huang, K-X., Badger, M., Haney, K., Evans, S. L. (2007) Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. *Prot. Express. Purific.* 53:325-330.
- Janmaat, A. F., Myers, A. H. (2003) Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc. Royal Soc. London. Ser. B, Biolog. Sci.* 270:2263-2270.
- 40 Janmaat, A. F., Myers, A. H. (2005) The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. *Proc. Royal Soc. London. Ser. B, Biolog. Sci.* 272:1031-1038.
- Karlin, S., Altschul, S. F. (1990) Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268.
- Karlin, S., Altschul, S. F. (1993) Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877.
- 45 Keller, G.H., Manak, M. M. (1993) DNA Probes, Background, Applications, Procedures. Stockton Press, New York, NY.
- Knight, J. S., Broadwell, A. H., Grant, W. N., Shoemaker, C. B. (2004) A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains. *J. Econ. Entomol.* 97:1805-1813.

- Koiwa, H., Shade, R. E., Zhu-Salzman, K., D'Urzo, M. P., Murdock, L. L., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. (2000) A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. *FEBS Letters* 471:67-70.
- 5 Larson, S. M., England, J. L., Desjarlais, J. R., Pande, V. S. (2002) Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles. *Protein Sci.* 11:2804-2813.
- Lee, L.-Y., Gelvin, S. B. (2008) T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol.* 146: 325-332.
- Linsmaier, E.M., Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue. *Physiologia Plantarum* 18:100-127.
- 10 Littlefield, J. W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science* 145:709-710.
- Meinkoth, J., Wahl, G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* 138:267-284.
- Myers, E., Miller, W. (1988) Optimal alignments in linear space. *CABIOS* 4:11-17.
- 15 Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukiandjiev, S., de Maagd, R.A. (2001) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1 hybrid proteins with increased activity against the Colorado Potato Beetle. *Appl. Environ. Microbiol.* 11:5328-5330.
- Needleman, S. B., Wunsch, C. D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48:443-453.
- 20 Nunez-Valdez, M.-E., Sanchez, J., Lina, L., Guereca, L., Bravo, A. (2001) Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin. *Biochim. Biophys. Acta, Prot. Struc. Molec. Enzymol.* 1546:122-131.
- Ochoa-Campuzano, C., Real, M. D., Martinez-Ramirez, A. C., Bravo, A., Rausell, C. (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362:437-442.
- 25 Pigott, C. R., Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 71:255-281.
- Rang, C., Vachon, V., de Maagd, R. A., Villalon, M., Schwartz, J.-L., Bosch, D., Frutos, R., Laprade R. (1999) Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925.
- 30 Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)
- Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204
- Schnepf, H. E., Tomczak, K., Ortega, J. P., Whiteley, H. R. (1990) Specificity-determining regions of a Lepidopteran-specific insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930.
- 35 Soberon, M., Pardo-Lopez, L., Lopez, I., Gomez, I., Tabashnik, B. E., Bravo, A. (2007) Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318:1640-1642.
- Squires, C. H., Retallack, D. M., Chew, L. C., Ramseier, T. M., Schneider, J. C., Talbot, H. W. (2004) Heterologous protein production in *P. fluorescens*. *Bioprocess Intern.* 2:54-59.
- 40 Stemmer, W. P. C. (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751
- Stemmer, W. P. C. (1994b) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391.
- Stemmer, W. P. C. (1995) Searching sequence space. *Bio/Technology* 13:549-553.
- Stewart, L. (2007) Gene synthesis for protein production. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, Ltd.
- 45 Stewart, L., Burgin, A. B., (2005) Whole gene synthesis: a gene-o-matic future. *Frontiers in Drug Design and Discovery* 1:297-341.
- Suggs, S.V., Miyake, T., Kawashime, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K., R.B. Wallace, R. B. (1981) ICN-UCLA Symposium. *Dev. Biol. Using Purified Genes*, D. D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-69

- Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Luo, K., Adang, M. J. (1994) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:4120-4124.
- Tabashnik, B. E., Gassmann, A. J., Crowder, D. W., Carriere, T. (2008) Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotech.* 26:199-202.
- 5 Taggart, R. T., Samloff, I. M. (1983) Stable antibody-producing murine hybridomas. *Science* 219:1228-1230.
- Thie, N. M. R., Houseman J. G. (1990) Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae) *Insect Biochem.* 20:313-318.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.
- 10 Tijssen, P. (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2.* P. C. van der Vliet [ed.], (Elsevier, N.Y.)
- Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes to Cells* 2:13-28.
- Walters, F. S., Slatin, S. L., Kulesza, C. A., English, L. H. (1993) Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:921-926.
- 15 Walters, F. S., Stacy, C. M., Lee, M. K., Palekar, N., Chen, J. S. (2008) An engineered chymotrypsin/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis* Cry3A active against western corn rootworm larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:367-374.
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A. (1996) The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat. Biotechnol.* 14:1274-1278.
- 20 Weigel, D., Glazebrook, J. [eds.] (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 354 pages.
- Witkowski, J. F., Wedberg, J. L., Steffey, K. L., Sloderbeck, P. E., Siegfried, B. D., Rice, M. E., Pilcher, C. D., Onstad, D. W., Mason, C. E., Lewis, L. C., Landis, D. A., Keaster, A.J., Huang, F., Higgins, R. A., Haas, M. J., Gray, M. E., Giles, K. L., Foster, J. E., Davis, P. M., Calvin, D. D., Buschman, L. L., Bolin, P. C., Barry, B. D., Andow, D. A., Alstad, D. N. (2002) *Bt corn and European Corn Borer* (Ostlie, K. R., Hutchison, W. D., Hellmich, R. L. (eds)). University of Minnesota Extension Service. Publ. WW-07055.
- Wolfson, J. L., Murdock, L. L. (1990) Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 16:1089-1102.
- 30 Worley, C. K., Ling, R., Callis, J. (1998) Engineering in vivo instability of firefly luciferase and *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase in higher plants using recognition elements from the ubiquitin pathway. *Plant Molec. Biol.* 37:337-347.

**Listado de secuencias**

<110> Lira, Justin Butler, Holly Smith, Doug Narva, Ken Meade, Thomas

5 <120> Proteínas insecticidas de Bacillus thuringiensis

<130> 67321

<160> 7

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 3771

15 <212> DNA

<213> Bacillus thuringiensis

<220>

<221> característica\_misc

20 <222> (1)..(3)

<223> codón de inicio de la traducción que especifica Met

<400> 1

ttgacttcaa ataggaaaaa tgagaatgaa attataaaatg ctttatcgat tccaacggta	60
togaatcett ccacgcaaat gaatctatca ccagatgctc gtattgaaga tagcttgtgt	120
gtagccgagg tgaacaatat tgatccattt gttagcgcac caacagtcca aacgggtata	180
aacatagctg gtagaatatt gggcgtatta ggtgtgccgt ttgctggaca actagctagt	240
ttttatagtt ttcttgttgg tgaattatgg cctagtggca gagatccatg ggaaattttc	300
ctggaacatg tagaacaact tataagacaa caagtaacag aaaatactag gaatacggct	360
attgctcgat tagaaggtct aggaagaggc tatagatcct accagcaggc tcttgaaact	420
tggttagata accgaaatga tgcaagatca agaagcatta ttcttgagcg ctatgttgct	480
ttagaacttg acattactac tgctataccg cttttcagaa tacgaaatca agaggttcca	540
ttattaatgg tatatgctca agctgcaaat ttacacctat tattattgag ggacgcatcc	600
ctttttggta gtgaatgggg gacggcatct tccgatgtta accaatatta ccaagaacaa	660
atcagatata cagaggaata ttctaacctat tgcgtacaat ggtataatac ggggctaaat	720
aacttaagag ggacaaatgc tgaaagtgg gtacgggtata atcaattccg cagagaccta	780
acattagggg tattagatct agtggcccta ttcccaagtt atgacactcg cacttatcca	840
atcaatacga tgctcagtt aacaagagaa gtttatacag acgcaattgg gaccgtacat	900
ccgagtcaag cttttgcaag tacgacttgg ttaataata atgcaccatc gttttctgcc	960
atagaagctg cggttatcag gcctccgcat ctacttgatt ttccagaaca acttacaatt	1020
tacagcatat taagtcgatg gagtaacact cagtttatga atatatgggc aggtcataga	1080
cttgaatccc gcccaatagc agggtcatta aatacctcta cacaaggatc taccaatact	1140
tctattaatc ctgtaacatt acagtttacg tctcgagaca tttataggac tgaatcattg	1200
25 gcagggctaa atatatattat aactcaacct gttaatgggg ttccttgggt tagatttaat	1260

