

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 581**

51 Int. Cl.:

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: **23.12.2009** **E 09804360 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015** **EP 2379724**

54 Título: **Gen AXMI-150 de la delta-endotoxina y métodos para su uso**

30 Prioridad:

23.12.2008 US 140427 P

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

24.04.2015

73 Titular/es:

ATHENIX CORPORATION (100.0%)
3500 Paramount Parkway
Morrisville, NC 27560, US

72 Inventor/es:

SAMPSON, KIMBERLY S.;
TOMSO, DANIEL J. y
HEINRICH, VOLKER

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 534 581 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

Gen AXMI-150 de la delta-endotoxina y métodos para su uso.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la biología molecular. Se proporcionan nuevos genes que codifican proteínas plaguicidas. Estas proteínas y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican son útiles en la preparación de formulaciones plaguicidas y en la producción de plantas transgénicas resistentes a las plagas.

10

Antecedentes de la invención

Bacillus thuringiensis es una bacteria Gram positiva formadora de esporas que habita en el suelo, caracterizada por su capacidad para producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para ciertos órdenes y especies de insectos, pero inocuas para plantas y otros organismos no considerados dianas. Por esta razón, las composiciones que incluyen cepas de *Bacillus thuringiensis* o sus proteínas insecticidas se pueden usar como insecticidas aceptables para el medio ambiente para controlar las plagas agrícolas de insectos o los insectos vectores para varias enfermedades humanas o animales.

15

20

Los cristales proteínicos (Cry) (delta-endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* tienen una potente actividad insecticida contra las larvas predominantemente de lepidópteros, dípteros y coleópteros. Estas proteínas han mostrado también actividad contra los órdenes de plagas de himenópteros, homópteros, fírirápteros, malófagos y ácaros, así como otros órdenes de invertebrados, tales como nematelmintos, platelmintos y sarcomastigóforos (Feitelson (1993) The *Bacillus Thuringiensis* Family Tree. In *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.) Estas proteínas se clasificaron originalmente como CryI a CryV basándose principalmente en su actividad insecticida. Las clases principales fueron la específica de lepidópteros (I), la específica de lepidópteros y dípteros (II), la específica de coleópteros (III), la específica de dípteros (IV) y la específica de nematodos (V) y (VI). Las proteínas se clasificaron además en subfamilias; a las proteínas más estrechamente relacionadas con cada familia se le asignaron letras consecutivas tales como *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C*, etc. A las proteínas todavía más estrechamente relacionadas dentro de cada grupo se les dieron nombres tales como *Cry1C1*, *Gy1C2*, etc.

25

30

Recientemente se ha descrito una nueva nomenclatura para los genes Cry basada en la homología de las secuencias de aminoácidos en lugar de en la especificidad del insecto diana (Crickmore et al., (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807 - 813). En la nueva clasificación, a cada toxina se le asigna un único nombre que incorpora una categoría principal (un número arábigo), una categoría secundaria (una letra mayúscula), una categoría terciaria (una letra minúscula) y una categoría cuaternaria (otro número arábigo). En la nueva clasificación, en la categoría principal los números romanos han sido sustituidos por números arábigos. Las proteínas con una identidad de secuencia inferior al 45 % tienen diferentes categorías principales y los criterios para las categorías secundaria y terciaria son 78 % y 95 %, respectivamente.

35

40

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

45

Las delta-endotoxinas generalmente tienen cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193 - 199). El primer dominio estructural conservado consta de siete hélices alfa y está implicado en la inserción en la membrana y la formación de poros. El dominio II consiste en tres láminas beta dispuestas en una configuración de llave griega, y el dominio III consiste en dos láminas beta antiparalelas en formación de "remolino" (de Maagd et al., 2001, citado anteriormente). Los dominios II y III están implicados en el reconocimiento y la unión al receptor y, por tanto, se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

50

55

El documento WO 2005/107383 se refiere a proteínas insecticidas secretadas y a composiciones génicas de *Bacillus thuringiensis* y a usos de las mismas.

Debido a la devastación que los insectos pueden conferir y la mejora en el rendimiento al controlar las plagas de insectos, existe una necesidad continua de descubrir nuevas formas de toxinas plaguicidas.

60

Resumen de la invención

Se proporcionan composiciones y métodos para conferir actividad plaguicida a las bacterias, plantas, células vegetales, tejidos y semillas. También se hace referencia a composiciones que incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican secuencias para polipéptidos plaguicidas e insecticidas, vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico y células huésped que comprenden los vectores. Las composiciones incluyen las secuencias de

65

5 polipéptidos plaguicidas. Las secuencias de nucleótidos se pueden utilizar en construcciones de ADN o casetes de expresión para la transformación y expresión en organismos, incluidos microorganismos y plantas. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que se han diseñado para su expresión en un organismo, incluyendo, entre otros, un microorganismo o una planta. También se hace referencia a composiciones que comprenden bacterias transformadas, plantas, células vegetales, tejidos y semillas.

10 En particular, se proporcionan moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una proteína plaguicida. Adicionalmente, están incluidas las secuencias de aminoácidos correspondientes a la proteína plaguicida. En particular, esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 2 o una secuencia de nucleótidos expuesta en las SEC ID N°: 1, 3, 4, 5, 6 o 7. También se hace referencia a las secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de nucleótidos de la invención o que hibridan con una secuencia de la invención.

15 Se proporcionan métodos para producir los polipéptidos de la invención y para usar dichos polipéptidos para controlar o destruir una plaga de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros. También se hace referencia a métodos y kits para detectar los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención en una muestra.

20 Las composiciones y métodos de la invención son útiles para la producción de organismos con mayor resistencia o tolerancia a las plagas. Estos organismos y composiciones que comprenden los organismos son deseables para fines agrícolas. Las composiciones de la invención también son útiles para generar proteínas alteradas o mejoradas que tienen actividad plaguicida, o para detectar la presencia de proteínas o ácidos nucleicos plaguicidas en los productos u organismos.

25 Por consiguiente, esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de ácidos nucleicos que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 30 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1;
 b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
 c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.

35 La invención proporciona además:

- un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención, preferentemente que comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo;
- una célula huésped que contiene el vector de la invención, preferentemente que es:
 - 40 (a) una célula huésped bacteriana; o
 - (b) una célula vegetal;
- una planta transgénica que comprende la célula huésped vegetal de la invención, preferentemente donde dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, col, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla oleaginosa; y
- una semilla transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de la invención.

50 La invención proporciona adicionalmente un polipéptido con actividad plaguicida, seleccionado del grupo que consiste en:

- 55 a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
 c) un polipéptido que está codificado por la SEC ID N°: 1,

preferentemente que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas.

60 La invención proporciona adicionalmente una composición que comprende el polipéptido de la invención, donde:

- 65 (a) dicha composición se selecciona del grupo que consiste en un polvo, polvo fino, bolita, gránulo, aerosol, emulsión, coloide, y solución;
 (b) dicha composición se puede obtener mediante desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración de un cultivo de células bacterianas; o
 (c) dicha composición comprende de 1 % a 99 % en peso de dicho polipéptido.

La invención también proporciona:

- un método para controlar una población de plagas de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad plaguicidamente eficaz de un polipéptido de la invención.
- un método para destruir una población de plagas de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros que comprende poner en contacto dicha plaga con, o alimentar a dicha plaga con, una cantidad plaguicidamente eficaz de un polipéptido de la invención; y
- un método para producir un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende cultivar la célula huésped de la invención en las condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.

La invención proporciona adicionalmente una planta que tiene incorporado establemente en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;

donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante en una célula vegetal, preferentemente donde dicha planta es una célula vegetal.

La invención también proporciona adicionalmente un método para proteger una planta de una plaga, que comprende introducir en dicha planta o célula de la misma al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1;
- b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, preferentemente donde dicha planta produce un polipéptido plaguicida que tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros.

Descripción detallada

Esta invención se refiere a composiciones y métodos para regular la resistencia o tolerancia a las plagas en los organismos, particularmente plantas o células vegetales. Por "resistencia" se pretende decir que la plaga (por ejemplo, insecto) muere tras la ingestión u otro contacto con los polipéptidos de la invención. Por "tolerancia" se pretende decir una alteración o reducción del movimiento, alimentación, reproducción u otras funciones de la plaga. Los métodos implican transformar organismos con una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína plaguicida de la invención. En particular, las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles para la preparación de plantas y microorganismos que poseen actividad plaguicida. Por lo tanto, se proporcionan bacterias, plantas, células vegetales, tejidos vegetales y semillas transformados. Las composiciones son ácidos nucleicos y proteínas plaguicidas de *Bacillus*. Las secuencias encuentran uso en la construcción de vectores de expresión para la posterior transformación en organismos de interés, como sondas para el aislamiento de otros genes homólogos (o parcialmente homólogos) y para la generación de proteínas plaguicidas alteradas mediante métodos conocidos en la técnica, tales como intercambio de dominios o barajado de ADN. Las proteínas encuentran uso en el control o eliminación de poblaciones de plagas de lepidópteros, coleópteros, dípteros y nematodos, y para la producción de composiciones con actividad plaguicida.