# ES 2 532 145 T3

tggagaaatc coctgaattc tcttagaggt agccttctct atacgatagg gtatactgga	1320
gttgggacgc aattacaaga ttcagaaact gaattacccc cagaaacaac agaacgacca	1380
aattatgaat catatagtca tagattatct catataggac tcatttcac c atctcatgtg	1440
agagcattgg tatattcttg gacgcaccgt agtgcagatc gtacgaatac gattggacca	1500
aatagaatta ctcaaattcc tgcagtgaag ggaagatttc tttttaatgg ctctgtaatt	1560
tcaggaccag gatttactgg tggagacgta gttagattga ataggaataa tggtaaatatt	1620
caaaatagag ggtatattga agttccaatt caattcacgt cgacatctac cagatatcga	1680
gttcgagtac gttatgcttc tgtaacctcg attgagctca atggttaattg gggcaattca	1740
tcaattttta cgaacacatt accagcaaca gctgcatcat tagataatct acaatcaggg	1800
gattttgggt atggtgaaat caacaatgct tttacatccg caacaggtaa tatagtaggt	1860
gttagaaatt ttagtgcaaa tgcagaggta ataatagaca gatttgaatt tatcccagtt	1920
actgcaacct tcgaggcaaa atatgattta gaaagagcac aaaaggcggg gaatgctctg	1980
tttacttcta caaatccaag aagattgaag acagatgtga cagattatca tattgaccaa	2040
gtgtccaatc tgggtgatg tttatcagat gaattttgct tggatgagaa gcgagaatta	2100
tttgagaaag tgaaatatgc gaagcgactc agtgatgaaa gaaacttact ccaagatcca	2160
aacttcacat tcatcaatgg gcaaccaagt tttgcatcca tcgatggaca atcaaaactc	2220
acctctatta atgagctatc taatcatgga tgggtgggca gtgcgaaatg taccattcag	2280
gaagggaatg acgtatttaa agagaattac gtcacactac cgggtacttt taatgagtgt	2340
tatccaaatt atttatatca aaaaatagga gagtcagaat taaaggctta tacgcgctat	2400
caattaagag ggtatattga agatagtcaa gatctagaga tttatttaat tcgttacaat	2460
gcaaagcatg aaacattaaa tgttccagggt accgagtccc tatggccgct ttcagttgaa	2520
agcccaatcg gaaggcggg agaaccaaat cgatgcgcac cacattttgg atggaatcct	2580
gatctagatt gttcctgcag agatagagaa aaatgtgcgc atcattccca tcatttcaat	2640
ttggatattg atggtgatg cacagacttg caagaggatc taggcgtgtg gggttattc	2700
aagattaaga cgcaggaagg ttatgcaaga ttaggaaatc tgggaatttat cgaagagaaa	2760
ccattaattg gagaagcact gtctcgtgtg aagagagcgg aaaaaaatg gagagacaaa	2820
agggaaaaac tacaagtgga aacaaaacga gtatatatag acgcaaaaga agctgtggat	2880
gctttattcg tagattctca atatgataga ttacaagcag atacaaacat cggtatgatt	2940
catgcccag atagacttgt tcatcggatc cacgaggctt atcttccaga actaccttc	3000
attccaggaa taaatgtggt gatttttgaa gaattagaaa accgtatttc tactgcattt	3060
tccttatatg atgcgagaaa tgtcattaaa aatggcgatt tcaataatgg attgacatgc	3120
tggaaactga aagggcatgt agaggtacag cagctgaaca atcatcgttc ggtccttgc	3180
atcccggaaat gggaagcaga agtttcacaa aaggtgcgcg tctgtccagg tcgtggctat	3240
attcttcgtg tcacagcgtc caaagaggga tatggggaag gctgcgtaac tattcatgaa	3300

# ES 2 532 145 T3

```

gtcgataata atacagacca attgaagttt agcaactgtg agaaaggaca agtatatcca      3360
ggtaatacga tagcatgtaa tgattataat aagaatcatg gtgcgaatgc atgtagttct      3420
cgtaatcgtg gatatgacga attctatgga aacaccccag ctgattattc tgcaaatcaa      3480
aaagaatacgg ggggtgcgta cacttcccac aatcatgcat atggcgaatc ttatgaaagt      3540
aattcgtcca taccagctga ttatgcgccg gtttatgaag aagaagcgtg tacacatgga      3600
cgaagaggtg attcttgtga atataacaga ggggtatacac cattaccagc tggttatgtg      3660
acagcagagt tagaatactt cccagaaacg gatacagtat gggttgagat tggagaaacg      3720
gaaggaacat ttatcgtgga caatgtggaa ttactcctta tggaggaata g              3771