Por "toxina plaguicida" o "proteína plaguicida" se pretende decir una toxina que tiene actividad tóxica contra una o más plagas, incluyendo, entre otras, miembros de los órdenes de lepidópteros, dípteros y coleópteros, o del filo de los nematodos, o una proteína que tiene homología con dicha proteína. Las proteínas plaguicidas se han aislado de organismos que incluyen, por ejemplo, *Bacillus sp.*, *Clostridium bifermentans* y *Paenibacillus popilliae*. Las proteínas plaguicidas incluyen secuencias de aminoácidos deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos de longitud completa divulgadas en el presente documento y secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa, ya sea por el uso de un sitio de inicio aguas abajo alternativo, o debido a un procesamiento que produce una proteína más corta que tiene actividad plaguicida. El procesamiento se puede producir en el organismo donde se expresa la proteína, o en la plaga después de la ingestión de la proteína.

Las proteínas plaguicidas abarcan delta-endotoxinas. Las delta-endotoxinas incluyen las proteínas identificadas como *cry1* a *cry43*, *cyt1* y *cyt2*, y la toxina de tipo Cyt. Actualmente hay más de 250 especies conocidas de delta-endotoxinas con una amplia gama de especificidades y toxicidades. Para ver una lista extensa véase Crickmore et al. (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807 - 813, y para ver actualizaciones periódicas véase Crickmore et al. (2003) "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature," en www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.

Por tanto, en el presente documento se proporcionan nuevas secuencias de nucleótidos aisladas que confieren actividad plaguicida. Estas secuencias de nucleótidos aislados codifican polipéptidos con homología con delta-endotoxinas o toxinas binarias conocidas. También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas plaguicidas. La proteína resultante de la traducción de este gen permite que las células controlen o eliminen las plagas que la injerieren.

Moléculas de ácido nucleico aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas o recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y polipéptidos plaguicidas o porciones biológicamente activas de los mismos, así como moléculas de ácido nucleico suficientes para usar como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas con regiones de homología de secuencia. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" está destinada a incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADN recombinante, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferentemente es ADN de cadena doble.

Una secuencia de ácido nucleico (o ADN) "aislada" se usa en el presente documento para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico (o ADN) que ya no está en su ambiente natural, por ejemplo en una célula huésped recombinante bacteriana o vegetal. En algunas realizaciones, un ácido nucleico "aislado" carece de secuencias (preferentemente secuencias que codifican proteínas) que flanquean de forma natural al ácido nucleico (es decir, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico. Para los fines de la invención, "aislado" cuando se utiliza para referirse a moléculas de ácido nucleico excluye cromosomas aislados. Por ejemplo, en varias realizaciones, la delta-endotoxina aislada que codifica la molécula de ácido nucleico puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias nucleotídicas que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que deriva el ácido nucleico. En varias realizaciones, una proteína delta-endotoxina que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 %, o 5 % (en peso seco) de la proteína que no es delta-endotoxina (también denominada en el documento "proteína contaminante").

Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de esta invención incluyen la secuencia expuesta en las SEC ID N°: 1, 3, 4, 5, 6 o 7, variantes y fragmentos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 y que tienen actividad plaguicida, así como complementos de los mismos. Por "complemento" se quiere decir una secuencia de nucleótidos que es suficientemente complementaria con una secuencia de nucleótidos dada de forma que puede hibridar con la secuencia de nucleótidos dada para formar de este modo un dúplex estable. La correspondiente secuencia de aminoácidos para la proteína plaguicida codificada por esta secuencia de nucleótidos se expone en la SEC ID N°: 2 o las secuencias de aminoácidos AXMI-004 descritas en la patente de EE.UU. N° 7.355.099 y la solicitud de patente de EE.UU. n° 12/209.354, presentada el 12 de septiembre de 2008 titulada "Genes sintéticos AXMI-004 de la delta-endotoxina y métodos para su uso", publicada como US 2009/0099081.

Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de estas secuencias de nucleótidos que codifican proteínas plaguicidas también se incluyen en esta invención, donde son al menos un 95 % idénticas a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y tienen actividad plaguicida. Por "fragmento" se quiere decir una porción de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos codifica una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida. Las moléculas de ácido nucleico que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida comprenden al menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.350, 1.400 nucleótidos contiguos o hasta el número de nucleótidos presente e una secuencia de nucleótidos de longitud completa que codifica una proteína plaguicida divulgada en el presente documento en función del uso pretendido. Por nucleótidos "contiguos" se pretende decir residuos de nucleótidos que son inmediatamente adyacentes entre sí. Los fragmentos de las secuencias de nucleótidos de esta invención codificarán fragmentos de proteínas que conservan la actividad biológica de la proteína plaguicida y, por lo tanto, conservan la actividad plaguicida. Por "conserva la actividad" se pretende decir que el fragmento tendrá al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la actividad plaguicida de la proteína plaguicida. En una realización, la actividad plaguicida es actividad coleopterocida. En otra realización, la actividad plaguicida es actividad lepidopterocida. En otra realización, la actividad plaguicida es actividad nematocida. En otra realización, la actividad plaguicida es actividad nematocida. Los métodos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480 - 2485;

Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199 - 206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290 - 293; y la patente de EE.UU. N° 5.743.477.

5 Un fragmento de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida que codifica una porción biológicamente activa de una proteína de la invención codificará al menos aproximadamente 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 aminoácidos contiguos o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína plaguicida de longitud completa de la invención.

10 Proteínas plaguicidas preferidas de esta invención están codificados por una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEC ID N°: 1, 3, 4, 5, 6 o 7. Por "suficientemente idéntica" se quiere decir una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor en comparación con una secuencia de referencia usando uno de los programas de alineamiento descritos en el presente documento utilizando parámetros convencionales. Un experto en la técnica reconocerá que estos valores se pueden ajustar apropiadamente para determinar la identidad
15 correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura, y similares.

20 Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, porcentaje de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra realización, el porcentaje de identidad se calcularon la totalidad de la secuencia de referencia (es decir, la secuencia divulgada en el presente documento como cualquiera de las SEC ID N°: 1, 3, 4, 5, 6 o 7). El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse
25 usando técnicas similares a las descritas a continuación permitiendo o sin permitir huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, se cuentan típicamente emparejamientos exactos.

30 La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede realizarse utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873 - 5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud del texto= 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácido nucleico de tipo plaguicida de la invención. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden
35 realizar con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud del texto= 3, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de las proteínas plaguicidas de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos se puede usar Gapped BLAST (en BLAST 2.0) tal como se describe en Altschul y col. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Como alternativa, se puede usar PSI-BLAST para realizar una búsqueda reiterada que detecte relaciones distantes entre moléculas. Véase Altschul *et al.* (1997) citado anteriormente. Al usar los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-BLAST se pueden usar los parámetros preseleccionados de los respectivos programas (p. ej., BLASTX y BLASTN). La alineación también se puede realizar manualmente mediante inspección.

45 Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673 - 4680). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o de ADN y, por lo tanto, puede proporcionar datos acerca de la conservación de la secuencia de la secuencia de aminoácidos completa. El algoritmo ClustalW se utiliza en varios paquetes de soporte lógico de análisis de ADN/aminoácidos disponibles en el mercado, tales como el módulo ALIGNX del Grupo de programas Vector NTI (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después del alineamiento de las secuencias de aminoácidos con ClustalW, se puede evaluar el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no limitante de un programa de software útil para el análisis de alineamientos ClustalW es GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud y la identidad de aminoácidos (o ADN) entre
50 múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del Paquete de software GCG Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible en Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE.UU.). Al usar el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de residuos de pesos PAM 120, una penalización por la longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

60 A menos que se indique lo contrario, se podrá utilizar GAP Versión 10, que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443 - 453, para determinar la identidad o similitud de secuencia utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos usando un peso del hueco de 50 y un peso de la longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad o % de similitud para una secuencia de aminoácidos usando un peso por hueco de 8 y un peso por longitud de 2, y la matriz de puntuación BLOSUM62. También se pueden utilizar programas equivalentes. Por "programa equivalente" se quiere decir cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión,
65

genera un alineamiento que tiene emparejamientos de residuos de nucleótidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con el alineamiento correspondiente generado por GAP, versión 10. La invención también abarca variantes de moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y actividad plaguicida. "Variantes" de las secuencias de nucleótidos que codifican proteína plaguicida incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en el presente documento, pero que difieren de forma conservadora debido a la degeneración del código genético, así como las que son suficientemente idénticas como se ha tratado anteriormente. Las variantes alélicas naturales se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas como, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación, como se indica más adelante. Las secuencias de nucleótidos variantes también incluyen secuencias de nucleótidos derivados sintéticamente que se han generado, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida a sitio pero que todavía codifican las proteínas plaguicidas divulgadas en esta invención como se trata más adelante. Las proteínas variantes abarcadas por esta invención son biológicamente activas, es decir siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, la actividad plaguicida. Por "conserva la actividad" se pretende decir que la variante tendrá al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 80 % de la actividad plaguicida de la proteína nativa. Los métodos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480 - 2485; Andrews et al. (1988) *Biochem. J.* 252:199 - 206; Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290 - 293; y la patente de EE.UU. N° 5.743.477.

El experto en la técnica apreciará adicionalmente que pueden introducirse cambios por mutación de las secuencias de nucleótidos de la invención que conducen de ese modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas plaguicidas codificadas, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas variantes se pueden crear introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la correspondiente secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento, de tal manera que se introducen una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones mediante técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Tales secuencias de nucleótidos variantes también están abarcadas por esta invención, en las que tiene una identidad de al menos 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y actividad plaguicida.

Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales predichos. Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse desde la secuencia de tipo salvaje de una proteína plaguicida sin alterar la actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" se requiere para la actividad biológica. Una "sustitución de aminoácidos conservadora" es una en la cual se reemplaza el residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las delta-endotoxinas generalmente tienen cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (véase, por ejemplo Maagd et al. (2001) *Trends Genetics* 17:193 - 199). El primer dominio estructural conservado consta de siete hélices alfa y está implicado en la inserción en la membrana y la formación de poros. El dominio II consiste en tres láminas beta dispuestas en una configuración de llave griega, y el dominio III consiste en dos láminas beta antiparalelas en formación de "remolino" (de Maagd *et al.*, 2001, citado anteriormente). Los dominios II y III están implicados en el reconocimiento y la unión al receptor y, por tanto, se consideran determinantes de la especificidad de la toxina.

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en regiones no conservadas que mantienen la función. En general, dichas sustituciones no se harían para residuos de aminoácidos conservados, o para residuos de aminoácidos que residen dentro de un motivo conservado, en donde tales residuos son esenciales para la actividad de la proteína. Ejemplos de residuos que se conservan y que pueden ser esenciales para la actividad de la proteína incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en un alineamiento de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, los residuos que son idénticos en una alineación de proteínas homólogas). Ejemplos de los residuos que se conservan, pero que pueden permitir sustituciones conservadoras de aminoácidos y todavía mantener la actividad incluyen, por ejemplo, residuos que tienen sólo sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en un alineamiento de toxinas similares o relacionadas con las secuencias de la invención (por ejemplo, residuos que solo tienen sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en el alineamiento de proteínas homólogas). Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que las variantes funcionales pueden tener alteraciones mínimas conservadas o no conservadas en los residuos conservados.

Como alternativa, las secuencias de nucleótidos variantes se pueden realizar mediante la introducción de mutaciones al azar a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden someterse a detección selectiva para determinar su capacidad para conferir actividad de plaguicida para identificar mutantes que conservan la actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante y la actividad de la proteína se puede determinar utilizando técnicas de análisis convencionales.

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

En un método de hibridación, toda o parte de la secuencia de nucleótidos de plaguicida se puede utilizar para la detección selectiva genotecas de ADNc o genómicas. Generalmente, en la técnica se conocen métodos para la construcción de tales genotecas de ADNc y genómicas y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente. Las denominadas sondas de hibridación pueden ser fragmentos de ADN genómico, fragmentos de ADNc, fragmentos de ARN, u otros oligonucleótidos, y pueden marcarse con un grupo detectable tal como ^{32}P , o cualquier otro marcador detectable, tales como otros radioisótopos, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Las sondas para hibridación se pueden preparar mediante marcaje con oligonucleótidos sintéticos basados en la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína plaguicida conocida divulgada en el presente documento. Adicionalmente se pueden utilizar cebadores degenerados diseñados sobre la base de los nucleótidos o residuos de aminoácidos conservados en la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos codificada. La sonda comprende típicamente una región de la secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones rigurosas con al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175 o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína plaguicida de la invención o un fragmento o variante de la misma. Generalmente, en la técnica se conocen métodos para la preparación de sondas para la hibridación y se divulgan en Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente.

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

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

Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquéllas en las que la concentración de sales es inferior a aproximadamente 1,5M de ion Na, normalmente una concentración del ion Na (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0M a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para las sondas cortas (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para las sondas largas (p. ej., de más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Condiciones de rigurosidad baja de ejemplo incluyen hibridación con una solución tampón de 30 a 35 % de formamida, NaCl 1M, 1 % de SDS (dodecilsulfato sódico) a 37 °C y un lavado en de 1X a 2X de SSC (20 x SSC= NaCl 3,00M/citrato sódico 0,3M) a una temperatura de 50 a 55 °C. Condiciones de rigurosidad moderada de ejemplo incluyen hibridación en de 40 a 45 % de formamida, NaCl 1M, 1 % de SDS a 37 °C y un lavado en de 0,5X a 1X de SSC a una temperatura de 55 a 60 °C. Condiciones de rigurosidad alta de ejemplo incluyen hibridación en 50 % de formamida, NaCl 1M, 1 % de SDS a 37 °C y un lavado en de 0 X SSC a una temperatura de 60 a 65 °C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de SDS. La duración de la hibridación es, en general, menor de aproximadamente 24 horas, normalmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

Normalmente, la especificidad es función de los lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) Anal. Biochem. 138:267-284: $T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\% \text{ GC}) + 0,61 (\% \text{ forma})$ 500/l; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % forma es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m es la temperatura (a la fuerza iónica y el pH definidos) a la cual el 50 % de una secuencia diana complementaria hibrida con una sonda perfectamente apareada. La T_m se reduce en aproximadamente 1 $^\circ\text{C}$ por cada 1 % de apareamiento erróneo; por tanto, la T_m de hibridación y/o las condiciones de lavado se pueden ajustar para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con una identidad $\geq 90 \%$, la T_m se puede reducir 10 $^\circ\text{C}$. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que sea 5 $^\circ\text{C}$ menor que el punto de fusión térmica T_m para la secuencia específica y su complementaria a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones intensamente rigurosas pueden usar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3, o 4 $^\circ\text{C}$ menos que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9, o 10 $^\circ\text{C}$ menos que el punto de fusión térmica (T_m); las condiciones poco rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15, o 20 $^\circ\text{C}$ menos que el punto de fusión térmica (T_m). Utilizando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la T_m deseada, los expertos entenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen inherentemente. Si el grado deseado de resultados de apareamientos incorrectos en una T_m inferior a 45 $^\circ\text{C}$ (solución acosa) o 32 $^\circ\text{C}$ (solución de formamida), se prefiere incrementar la concentración de SSC de modo que se pueda usar una temperatura superior. Se puede encontrar una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, New York); y Ausubel et al., eds. (1995) Current Protocols in Molecular Biology, Capítulo 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). Véase Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Proteínas aisladas y variantes y fragmentos de las mismas

Las proteínas plaguicidas también están abarcadas por esta invención. Mediante "proteína plaguicida" se quiere decir una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NO: 2. También se proporcionan fragmentos, porciones biológicamente activas, y variantes de los mismos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y actividad plaguicida y se pueden usar para poner en práctica los métodos de esta invención. Una "proteína aislada" se usa hacer referencia a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo in vitro o en una célula huésped vegetal o bacteriana recombinante.

"Fragmentos" o "porciones biológicamente activas" incluyen fragmentos de polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: y que presentan actividad plaguicida. Una porción biológicamente activa de una proteína plaguicida puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 250 o más aminoácidos de longitud. Tales porciones biológicamente activas se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y evaluar su actividad plaguicida. Los métodos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480 - 2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199 - 206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290 - 293; y la patente de EE.UU. N° 5.743.477. Según se utiliza en la presente memoria, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2. La invención abarca otros fragmentos, no obstante, tal como cualquier fragmento en la proteína superior a aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250 o 300 aminoácidos.

Por "variantes" se quiere decir proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2. Las variantes también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que hibrida con la molécula de ácido nucleico de las SEC ID N°: 1, 3, 4, 5, 6 o 7, o una complementaria de la misma, en condiciones rigurosas. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Véanse, por ejemplo, las variantes divulgadas en la sección de Ejemplos Experimentales en el presente documento. Las proteínas variantes abarcadas por esta invención son biológicamente activas, es decir siguen poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, retienen la actividad plaguicida. En algunas realizaciones, las variantes tienen una actividad mejorada con respecto a la proteína nativa. Los métodos para medir la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Czaplá y Lang (1990) J. Econ. Entomol. 83:2480 - 2485; Andrews et al. (1988) Biochem. J. 252:199 - 206; Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290 - 293; y la patente de EE.UU. N° 5.743.477.

Los genes bacterianos, tales como los genes *axmi* de esta invención, muy a menudo poseen múltiples codones de iniciación de metionina en la proximidad del inicio del marco de lectura abierto. A menudo, el inicio de la traducción en uno o más de estos codones de iniciación conducirá a la generación de una proteína funcional. Estos codones de iniciación pueden incluir codones ATG. Sin embargo, bacterias tales como *Bacillus sp.* también reconocen el codón GTG como un codón de iniciación, y las proteínas que inician la traducción en los codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. Rara vez, la traducción en los sistemas bacterianos puede iniciarse en un codón

TTG, aunque en este caso el TTG codifica una metionina. Además, no muy a menudo se determina *a priori* cuál de estos codones se utiliza de forma natural en la bacteria. Por lo tanto, se entiende que el uso de uno de los codones de metionina alternativos también puede conducir a la generación de proteínas plaguicidas. Estas proteínas plaguicidas están abarcadas por esta invención y pueden usarse en los métodos de esta invención. Se entenderá que cuando se expresa en plantas, será necesario alterar el codón de iniciación alternativo a ATG para una traducción adecuada.

Los anticuerpos frente a los polipéptidos de esta invención o frente a variantes o fragmentos de los mismos se denominan: Los métodos para producir anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; patente de EE.UU. N° 4.196.265).