```

<210> 2

<211> 1256

5 <212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 2

```

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

```

10

# ES 2 532 145 T3

Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe  
 245 250 255  
 Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro  
 260 265 270  
 Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr  
 275 280 285  
 Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly Thr Val His Pro Ser Gln Ala  
 290 295 300  
 Phe Ala Ser Thr Thr Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala  
 305 310 315 320  
 Ile Glu Ala Ala Val Ile Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro Glu  
 325 330 335  
 Gln Leu Thr Ile Tyr Ser Thr Leu Ser Arg Trp Ser Asn Thr Gln Phe  
 340 345 350  
 Met Asn Ile Trp Ala Gly His Arg Leu Glu Ser Arg Pro Ile Ala Gly  
 355 360 365  
 Ser Leu Asn Thr Ser Thr Gln Gly Ser Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro  
 370 375 380  
 Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Ile Tyr Arg Thr Glu Ser Leu  
 385 390 395 400  
 Ala Gly Leu Asn Ile Phe Ile Thr Gln Pro Val Asn Gly Val Pro Trp  
 405 410 415  
 Val Arg Phe Asn Trp Arg Asn Pro Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Leu  
 420 425 430  
 Leu Tyr Thr Ile Gly Tyr Thr Gly Val Gly Thr Gln Leu Gln Asp Ser  
 435 440 445  
 Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser  
 450 455 460  
 Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ser Ser Ser His Val  
 465 470 475 480  
 Arg Ala Leu Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn  
 485 490 495  
 Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly Arg  
 500 505 510  
 Phe Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly  
 515 520 525  
 Asp Val Val Arg Leu Asn Arg Asn Asn Gly Asn Ile Gln Asn Arg Gly  
 530 535 540  
 Tyr Ile Glu Val Pro Ile Gln Phe Thr Ser Thr Ser Thr Arg Tyr Arg  
 545 550 555 560  
 Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val Thr Ser Ile Glu Leu Asn Val Asn  
 565 570 575  
 Trp Gly Asn Ser Ser Ile Phe Thr Asn Thr Leu Pro Ala Thr Ala Ala  
 580 585 590  
 Ser Leu Asp Asn Leu Gln Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Val Glu Ile Asn  
 595 600 605

# ES 2 532 145 T3

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

# ES 2 532 145 T3

Ile Gly Met Ile His Ala Ala Asp Arg Leu Val His Arg Ile His Glu  
 980 985 990

Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Pro Phe Ile Pro Gly Ile Asn Val Val Ile  
 995 1000 1005

Phe Glu Glu Leu Glu Asn Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ser Leu Tyr  
 1010 1015 1020

Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu  
 1025 1030 1035

Thr Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Glu Val Gln Gln Leu Asn  
 1040 1045 1050

Asn His Arg Ser Val Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val  
 1055 1060 1065

Ser Gln Lys Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg  
 1070 1075 1080

Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile  
 1085 1090 1095

His Glu Val Asp Asn Asn Thr Asp Gln Leu Lys Phe Ser Asn Cys  
 1100 1105 1110

Glu Lys Gly Gln Val Tyr Pro Gly Asn Thr Ile Ala Cys Asn Asp  
 1115 1120 1125

Tyr Asn Lys Asn His Gly Ala Asn Ala Cys Ser Ser Arg Asn Arg  
 1130 1135 1140

Gly Tyr Asp Glu Phe Tyr Gly Asn Thr Pro Ala Asp Tyr Ser Ala  
 1145 1150 1155

Asn Gln Lys Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser His Asn His Ala  
 1160 1165 1170

Tyr Gly Glu Ser Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Ile Pro Ala Asp Tyr  
 1175 1180 1185

Ala Pro Val Tyr Glu Glu Glu Ala Tyr Thr His Gly Arg Arg Gly  
 1190 1195 1200

Asn Ser Cys Glu Tyr Asn Arg Gly Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly  
 1205 1210 1215

Tyr Val Thr Ala Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Thr Val  
 1220 1225 1230