Variantes alteradas o mejoradas

Se reconoce que las secuencias de ADN de una proteína plaguicida pueden alterarse mediante diversos métodos, y que estas alteraciones pueden dar como resultado secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes que las codificadas por una proteína plaguicida de esta invención. Esta proteína se puede alterar de varias maneras, incluyendo sustituciones, deleciones, truncamientos e inserciones de aminoácidos de uno o más aminoácidos de la SEC ID N°: 2, incluyendo hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145, aproximadamente 150, aproximadamente 155, o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos, en las que la proteína alterada tiene una identidad de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y actividad plaguicida. En general, en la técnica se conocen métodos para dichas manipulaciones. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos de una proteína plaguicida mediante mutaciones en el ADN. Esto también se puede lograr por una de las varias formas de mutagénesis y/o de evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectarán sustancialmente a la función de la proteína. Tales variantes poseerán la actividad plaguicida deseada. Sin embargo, se entiende que la capacidad de una proteína plaguicida para conferir actividad plaguicida puede mejorarse mediante el uso de tales técnicas sobre las composiciones de esta invención. Por ejemplo, se puede expresar una proteína plaguicida en células huésped que exhiben altas tasas de incorporación errónea de bases durante la replicación del ADN, tales como XL-1 Red (Stratagene, La Jolla, CA). Después de la propagación en tales cepas, se puede aislar el ADN (por ejemplo mediante la preparación de ADN plasmídico o mediante amplificación mediante PCR y clonación del fragmento de PCR resultante en un vector), cultivar las mutaciones de la proteína plaguicida en una cepa no mutagénica e identificar los genes mutados con actividad plaguicida, por ejemplo mediante la realización de un ensayo para determinar la actividad plaguicida. Generalmente, la proteína se mezcla y se usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone et al. (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290 - 293. Dichos ensayos pueden incluir poner en contacto las plantas con una o más plagas y determinar la capacidad de la planta para sobrevivir y/o causar la muerte de las plagas. Ejemplos de mutaciones que dan como resultado un aumento de la toxicidad se encuentran en Schnepf et al. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775 - 806.

Como alternativa se pueden llevar a cabo alteraciones en la secuencia proteica de muchas proteínas en el extremo amino o carboxi, sin que ello afecte sustancialmente a la actividad. Esto puede incluir inserciones, deleciones o alteraciones introducidas mediante métodos moleculares modernos, tales como PCR, incluyendo amplificaciones por PCR que alteran o prolongan la secuencia de codificación de la proteína en virtud de la inclusión de secuencias de codificación de aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación por PCR. Como alternativa, las secuencias proteicas añadidas pueden incluir secuencias de codificación de proteínas completas, tales como las utilizadas habitualmente en la técnica para generar proteínas de fusión. Tales proteínas de fusión se utilizan a menudo para (1) incrementar la expresión de una proteína de interés (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o epítipo para facilitar la purificación de la proteína, la detección de la proteína u otros usos experimentales conocidos en la técnica (3) dirigir la secreción o la traducción de una proteína a un orgánulo subcelular, tal como el espacio periplásmico de una bacteria Gram negativa, o el retículo endoplasmático de células eucariotas, el último de los cuales a menudo tiene como resultado la glicosilación de la proteína.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos variantes de esta invención también incluyen secuencias derivadas de métodos mutagénicos y recombinogénicos, tales como el barajado de ADN. Con dicho método, se pueden usar una o más regiones de codificación de proteína plaguicida diferentes para crear una nueva proteína plaguicida que posea las propiedades deseadas. De este modo, las bibliotecas de polinucleótidos recombinantes se generan a partir de una población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprenden regiones de secuencia que tiene una identidad de secuencia sustancial y pueden recombinarse de forma homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, usando este enfoque, los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés pueden barajarse entre

un gen plaguicida de la invención y otros genes plaguicidas conocidos para obtener un nuevo gen que codifica una proteína con una propiedad de interés mejorada, Tal como una actividad insecticida aumentada. En la técnica se conocen estrategias para dicho barajado de ADN. Véase, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747 - 10751; Stemmer (1994) Nature 370:389 - 391; Crameri et al. (1997) Nature Biotech. 15:436 - 438; Moore et al. (1997) J. Mol. Biol. 272:336 - 347; Zhang et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504 - 4509; Crameri et al. (1998) Nature 391:288 - 291; y las patentes de EE.UU. Nº: 5.605.793 y 5.837.458.

El intercambio o barajado de dominios es otro mecanismo para generar proteínas plaguicidas alteradas. Los dominios se pueden intercambiar entre las proteínas plaguicidas, dando como resultado toxinas híbridas o quimérica con una actividad plaguicida o espectro diana mejorados. Los métodos para generar proteínas recombinantes y someterlas a ensayo para determinar la actividad plaguicida son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Naimov et al., (2001) Appl. Environ. Microbiol. 67:5328 - 5330; de Maagd et al. (1996) Appl. Environ. Microbiol. 62:1537 - 1543; Ge et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:17954 - 17958; Schnepf et al. (1990) J. Biol. Chem. 265:20923 - 20930; Rang et al. 91999) Appl. Environ. Microbiol. 65:2918 - 2925).

Vectores

Se puede proporcionar una secuencia plaguicida de la invención en un casete de expresión para su expresión en una planta de interés. Por "casete de expresión vegetal" se quiere decir una construcción de ADN que es capaz de dar como resultado la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula vegetal. Normalmente, estas contienen un promotor y una secuencia de codificación. A menudo, tales construcciones también contendrán una región no traducida en 3'. Tales construcciones pueden contener una "secuencia señal" o una "secuencia líder" para facilitar el transporte cotraduccional o postraduccional del péptido a ciertas estructuras intracelulares, tales como el cloroplasto (u otro plástido), el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi.

Mediante "secuencia señal" se quiere decir una secuencia que se sabe o se sospecha que da como resultado el transporte cotraduccional o postraduccional de péptidos a través de la membrana celular. En eucariotas, esto implica típicamente la secreción en el aparato de Golgi, con alguna glicosilación resultante. Las toxinas insecticidas de las bacterias a menudo se sintetizan como protoxinas, que se activan protólicamente en el intestino de la plaga diana (Chang (1987) Methods Enzymol. 153:507 - 516). En algunas realizaciones de esta invención, la secuencia señal se localiza en la secuencia nativa o puede derivar de una secuencia de la invención. Por "secuencia líder" se quiere decir cualquier secuencia que, cuando se traduce, da como resultado una secuencia de aminoácidos suficiente para desencadenar el transporte cotraduccional de la cadena peptídica a un orgánulo subcelular. Por lo tanto, esto incluye secuencias líder que dirigen el transporte y/o la glicosilación mediante el paso al retículo endoplasmático, el paso a las vacuolas, los plástidos, incluyendo cloroplastos, las mitocondrias y similares.

Por "vector de transformación vegetal" se quiere decir una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficiente de una célula vegetal. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión vegetales y se puede organizar en más de una molécula de ADN "vector". Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de vegetales que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas funciones que actúan en cis y trans necesarias para la transformación de células vegetales (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446 - 451). "Vector" hace referencia a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes células huésped. "Vector de expresión" hace referencia a un vector que tiene la capacidad para incorporar, integrar y expresar secuencias o fragmentos de ADN heterólogos en una célula extraña. El casete incluirá secuencias reguladoras en 5' y 3' unidas operativamente a una secuencia de la invención. Mediante "unido operativamente" se quiere decir un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotor inicia y participa en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. Generalmente, unido operativamente significa que las secuencias de ácido nucleico que están unidas son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones de codificación de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. Adicionalmente, el casete puede contener al menos un gen adicional para contraformarse en el organismo. Como alternativa, el(los) gene(s) adicional(es) se pueden proporcionar sobre muchos casetes de expresión.

"Promotor" hace referencia a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia de codificación aguas abajo. El promotor junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y de la traducción (también denominadas "secuencias de control") es necesario para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

Dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para que la inserción de la secuencia plaguicida esté bajo la regulación transcripcional de las regiones reguladoras.

El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de la transcripción, una región de inicio de la transcripción y la traducción (es decir, un promotor), una secuencia de ADN de la invención y una región de terminación de la transcripción y de la traducción (es decir, una región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo o análogo, o extraño o heterólogo, con respecto al huésped vegetal y/o con respecto a la secuencia de ADN de la invención. Adicionalmente, el promotor puede ser la secuencia natural o, como alternativa, una secuencia

sintética. Cuando el promotor es "nativo" u "homólogo" con respecto al huésped vegetal, se entiende que el promotor se encuentra en la planta nativa donde se introduce el promotor. Cuando el promotor es "extraño" o "heterólogo" con respecto a la secuencia de ADN de la invención, se pretende que el promotor no sea el promotor nativo o de origen natural de la secuencia de ADN unida operativamente de la invención.

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

15 Cuando sea adecuado, el o los genes se pueden optimizar para incrementar la expresión en la célula huésped transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse utilizando los codones preferidos por la célula huésped para mejorar la expresión, o pueden sintetizarse utilizando los codones a una frecuencia de uso de codones preferida por el huésped. Generalmente, el contenido de GC del gen se incrementará. Véase, por ejemplo, Campbell y Gowri (1990) Plant Physiol. 92:1-11, una discusión del uso de codones preferidos del huésped. Se dispone de métodos en
20 la técnica para sintetizar los genes preferidos de la planta. Véase, *por ejemplo*, las patentes de EE.UU. nº 5.380.831 y 5.436.391, y Murray y col. (1989) Nucleic Acids Res. 17:477-498.

En una realización, la proteína plaguicida es dirigida al cloroplasto para su expresión. De esta manera, cuando la proteína plaguicida no se inserta directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá adicionalmente un
25 ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito para dirigir la proteína plaguicida a los cloroplastos. Tales péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Von Heijne et al., (1991) Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126; Clark et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:17544-17550; Della-Cioppa et al. (1987) Plant Physiol. 84:965-968; Romer et al. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:1414-1421; y Shah et al. (1986) Science 233:478-481.

30 El gen plaguicida que se va a dirigir al cloroplasto puede optimizarse para la expresión en el cloroplasto para representar las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este orgánulo. De esta manera, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse utilizando los codones preferidos por los cloroplastos. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.380.831.

35 Transformación de plantas

Los métodos de la invención implican la introducción de una construcción de nucleótidos en una planta. Con "introducir" se pretende presentar a la planta la construcción de nucleótidos de un modo tal que la construcción obtenga acceso al interior de una célula de la planta. Los métodos de la invención no requieren el uso de un método
40 concreto para introducir una construcción nucleotídica en una planta, solo que la construcción nucleotídica obtenga acceso al interior de al menos una célula de la planta. En la técnica se conocen métodos para introducir construcciones nucleotídicas en las plantas, incluidos, entre otros, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus.

45 Por "planta" se quiere decir plantas enteras, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos, embriones y progenie de la misma. Las células vegetales pueden ser diferenciadas o no diferenciadas (por ejemplo, callo, células de cultivo en suspensión, protoplastos, células de hojas, células de raíz, células de floema, polen).

50 Las "plantas transgénicas" o las "plantas transformadas" o las plantas o células o tejidos "transformados de forma estable" hacen referencia a plantas que han incorporado o han integrado secuencias de ácido nucleico o fragmentos de ADN exógenos en la célula vegetal. Estas secuencias de ácidos nucleicos incluyen las que son exógenas, o no están presentes en la célula vegetal no transformada, así como aquellas que pueden ser endógenas, o están presentes en la célula vegetal no transformada. "Heterólogo" generalmente hace referencia a las secuencias de
55 ácido nucleico que no son endógenas a la célula o parte del genoma nativo en el cual están presentes y se han añadido a la célula mediante infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

La transformación de células vegetales se puede lograr mediante una de varias técnicas conocidas en la técnica. El gen plaguicida de la invención puede modificarse para obtener o mejorar la expresión en células vegetales.
60 Normalmente, una construcción que expresa dicha proteína contendría un promotor para dirigir la transcripción del gen, así como una región no traducida en 3' para permitir la terminación de la transcripción y la poliadenilación. La organización de tales construcciones es bien conocida en la técnica. En algunos casos, puede ser útil diseñar el gen de modo que el péptido resultante sea secretado, o de otro modo dirigido, al interior de la célula vegetal. Por ejemplo, el gen puede diseñarse para que contenga un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido al
65 retículo endoplasmático. También puede ser preferible diseñar el casete de expresión vegetal para que contenga un intrón, de manera que se requiera para la expresión el procesamiento del ARNm del intrón.

Típicamente este "casete de expresión vegetal" se insertará en un "vector de transformación vegetal". Este vector de transformación vegetal puede estar compuesto por uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación de la planta. Por ejemplo, es una práctica común en la técnica utilizar vectores de transformación vegetal que se componen de más de un segmento de ADN contiguo. Estos vectores a menudo se denominan en la técnica "vectores binarios". Los vectores binarios así como los vectores con plásmidos colaboradores son los más utilizados para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesarios para lograr una transformación eficaz son bastante grandes, y son ventajosos para separar las funciones en moléculas de ADN separadas. Los vectores binarios contienen típicamente un vector plasmídico que contiene las secuencias que actúan en cis requeridas para la transferencia de ADN-T (tal como el borde izquierdo y el borde derecho), un marcador seleccionable que está diseñado para que pueda expresarse en una célula vegetal, y un gen "de interés" (un gen diseñado para que pueda expresarse en una célula vegetal para la cual se desea la generación de plantas transgénicas). También están presentes en este vector plasmídico las secuencias requeridas para la replicación bacteriana. Las secuencias que actúan en cis se disponen de manera que permitan la transferencia eficiente en células vegetales y su expresión en ellas. Por ejemplo, el gen marcador seleccionable y el gen plaguicida se encuentran entre los bordes izquierdo y derecho. A menudo un segundo vector plasmídico contiene los factores que actúan en trans que participan en la transferencia de ADN-T a partir de *Agrobacterium* a las células vegetales. Este plásmido contiene a menudo las funciones de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de las células vegetales por *Agrobacterium* y la transferencia de ADN mediante escisión en las secuencias del borde y la transferencia de ADN mediada por vir, como se entiende en la técnica (Hellens y Mullineaux (2000) Trends in Plant Science 5:446-451). Se pueden utilizar varios tipos de cepas de *Agrobacterium* (por ejemplo, LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) para la transformación vegetal. El segundo vector plasmídico no es necesario para la transformación de las plantas mediante otros métodos tales como microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, los métodos de transformación vegetal implican la transferencia de ADN heterólogo a células vegetales diana (por ejemplo, embriones inmaduros o maduros, cultivos en suspensión, callos no diferenciados, protoplastos, etc.), seguido de la aplicación de un nivel umbral máximo de selección apropiada (dependiendo del gen marcador seleccionable) para recuperar las células vegetales transformadas a partir de un grupo de masa de células no transformadas. Los explantes normalmente se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Posteriormente, las células transformadas se diferencian en brotes después de colocar en medio de regeneración suplementado con un nivel umbral máximo del agente de selección. Después, los brotes se transfieren a un medio selectivo de enraizamiento para recuperar los brotes o plántulas enraizados. La plántula transgénica crece a continuación en una planta madura y produce semillas fértiles (por ejemplo, Hiei et al., (1994) The Plant Journal 6:271-282; Ishida et al. (1996) Nature Biotechnology 14:745-750). Los explantes normalmente se transfieren a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Una descripción general de las técnicas y métodos para generar plantas transgénicas se encuentra en Ayres y Park (1994) Critical Reviews in Plant Science 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) Maydica 42:107-120. Puesto que el material transformado contiene muchas células; hay presentes células tanto transformadas como no transformadas en cualquier porción de callo o tejido o grupo de células diana sometidos. La capacidad para destruir células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen da como resultado cultivos de plantas transformadas. A menudo, la capacidad de eliminar las células no transformadas es una limitación para la recuperación rápida de las células vegetales transformadas y la generación satisfactoria de plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación, además de los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos en plantas, pueden variar en función del tipo de planta o célula vegetal, es decir monocotiledóneas o dicotiledóneas, dirigido para la transformación. La generación de plantas transgénicas se puede realizar mediante uno de varios métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, microinyección, electroporación, transferencia directa de genes, introducción de ADN heterólogo mediante *Agrobacterium* en células vegetales (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de células vegetales con ADN extraño heterólogo adherido a partículas, aceleración balística de partículas, transformación por haces de aerosol (solicitud publicada de EE.UU. Nº 20010026941; patente de EE.UU. Nº 4.945.050; publicación internacional Nº WO 91/00915; solicitud publicada de EE.UU. Nº 2002015066), transformación con Lec1 y otros diversos métodos para transferencia de ADN no mediados por partículas dirigidas.

Los métodos para la transformación de cloroplastos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Svab et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8526-8530; Svab Y Maliga (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:913-917; Svab Y Maliga (1993) EMBO J. 12:601-606. El método se basa en la liberación con pistola de partículas de ADN que contiene un marcador seleccionable y redireccionamiento del ADN al genoma del plástido mediante recombinación homóloga. Adicionalmente, la transformación de plástidos se puede lograr mediante transactivación de un transgén silente transportado por plástidos mediante la expresión preferida en el tejido de una ARN polimerasa codificada en el núcleo y dirigida al plástido. Tal sistema se ha notificado en McBride et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305.

Tras la integración de ADN heterólogo extraño en células vegetales, se aplica un nivel umbral máximo de selección apropiada en el medio para destruir las células no transformadas y separar y hacer proliferar las células supuestamente transformadas que sobreviven en este tratamiento de selección mediante transferencia periódica a un medio fresco. Mediante el paso continuo y exposición a la selección apropiada, se identifican y se hacen proliferar

las células que son transformadas con el vector plasmídico. Se pueden usar métodos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo integrado de interés en el genoma de la planta transgénica.

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

15 Evaluación de la transformación en plantas

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

20 El análisis de PCR es un método rápido para la detección selectiva de células, tejido o brotes transformados de la presencia de un gen incorporado en la etapa temprana anterior al transplante en el suelo (Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). La PCR se lleva a cabo utilizando cebadores oligonucleótidos específicos del gen de interés o un fondo de vectores de *Agrobacterium*, etc.

25 La transformación vegetal se puede confirmar mediante análisis de transferencia de tipo Southern de ADN genómico (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente). En general, el ADN total se extrae a partir del transformante, se digiere con enzimas de restricción apropiadas, se fracciona en un gel de agarosa y se transfiere a una membrana de nitrocelulosa o nailon. La membrana o "transferencia" se sondea, por ejemplo, con un fragmento de ADN diana radiomarcado con ³²P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta de acuerdo con técnicas convencionales (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente).