Trp Val Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Asn  
 1235 1240 1245

Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu  
 1250 1255

<210> 3  
 <211> 3771  
 5 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Molécula sintética

10 <400> 3

atgacctcca accgtaagaa cgaaaacgaa atcatcaatg ccctcagcat acccaccgtt

60

# ES 2 532 145 T3

agcaatccct ccactcagat gaacctcage ccagatgccca gaattgagga ctccctctgc	120
gtggcagagg tgaacaacat tgaccctttt gtctcagcct ccactgttca aactggcatc	180
aacattgtcg ggaggattct tgggtgtcctc ggtgtcccat tegctggcca gctcgtttct	240
ttctactect ttctggttgg tgagctgtgg ccttcggac gtgacccttg ggaaatcttc	300
cttgagcacg ttgaacagct gattaggcag caagttactg aaaacacacg taacacagcc	360
attgccagac tggagggctc cggcagagga tatcgcagct atcagcaagc actggaaacg	420
tggctggata acagaaatga tgcaaggtea cgctccatca ttctcgaacg ctacgtggca	480
ctggaacttg acataacaac agccatacct ctgttcagaa tcagaaacca agaagtcctc	540
ctgttgatgg tctatgtcca agcagccaac ttgcacttgc ttcttttgag ggatgcctct	600
ctgttcggga gcgaatgggg aaccgcttcc agcgacgtga atcagtacta tcaagagcag	660
ataagataca cggaagagta ctcaaatcac tgcgttcagt ggtacaatac tggcttgaac	720
aatctgcgtg gcaccaatgc cgaatcttgg gtgcgttaca atcagttcag aagagacctc	780
acaactgggg tgctcgacct cgttgccttc tttccaagct atgacacaag gacttatccc	840
atcaatactt cagcacagct gacgagggaa gtgtacacag acgcaatagg cacagttcac	900
ccctoccaag cctttgcctc cagcagatgg ttcaacaaca atgcaccctc attctcagcc	960
atagaagcag ctgtgattcg tccaccccat ttgctggact ttccagagca gttgacgatc	1020
tatagcacco tttcaaggtg gtcaaacacg caattcatga acatttgggc tggatcataga	1080
cttgagtcaa ggccaatgc tggttctctt aacacatcaa cccaaggctc caccaacacc	1140
tccatcaacc cagtcaccct ccagttcacc agcagagaca tctatcgcac agaatccctt	1200
gctggactca acatcttcat tacacagcca gtcaatggag tcccgtgggt gaggttcaac	1260
tggaggaatc cottgaactc acttagggga agccttcttt acaccatagg ttacacgggt	1320
gtgggaacgc agttgcaaga ttcagagact gaactgcctc ccgagaccac cgaacgtccc	1380
aactatgaat catactccca ccgtctgtcc cacattggtc ttatcagctc cagccacgtg	1440
cgtgccctcg tctactcttg gacgcacgc tccgctgata ggaccaatac cataggtccg	1500
aatagaatca ccagatccc agcagtgaaag ggcagattct tgttcaatgg ctctgtcatt	1560
tctggtcctg gtttcaactg tggtagcgtc gttcgcctga acagaaacaa tgggaacatt	1620
caaaaccgtg gttacatoga ggtgcccatc cagtttactt ctacatcaac acgttacaga	1680
gttcgcgtca gatacgctc tgtgacttct attgaattga acgtgaaactg gggaaacagc	1740
tctatcttca ctaacacact tccagccacc gcagcttcac tggacaatct tcagtctggg	1800
gactttggtt atgtggagat caacaatgct ttcacgtctg ccactgggaa cattgttgg	1860
gtgagaaact tctctgcaa tgccgaggtg atcatagata gatttgagtt cattccagtt	1920
actgccacct ttgaggcaaa gtacgatctt gagagagcac agaaggctgt caacgctctg	1980
ttcacaagca ccaaccacaag acgtctgaaa actgatgtga cagactatca catcgatcaa	2040
gttagcaact tgggtggttg cctctcagat gagttctgct tggatgagaa gagggaactc	2100