30 En el análisis de transferencia de tipo Northern, el ARN se aísla de los tejidos específicos del transformante, se fracciona en un gel de agarosa con formaldehído y se transfiere a un filtro de nailon de acuerdo con métodos convencionales que se utilizan habitualmente en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente). La expresión del ARN codificado por el gen plaguicida se analiza a continuación mediante hibridación del filtro con una sonda radioactiva derivada de un gen plaguicida, mediante métodos conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente).

40 La transferencia de tipo Western, los análisis bioquímicos y similares se pueden llevar a cabo en las plantas transgénicas para confirmar la presencia de la proteína codificada por el gen plaguicida mediante métodos convencionales (Sambrook y Russell, 2001, citado anteriormente) utilizando anticuerpos que se unen a uno o más epítomos presentes en la proteína plaguicida.

45 Actividad plaguicida en las plantas

En otro aspecto de la invención, se pueden generar plantas transgénicas que expresan una proteína plaguicida que tiene actividad plaguicida. Se pueden utilizar los métodos descritos anteriormente a modo de ejemplo para generar plantas transgénicas, pero la manera donde se generan las células vegetales transgénicas no es crucial para esta invención. Los métodos conocidos o descritos en la técnica, tales como la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación biolística y los métodos no mediados por partículas se pueden usar a discreción del experimentador. Las plantas que expresan una proteína plaguicida se pueden aislar mediante métodos habituales descritos en la técnica, por ejemplo mediante transformación del callo, selección de callo transformado y regeneración de las plantas fértiles a partir de tal callo transgénico. En tal proceso se puede utilizar cualquier gen como marcador seleccionable siempre que su expresión en células vegetales confiera capacidad para identificar o seleccionar las células transformadas.

50 Se han desarrollado diversos marcadores para su uso con células vegetales, tales como resistencia a cloranfenicol, al aminoglucósido G418, a higromicina, o similares. También se pueden usar como marcadores seleccionables otros genes que codifican un producto implicado en el metabolismo del cloroplasto. Por ejemplo, pueden encontrar un uso particular los genes que proporcionan resistencia a herbicidas vegetales tales como glifosato, bromoxinilo o imidazolinona. Tales genes se han notificado (Stalker et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (gen de nitrilasa con resistencia a bromoxinilo); y Sathasivan et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (gen de AHAS con resistencia a imidazolinona). Adicionalmente, los genes divulgados en el presente documento son útiles como marcadores para evaluar la transformación de células bacterianas o vegetales. Los métodos para detectar la presencia de un transgén en una planta, órgano de la planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células vegetales, propágulos,

embriones o progenie de la misma son bien conocidos en la técnica. En una realización, la presencia del transgén se detecta analizando la actividad plaguicida.

5 Las plantas fértiles que expresan una proteína plaguicida se pueden analizar para determinar la actividad plaguicida, y seleccionar las plantas que presentan una actividad óptima para la reproducción ulterior. En la técnica se dispone de métodos para analizar la actividad de las plagas. Generalmente, la proteína se mezcla y se usa en ensayos de alimentación. Véase, por ejemplo, Marrone et al. (1985) J. of Economic Entomology 78:290-293.

10 Esta invención se puede usar para transformación de cualquier especie de planta, incluidas, entre otras, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Ejemplos de plantas de interés incluyen, entre otros, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla oleaginosa, especies de *Brassica*, alfalfa, centeno, mijo, cártamo, cacahuetes, batata, yuca, café, coco, piña, cítricos, cacao, té, plátano, aguacate, higo, guayaba, mango, aceituna, papaya, anacardo, macadamia, almendra, avena, hortalizas, plantas ornamentales y coníferas.

15 Las hortalizas incluyen, entre otras, tomates, lechuga, judías verdes, frijol lima, guisantes, y miembros del género *Curcumis* tales como pepino, melón cantalupo y melón. Las plantas ornamentales incluyen, entre otras, azalea, hortensia, hibiscos, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, flor de pascua, y crisantemo. Preferentemente, las plantas de esta invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza de semilla oleaginosa, etc.).

Uso en el control de plagas

25 Los métodos generales para emplear las cepas que comprenden una secuencia de nucleótidos de esta invención, o una variante de la misma, en el control de plagas o en el diseño de otros organismos como agentes plaguicidas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo la patente de EE.UU. Nº 5.039.523 y el documento EP 0480762A2.

30 Las cepas de *Bacillus* que contienen una secuencia de nucleótidos de esta invención, o una variante de la misma, o los microorganismos que se han alterado genéticamente para contener un gen plaguicida y la proteína pueden usarse para proteger de las plagas cultivos y productos agrícolas. En un aspecto de la invención, las células enteras, es decir, no lisadas, de un organismo productor de toxina (plaguicida) se tratan con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al entorno de la plaga o las plagas diana.

35 Como alternativa, el plaguicida se produce introduciendo un gen plaguicida en un huésped celular. La expresión del gen plaguicida da como resultado, directa o indirectamente, la producción intracelular y el mantenimiento del plaguicida. En un aspecto de esta invención, estas células se tratan después en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al entorno de la plaga o las plagas diana. El producto resultante conserva la toxicidad de la toxina. Estos plaguicida encapsulados de forma natural se pueden formular de acuerdo con técnicas convencionales para la aplicación en el entorno que aloja una plaga diana, por ejemplo, suelo, agua y follaje de las plantas. Véase, por ejemplo, el documento EPA 0192319, y las referencias citadas en el mismo. Como alternativa, se pueden formular las células que expresan un gen de esta invención de manera que se permita la aplicación del material resultante como un plaguicida.

45 Normalmente, los ingredientes activos de la presente invención se aplican en forma de composiciones y se pueden aplicar al área o planta de cultivo que se va a tratar, simultáneamente o en sucesión, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, herbicidas, crioprotectores, agentes tensioactivos, detergentes, jabones plaguicidas, aceites latentes, polímeros, y/o formulaciones portadoras de liberación controlada o biodegradables que permiten una dosificación a largo plazo de una zona diana tras una única aplicación de la formulación. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas químicas, virucidas, microbicidas, amebicidas, plaguicidas, fungicidas, bactericidas, nematocidas, molusquicidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con vehículos adicionales agrícolamente aceptables, tensioactivos, o aplicación de adyuvantes estimulantes de uso habitual en la técnica de la formulación. Vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponder a las sustancias habitualmente empleadas en la tecnología de la formulación, por ejemplo sustancias minerales naturales o regeneradas, disolventes, dispersantes, agentes de humectación, agentes de adherencia, espesantes, aglutinantes o fertilizantes. Asimismo, las formulaciones se pueden preparar como "cebos" comestibles o en forma de "trampas" para plagas para permitir la alimentación o la ingestión por una plaga diana de la formulación plaguicida.

60 Métodos de aplicar un ingrediente activo de esta invención o una composición agroquímica de esta invención que contiene al menos una de las proteínas plaguicidas producidas por las cepas bacterianas de esta invención incluyen aplicación foliar, recubrimiento de semillas y aplicación en el terreno. El número de aplicaciones y la frecuencia de aplicación dependen de la intensidad de la infestación por la correspondiente plaga.

65 La composición se puede formular como un polvo, DUST, bolita, gránulo, aerosol, emulsión, coloide, solución, o similares, y se puede preparar por medios convencionales tales como desecación, liofilización, homogeneización,

extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración de un cultivo de células que comprenden el polipéptido. En todas estas composiciones que contienen al menos uno de tales polipéptidos plaguicidas, el polipéptido puede estar presente en una concentración de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso.

- 5 Mediante los métodos de la invención se pueden eliminar o reducir plagas de lepidópteros, dípteros o coleópteros, en una zona determinada, o se pueden aplicar profilácticamente a una zona medioambiental para prevenir la infestación por una plaga susceptible. Preferentemente, la plaga ingiere o se pone en contacto con, una cantidad eficaz como plaguicida del polipéptido. Mediante "cantidad eficaz como plaguicida" se quiere decir una cantidad del plaguicida que es capaz de provocar la muerte de al menos una plaga, o de reducir notablemente el crecimiento, la alimentación o desarrollo fisiológico normal de la plaga. Esta cantidad variará dependiendo de factores tales como, 10 por ejemplo, las plagas diana específicas a controlar, el entorno específico, la localización, la planta, el cultivo, o la localización agrícola a tratar, las condiciones ambientales, y el método, la tasa, la concentración, la estabilidad, y la cantidad de aplicación de la composición de polipéptido eficaz como plaguicida. Las formulaciones también pueden variar con respecto a las condiciones climáticas, las consideraciones ambientales, y/o la frecuencia de aplicación y/o 15 la gravedad de la infestación de la plaga.

Las composiciones plaguicidas descritas se pueden preparar formulando la célula bacteriana, el cristal y/o la suspensión de esporas, o el componente proteico aislado con el vehículo agrícolamente aceptable deseado. Las composiciones se pueden formular antes de la administración en un medio apropiado tal como liofilizar, secar por 20 congelación, desecar, o en un vehículo, medio o diluyente acuosos adecuado, tal como solución salina u otro tampón. Las composiciones formuladas pueden estar en forma de un material espolvoreable o granular, o una suspensión en aceite (vegetal o mineral), o agua o emulsiones de aceite/agua, o en forma de un polvo humectable o en combinación con cualquier otro material vehículo adecuado para la aplicación agrícola. Los vehículos agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son bien conocidos en la técnica. El término "vehículo agrícolamente aceptable" cubre todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, tensioactivos, agentes taquificantes, aglutinantes, etc., que se usan normalmente en la tecnología de formulación de plaguicidas, los cuales son bien conocidos por los expertos en la formulación de plaguicidas. Las formulaciones se pueden mezclar con uno o más adyuvantes sólidos o líquidos y prepararse por diversos medios, por ejemplo, mezclando, combinando y/o moliendo homogéneamente la composición plaguicida con adyuvantes adecuados usando técnicas de formulación 30 convencionales. Las formulaciones y métodos de aplicación adecuados se describen en la patente de EE.UU. N° 6.468.523.

"Plaga" incluye, entre otros, insectos, hongos, bacterias, nematodos, ácaros, garrapatas, y similares. Las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados de los órdenes coleópteros, dípteros, himenópteros, lepidópteros, 35 malófagos, homópteros, hemípteros, ortópteros, tisanópteros, dermápteros, isópteros, anopluros, sifonápteros, tricópteros etc., particularmente coleópteros, lepidópteros y dípteros.

El orden *Coleoptera* incluye los subórdenes *Adephaga* y *Polyphaga*. El suborden *Adephaga* incluye las superfamilias *Caraboidea* y *Gyrinoidea*, mientras que el suborden *Polyphaga* incluye las superfamilias *Hydrophiloidea*, 40 *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea* y *Curculionoidea*. La superfamilia *Caraboidea* incluye las familias *Cicindelidae*, *Carabidae* y *Dytiscidae*. La superfamilia *Gyrinoidea* incluye la familia *Gyrinidae*. La superfamilia *Hydrophiloidea* incluye la familia *Hydrophilidae*. La superfamilia *Staphylinoidea* incluye las familias *Silphidae* y *Staphylinidae*. La superfamilia *Cantharoidea* incluye las familias *Cantharidae* y 45 *Lampyridae*. La superfamilia *Cleroidea* incluye las familias *Cleridae* y *Dermestidae*. La superfamilia *Elateroidea* incluye las familias *Elateridae* y *Buprestidae*. La superfamilia *Cucujoidea* incluye la familia *Coccinellidae*. La superfamilia *Meloidea* incluye la familia *Meloidae*. La superfamilia *Tenebrionoidea* incluye la familia *Tenebrionidae*. La superfamilia *Scarabaeoidea* incluye las familias *Passalidae* y *Scarabaeidae*. La superfamilia *Cerambycoidea* incluye la familia *Cerambycidae*. La superfamilia *Chrysomeloidea* incluye la familia *Chrysomelidae*. La superfamilia 50 *Curculionoidea* incluye las familias *Curculionidae* y *Scolytidae*.

El orden *Diptera* incluye los subórdenes *Nematocera*, *Brachycera* y *Cyclorrhapha*. El suborden *Nematocera* incluye las familias *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae* y *Cecidomyiidae*. El suborden *Brachycera* incluye las familias *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, 55 *Mydidae*, *Bombyliidae*, y *Dolichopodidae*. El suborden *Cyclorrhapha* incluye las divisiones *Aschiza* y *Aschiza*. La división *Aschiza* incluye las familias *Phoridae*, *Syrphidae*, y *Conopidae*. La división *Aschiza* incluye las secciones *Acalypratae* y *Calypratae*. La sección *Acalypratae* incluye las familias *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* y *Drosophilidae*. La sección *Calypratae* incluye las familias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*. 60

El orden *Lepidoptera* incluye las familias *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae* y *Tineidae*.

Las plagas de insectos de la invención para los cultivos principales incluyen: Maíz: *Ostrinia nubilalis*, perforador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador grasiento; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Diatraea grandiosella*, perforador del maíz del sudoeste; *Elasmopalpus lignosellus*, gusano 65

picador; *Diatraea saccharalis*, barrenador del tallo; *Diabrotica virgifera*, gusano de la raíz del maíz occidental; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de la raíz del maíz del norte; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; *Melanotus spp.*, gusanos alambre; *Cyclocephala borealis*, escarabajo enmascarado del norte (escarabajo blanco); *Cyclocephala immaculata*, escarabajo enmascarado del sur (escarabajo blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, pulguilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, áfido de la hoja del maíz; *Anuraphis maidiradicis*, áfido de la raíz del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinches; *Melanopus femurrubrum*, saltamontes de pata roja; *Meanopus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz; *Agromyza parvicornis*, minadora mancha del maíz; *Anaphothrips obscurus*, trips de hierba; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus urticae*, ácaros araña con dos manchas; Sorgo: *Chilo partellus*, taladrador del sorgo; *Spodoptera frugiperda*, cogollero del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador del cuello del maíz; *Feltia subterranea*, cortador pequeño; *Phyllophaga crinita*, escarabajo blanco; *Eleodes*, *Conoderus* y *Aeolus spp.*, lombrices; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Chaetocnema pulicaria*, pulguilla del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, áfido de la hoja del maíz; *Sipha flava*, áfido amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Contarinia sorghicola*, mosquito del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro araña carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro araña con dos manchas; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, gusano soldado; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador del cuello del maíz; *Agrotis orthogonia*, gusano cortador occidental; *Elasmopalpus lignosellus*, taladrador del cuello del maíz; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja del cereal; *Hypera punctata*, gorgojo de la hoja de trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de la raíz del maíz del sur; áfido del trigo de Rusia; *Schizaphis graminum*, escarabajo verde; *Macrosiphum avenae*, áfido del grano inglés; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de pata roja; *Melanoplus differentialis*, saltamontes; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hess; *Sitodiplosis mosellana*, mosquito del trigo; *Meromyza americana*, gusano del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca de sierra del tallo del trigo; *Aceria tulipae*, ácaro enrollador de la hoja del trigo; Girasol: *Suleima helianthana*, polilla de los brotes del girasol; *Homoeosoma electellum*, polilla del girasol; *zygogramma exclamationis*, escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptera murtfeldtiana*, mosquito de la semilla de girasol; Algodón: *Heliothis virescens*, gusano bellotero; *Helicoverpa zea*, gusano del algodón; *Spodoptera exigua*, gusano soldado de la remolacha; *Pectinophora gossypiella*, lagarta rosada; *Anthonomus grandis*, picudo; *Aphis gossypii*, áfido del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltona del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca blanca con bandas de color en las alas; *Lygus lineolaris*, chinche opaca; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de pata roja; *Melanoplus differentialis*, saltamontes; *Thrips tabaci*, trip de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trip del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, ácaro araña carmín; *Tetranychus urticae*, ácaro araña con dos manchas; Arroz: *Diatraea saccharalis*, taladrador de la caña de azúcar; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero; *Helicoverpa zea*, gusano elotero; *Colaspis brunnea*, colaseis de la uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, rice gorgojo acuático del arroz; *Sitophilus oryzae*, gorgojo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, saltahoja del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche; *Acrosternum hilare*, chinche verde; Soja: *Pseudopiusia includens*, gusano de la soja; *Anticarsia gemmatilis*, oruga del frijol terciopelo; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, taladrador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Spodoptera exigua*, gusano soldado de la remolacha; *Heliothis virescens*, gusano cogollero del algodón; *Helicoverpa zea*, gusano bellotero del algodón; *Epilachna varivestis*, escarabajo mejicano de la judía; *Myzus persicae*, áfido del verde del melocotonero; *Empoasca fabae*, saltahojas de la patata; *Acrosternum hilare*, chinche verde; *Melanoplus femurrubrum*, langosta de pata roja; *Melanoplus differentialis*, langosta diferencial; *Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz; *Sericothrips variabilis*, trip de la soja; *Thrips tabaci*, trip de la cebolla; *Tetranychus turkestanii*, araña amarilla de la fresa; *Tetranychus urticae*, arañuela roja; Cebada: *Ostrinia nubilalis*, barrenador del maíz europeo; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Schizaphis graminum*, áfido verde; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche pequeña de los cereales; *Acrosternum hilare*, chinche hedionda verde; *Euschistus servus*, chinche hedionda parda; *Delia platura*, gusano de la semilla del maíz; *Mayetiola destructor*, mosquito del trigo; *Petrobia latens*, ácaro pardo del trigo; Colza de semilla oleaginosa: *Brevicoryne brassicae*, áfido de la col; *Phylotreta cruciferae*, pulguilla; *Mamestra configurata*, gusano soldado; *Plutella xylostella*, polilla dorso de diamante; *Delia spp.*, larvas de la raíz.

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

Métodos para aumentar el rendimiento de la planta

Se proporcionan métodos para aumentar el rendimiento de la planta. Los métodos comprenden introducir en una planta o célula vegetal un polinucleótido que comprende una secuencia plaguicida divulgada en el presente documento. Como se define en el presente documento, el "rendimiento" de la planta hace referencia a la calidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. Por "biomasa" se quiere decir cualquier producto vegetal medido. Un aumento en la producción de biomasa es cualquier mejora en el rendimiento del producto vegetal medido. El aumento de rendimiento de la planta tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el aumento de la biomasa

de hoja de la planta puede aumentar el rendimiento de las hortalizas de hoja para el consumo humano o animal. Adicionalmente, se puede utilizar el aumento de la biomasa de hoja para aumentar la producción de productos farmacéuticos o industriales derivados de plantas. Un aumento del rendimiento puede comprender cualquier aumento estadísticamente significativo, incluyendo, entre otros, al menos, un aumento de 1 %, al menos un aumento del 3 %, al menos un aumento del 5 %, al menos un aumento del 10 %, al menos un aumento del 20 %, al menos un aumento del 30 %, al menos un aumento del 50 %, al menos un aumento del 70 %, al menos un aumento del 100 % o mayor en el rendimiento en comparación con una planta que no expresa la secuencia de plaguicida.