# ES 2 532 145 T3

```

tttgagaagg ttaagtatgc aaaacgcctt tcagacgaaa gaaacttgct gcaagacccc 2160
aactttacgt tcatcaatgg acaacctagc ttcgcttcca ttgatggcca aagcaacttt 2220
acttctatca atgagttgtc taatcacggc tggtagggaa gcgcaaatgt cacaattcaa 2280
gaaggcaacg atgtgttcaa agagaactac gtgacgctgc ctggaacatt caatgagtgt 2340
tatccgaact acttgatca gaagattggg gaatcagagc tgaaggctta cactcgctat 2400
cagctgctgt gttacatoga ggactcccaa gaccttgaat tctatctcat ccgtacaac 2460
gctaaacacg agacattgaa tgttcctgga acagagtccc tttggcctct gtcagttgag 2520
tctcctatag ggaggtgtgg cgaacctaac agatgtgctc ctcactttgg gtggaatccc 2580
gatttgatt gctctgtgag ggatcgagc aagtgcgctc accattcaca ccaactttacg 2640
ctggacatag atgttgctg cacggacctt caagaggatc tcggtgtgtg ggtcgtgttc 2700
aagatcaaaa ctcaagaggc ctacgcaaga ctcggaatc ttgagttcat tgaggagaag 2760
cctctcattg gcgagctct ctctaggggt aagagagccg agaagaagtg gcgtgacaag 2820
agggagaaac ttcaagtga gacgaagagg gtgtacattg atgctaaga ggctgttgat 2880
gcactgtttg tggattcaca gtatgatagg ctccaagctg acacaaacat tggaatgatt 2940
catgcagcag atgcctcgt gcacgcac ccatgaggctt atcttccgga actcccgctc 3000
atccctggga tcaatgttgt catctttgag gagcttgaga accgcatatc cacagccttt 3060
tcctctacg atgctagaaa tgttatcaag aatggcgatt tcaacaatgg cttgacgtgt 3120
tggaatgtca aagggcatgt tgaggtccaa cagttgaaca accataggtc agtcctcgtc 3180
attccggagt gggaggcaga ggtagccaa aaggtgagag tttgcctcgg acgtggctac 3240
attctgagag tcaactgccta caaggagggc tacggagaag ggtgcgtcac catccatgaa 3300
gttgataaca atactgacca gttgaagttt tccaactcgc agaaagggca agtgtatcct 3360
gggaatacca ttgcatgtaa cgattacaac aagaatcacg gtgctaaccg ttgctcatct 3420
cgcaataggg gatatgatga gttctatggc aatactccag ctgactactc tgcaaaccag 3480
aaagagtatg gaggagctta caccagccac aaccatgcct atggggaaatc ttacgaatcc 3540
aacagcagca tcccagcaga ctatgctccg gtctacgagg aggaagccta cacacatgga 3600
aggaggggaa actcatgtga gtacaataga ggctacactc cgttgccagc tggtacgtc 3660
actgccgaat tgagtagtct tccggaacc gacactgtct gggttgagat aggcgaaact 3720
gagggcacct tcatcgttga caacgtgga cttctgctta tggagaata g 3771

```

<210> 4

<211> 545

5 <212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<400> 4

```

Leu Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala
1           5           10           15

```

10

```

Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp
20           25           30

```

# ES 2 532 145 T3

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



# ES 2 532 145 T3

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





## ES 2 532 145 T3

```

ctcgaggctg aatctgatct cgaaaaggca cagaaagctg taaacgcatt gtttacaagt      60
tctaatacaa tcggactcaa aaccgatggt acggactatc acatagatag ggtttctaata      120
cttgtggaat gtctttcaga tgagttttgt ttagatgaga agaaagaact ttcagaaaaag      180
gtcaagcacg ccaaaaagact gtccgatgaa aggaatctcc ttcaagaccc aaactttcgt      240
ggaatcaata ggcagctcga cagagggttg agagggagca cagatatcac cattcaagga      300
ggagatgacg ttttcaaaga gaactatgtc accttgtag gcaccttga tgagtgtctat      360
ccaacttato tgtatcagaa gattgatgaa tccaagctga aggcttacac aagatatcag      420
ctcagaggat acatcgagga ctccaagat ttggagatat acttgattcg ttacaatgca      480
aaacatgaga ccgtgaatgt tcttggact ggaagtctct ggccactgtc tgctccgtca      540
cctattggga aatgtgcccc tcaactccac cttttctcat tggacataga cgttggtctgc      600
acagatttga atgaagatgt ggggtgttgg gtcacttca agatcaaac tcaagacgga      660
cacgctcgtt taggaaactt agagtttctt gaagagaagc ccttggttgg ggaggcactt      720
gccagagtaa agagagctga aaagaagtgg agagataaga gggagaaact tgagtgggag      780
actaacattg tgtacaagga agccaagaa agcgtggatg ctctttcgt gaactctcag      840
tatgataggt tacaagcaga caccaacata gcaatgatac atgcagctga caaaagagtc      900
cattctatct gtgaggctta cttgccagaa cttagtgtga tccccggtgt caacgctgcc      960
atcttcgagg aattggaagg aagaatcttt acggctttca gcctctatga cgctaggaat     1020
gttatcaaga atggtgattt caacaatggc ctctcatggt ggaatgtgaa aggtcatggt     1080
gatgtagagg agcaaaacaa tcaccgtagc gtgctggttg tcccagaatg ggaagccgaa     1140
gtaagccaag aagttagagt ttgccctgga agaggctaca ttctgcgtgt caccgcttac     1200
aaagaaggat atggcgaagg gtgctgact attcatgaga ttgagaacaa tactgacgaa     1260
cttaagtttt caaactcgtt cgaggaggaa gtgtatccta acaacacagt gacttgtaat     1320
gactatacag caacgcaaga ggaatcagag gggacataca ccagtcgtaa tcgtggttat     1380
gatggtgctt atgaaagcaa ttcacccgtt ccagctgact atgccagtgc ctacgaagag     1440
aaggcttaca cggatggcag aagagataac ccatgtgagt ccaacagagg ttatggtgat     1500
tacactctct ttccagctgg ttacgtgact aaagagttag agtactttcc ggagactgat     1560
aaggtttggg ttgaaatcgg agagacagaa gggacattca tagtagattc agttgagctt     1620
cttctcatgg aagaa                                         1635

```

<210> 7

<211> 1635

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Molécula sintética

10

<400> 7

```

ctcgaggctg aatcggatct tgaaaaggca cagaaggcag tcaacgctct cttcaccagc      60

```

# ES 2 532 145 T3

tcaaatcaga ttggccttaa gaccgatgtt actgactatc atatcgacag agtttctaac	120
cttgtcagtg gcctctccga cgagttctgt ctcgacgaaa agaaggaact ctccgagaaa	180
gtgaagcacg cgaaacgcct ctcggatgaa cggaacttgc tgcaagatcc gaacttcaga	240
ggcatcaatc gccagttgga tagaggctgg aggggatcaa cgcacataac cattcaaggt	300
ggggatgatg tgttcaagga aaactacgtg acattgctgg gcaccttcga cgagtgctat	360
cccacgtatc tctatcagaa gattgacgag tccaagctca aagcctacac acgctatcag	420
ctcagaggct acattgagga ctctcaagac ctcgaaatct acttgatcag atacaacgcc	480
aagcacgaga cgggtgaacgt ccctgggact gggtcactgt ggccactgtc ggcacctcgc	540
ccaatcggaa agtgcgctca ccacagccac cacttctccc ttgacataga tgttgggtgt	600
acggacttga atgaggatct ggggtgtgtgg gtgatcttta agatcaagac ccaagatggt	660
catgcgaggc ttggcaacct tgagttcctt gaagagaagc ctttggctcg agaggcactg	720
gctcgcgtga agagggctga gaagaaatgg agggacaaga gggagaaact ggagtgggag	780
accaacatag tgtacaagga ggccaaggag tcagtggacg cactgtttgt caattcccag	840
tatgataggc tccaagcggg cacgaacatc gccatgatcc atgcagcggg caagagggtt	900
cactocataa gggaggccta tcttcgggag ctgtcagtga ttctcggggt caacgcagcc	960
atctttgagg aattggaagg gaggatcttc accgctttct ctctgtacga cgctcggaac	1020
gtcatcaaga atggtgattt caacaatgga ctcagctgct ggaacgtgaa agggcatgtc	1080
gatgttgaag aacagaacaa tcaccgcagc gtgctggtgg ttccggagtg ggaagccgag	1140
gtctcacaag aagtccagag gtgcctcggg aggggttaca tcttgccgggt cacagcctac	1200
aaggaagggt atggcgaagg ctgtgtcacg atccatgaga tcgaaaacaa cacagacgag	1260
ctgaagtttt ccaactgtgt tgaggaggag gtctatccta acaatactgt tacgtgcaac	1320
gactacacag ccaactcaaga ggagtacgag ggcacttaca cctctcgcaa cagaggctac	1380
gacggtgcct acgagtcaaa cagctccgtg ccagcggact acgcctcggc ttacgaagag	1440
aaggcgtaca ccgacggctg gagggataac ccgtgcgaga gcaatagagg ctatggcgac	1500
tacactctc tcccagctgg ctacgtgacc aaggagtgg agtactttcc ggagacagac	1560
aaagtctgga ttgagattgg agagacagaa ggcacgttca tcgtggactc tgttgaactc	1620
ttgctgatgg aggag	1635

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un polipéptido aislado que comprende un segmento de toxina de núcleo seleccionado del grupo que consiste en
- (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de restos 113 a 643 de SEQ ID NO:2;
- 5 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos identidad de secuencia de 90% con la secuencia de aminoácidos de restos 113 a 643 de SEQ ID NO: 2;
- (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de restos 113 a 643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones, o modificaciones de aminoácidos que no afectan adversamente a la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO:2; o uno de sus fragmentos activo como insecticida..
- 2.- El polipéptido aislado según la reivindicación 1, que comprende un segmento de toxina de núcleo seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 (a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de restos 73 a 643 o 1 a 643 de SEQ ID NO:2;
- (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos identidad de secuencia de 90% con la secuencia de aminoácidos de restos 73 a 643 o 1 a 643 de SEQ ID NO:2;
- 15 (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de restos 73 a 643 o 1 a 643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones, o modificaciones de aminoácidos que no afectan adversamente a la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO:2; o uno de sus fragmentos activo como insecticida.
- 3.- El polipéptido según la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:5.
- 4.- Una planta transgénica que comprende el polipéptido según la reivindicación 1.
- 20 5.- Un método para controlar una población de plaga que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad eficaz como pesticida del polipéptido según la reivindicación 1.
- 6.- Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido según la reivindicación 1.
- 7.- El ácido nucleico aislado según la reivindicación 6, en donde dicho ácido nucleico comprende SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
- 25 8.- Una constricción de DNA que comprende la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7, ligada de modo operable a un promotor que no proviene de *Bacillus thuringiensis* y que es capaz de inducir expresión en una planta.
- 9.- Una planta transgénica que comprende la construcción de DNA según la reivindicación 8, incorporada de modo estable en su genoma.
- 30 10.- La planta transgénica según la reivindicación 9, que comprende, además, un polinucleótido que codifica una proteína Cry1F.
- 11.- La planta transgénica según la reivindicación 10, en donde dicha planta es maíz o una planta vegetal.
- 12.- Una célula de planta de maíz que comprende la construcción de DNA según la reivindicación 8, y opcionalmente un polinucleótido que codifica una proteína Cry1F.
- 35 13. Una célula de una planta vegetal que comprende la construcción de DNA según la reivindicación 8, y opcionalmente, un polinucleótido que codifica una proteína Cry1A.
- 14.- Un método para proteger una planta de una plaga que comprende introducir en dicha planta la construcción según la reivindicación 8.
- 15.- El polipéptido según la reivindicación 1, que tiene actividad contra barrenador europeo del maíz.
- 40 16.- El método según la reivindicación 5, en donde dicha población de plaga es una población de barrenador europeo del maíz que es resistente a Cry1F, o dicha población de plaga es una población de palomilla dorso de diamante que es resistente a una Cry1A.
- 17.- Un método de control de un lepidóptero, cuyo método comprende proporcionar un polipéptido según la reivindicación 1 a dicho lepidóptero.

18.- El método según la reivindicación 17, en donde dicho lepidóptero es un barrenador europeo del maíz, y dicho método comprende, además, proporcionar una Cry1F a dicho lepidóptero.

19.- El método según la reivindicación 17, en donde dicho lepidóptero es una palomilla dorso de diamante, y dicho método comprende, además, proporcionar una Cry1Ab y/o una Cry1Ac a dicho lepidóptero.

5 20.- El método según la reivindicación 17, en donde dicho lepidóptero es un barrenador europeo del maíz que es resistente a Cry1F.

21.- El método según la reivindicación 17, en donde dicho lepidóptero es una palomilla dorso de diamante que es resistente a una Cry1A,

22.- Una semilla transgénica de una planta según cualquiera de las reivindicaciones 4, y 9 - 11.

10