Las plantas también se pueden tratar con una o más composiciones químicas, incluidos uno o más de herbicidas, insecticidas o fungicidas. Composiciones químicas de ejemplo incluyen: Herbicidas de frutas/hortalizas: atrazina, bromacil, diuron, glifosato, linuron, metribuzina, simazina, trifluralina, fluazifop, glufosinato, halosulfurón gowan, paraquat, propizamida, setoxidima, butafenacilo, halosulfurón, indaziflam; Insecticidas de frutas/hortalizas: aldicarb, *Bacillus thuringiensis*, carbarilo, carbofurano, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, diazinon, malatión, abamectina, ciflutrina/beta-ciflutrina, esfenvalerato, Lambda-cihalotrina, acequinocil, bifenazato, metoxifenozida, novalurón, cromafenozida, tiacloprid, dinotefurano, fluacripirim, tolfenpirad, clotianidina, espirodiclofeno, gamma-cihalotrina, espiromesifeno, espinosad, rinaxipir, ciazipir, espinoteram, triflumuron, espirotetramat, imidacloprid, flubendiamida, tiodicarb, metaflumizona, sulfoxaflor, ciflumetofeno, cianopirafeno, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, espinotoram, tiodicarb, flonicamid, metiocarb, emamectina-benzoato, indoxacarb, foztizato, fenamifos, cadusafos, piriproxifeno, fenbutatina-oxid, hextizox, metomilo, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona]; Fungicidas de frutas/hortalizas: carbendazim, clortalonil, EBDC, azufre, tiofanato-metilo, azoxistrobina, cimoxanilo, fluazinam, fosetilo, iprodiona, kresoxim-metilo, metalaxil/mefenoxam, trifloxistrobina, etaboxam, oprovalicarb, trifloxistrobina, fenhexamid, oxpoconazol fumarato, ciazofamid, fenamidona, zoxamida, picoxistrobina, piraclostrobina, ciflufenamid, boscalid; Herbicidas de cereales: isoproturón, bromoxinilo, ioxonilo, fenoxis, clorsulfurón, clodinafop, diclofop, diflufenican, fenoxaprop, florasulam, fluroxipir, metsulfurón, triasulfurón, flucarbazona, yodosulfurón, propoxicarbazona, picolinafen, mesosulfurón, beflubutamid, pinoxaden, amidosulfurón, tifensulfurón, tribenuron, flupirsulfurón, sulfosulfurón, pirasulfotol, piroxulam, flufenacet, tralcoxidim, piroxasulfon; Fungicidas de cereales: carbendazim, clortalonil, azoxistrobina, ciproconazol, ciprodinil, fenpropimorph, epoxiconazol, Kresoxim-metilo, quinoxifen, tebuconazol, trifloxistrobina, simeconazol, picoxistrobina, piraclostrobina, dimoxistrobina, protioconazol, fluoxastrobina; Insecticidas de cereales: dimetoato, Lambda-cihalotrina, deltametrina, alfa-cipermetrina, β -ciflutrina, bifentrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinotefuran, clorpirifos, metamidofos, oxidemeton-metilo, pirimicarb, metiocarb; Herbicidas del maíz: atrazina, alaclor, bromoxinil, acetoclor, dicamba, clopiralid, (S-)Dimetenamid, glufosinato, glifosato, isoxaflutol, (S-)metolaclo, mesotriona, nicosulfurón, primisulfurón, rimsulfurón, sulcotriona, foramsulfurón, topamezona, tembotriona, saflufenacilo, tiencarbazona, flufenacet, piroxasulfon; Insecticidas del maíz: carbofuran, clorpirifos, bifentrina, fipronil, imidacloprid, lambda-cihalotrina, flutrutrina, terbufos, tiametoxam, clotianidina, espiromesifen, flubendiamida, triflumuron, rinaxipir, deltametrina, tiodicarb, β -ciflutrina, cipermetrina, bifentrina, lufenurón, triflumorón, teflutrina, tebupirimfos, etiprol, ciazipir, tiacloprid, acetamiprid, dinaetofuran, avermectina, metiocarb, espirodiclofeno, espirotetramat; Fungicidas del maíz: fenitropan, tiram, protioconazol, tebuconazol, trifloxistrobina; Herbicidas del arroz: butaclor, propanil, azimsulfurón, bensulfurón, cihalofop, daimurón, fentrazamida, imazosulfurón, mefenacet, oxaziclomefona, pirazosulfurón, piributicarb, quinclozac, tiobencarb, indanofan, flufenacet, fentrazamida, halosulfurón, oxaziclomefona, benzobiciclon, piriftalid, penoxsulam, bispiribac, oxadiargil, etoxisulfurón, pretilaclor, mesotriona, tefuriltriona, oxadiazona, fenoxaprop, pirimsulfurón; Insecticidas del arroz: diazinon, fenitropan, fenitropan, fenobucarb, monocrotofos, benfuracarb, buprofezin, dinaetofuran, fipronil, imidacloprid, isoprocarb, tiacloprid, cromafenozida, tiacloprid, dinaetofuran, clotianidina, etiprol, flubendiamida, rinaxipir, deltametrina, acetamiprid, tiametoxam, ciazipir, espinosad, espinotoram, emamectina-benzoato, cipermetrina, clorpirifos, cartap, metamidofos, etofenprox, triazofos, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5h)-ona, carbofurano, benfuracarb; Fungicidas del arroz: tiofanato-metilo, azoxistrobina, carpropamid, edifenfos, ferimzona, iprobenfos, isoprotiolano, pencicuron, probenazol, piroquilon, triciclazol, trifloxistrobina, diclocimet, fenoxanil, simeconazol, tiadinil; Herbicidas del algodón: diuron, fluometuron, MSMA, oxifluorfen, prometrina, trifluralin, carfentrazona, cletodim, fluazifop-butilo, glifosato, norflurazon, pendimetalina, piratio bac-sodio, trifloxisulfurón, tepraloxidim, glufosinato, flumioxazina, tiazurón; Insecticidas del algodón: acefato, aldicarb, clorpirifos, cipermetrina, deltametrina, malatión, monocrotofos, abamectina, acetamiprid, emamectina benzoato, imidacloprid, indoxacarb, lambda-cihalotrina, espinosad, tiodicarb, gamma-cihalotrina, espiromesifen, piridilil, flonicamid, flubendiamida, triflumuron, rinaxipir, beta-ciflutrina, espirotetramat, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, dinotefuran, flubendiamida, ciazipir, espinosad, espinotoram, gamma cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5h)-on, tiodicarb, avermectina, flonicamid, piridilil, espiromesifen, sulfoxaflor, penofos, triazofos, endosulfano; Fungicidas del algodón: etridiazol, metalaxil, quintozeno; Herbicidas de la soja: alaclor, bentazona, trifluralin, clorimuron-etil, cloransulam-metil, fenoxaprop, fomesafen, fluazifop, glifosato, imazamox, imazaquin, imazetapir, (s-)metolaclo, metribuzina, pendimetalina, tepraloxidim, glufosinato; Insecticidas de la soja: lambda-cihalotrina, metomil, paratión, tiocarb, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinaetofuran, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, espinosad, espinotoram, emamectina-benzoato, fipronil, etiprol, deltametrina, β -ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, espirotetramat, espirodiclofeno, triflumuron, flonicamid, tiodicarb, beta-ciflutrina; Fungicidas de la soja: azoxistrobina, ciproconazol, epoxiconazol, flutriafol, piraclostrobina, tebuconazol, trifloxistrobina, protioconazol, tetraconazol; Herbicidas de la caña de azúcar: cloridazon, desmedifam, etofumesato, fenmedifam, trialato, clopiralid, fluazifop, lenacil, metamitron, quinmerac, cicloxidim, triflurosulfurón, tepraloxidim, quizalofop; Insecticidas de la caña de

azúcar: imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, tiacloprid, acetamiprid, dinetofuran, deltametrina, β -ciflutrina, gamma/lambda cihalotrina, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona, teflutrina, rinaxipir, ciazipir, fipronil, carbofuran; Herbicidas de la cánola: clopiralid, diclofop, fluazifop, glufosinato, glifosato, metazaclor, trifluralin etametsulfurón, quinmerac, quizalofop, cletodim, tepraloxidim; Fungicidas de la cánola: azoxistrobina, carbendazim, fludioxonil, iprodiona, procloraz, vinclozolina; Insecticidas de la cánola: carbofuran, organofosfatos, piretroides, tiacloprid, deltametrina, imidacloprid, clotianidina, tiametoxam, acetamiprid, dinetofuran, β -ciflutrina, gamma y lambda cihalotrina, tau-fluvaleriato, etiprol, espinosad, espinotoram, flubendiamida, rinaxipir, ciazipir, 4-[[[(6-clorpiridin-3-il)metil](2,2-difluoretil)amino]furan-2(5H)-ona.

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

Ejemplos experimentales

Ejemplo 1. Extracción de ADN plasmídico

15 La secuencia génica completa se identificó a partir de la cepa seleccionada a través del abordaje genómico MIDAS del siguiente modo:

20 Preparación de ADN extracromosómicos a partir de la cepa. El ADN extracromosómico contiene una mezcla de algunos o tofos los siguientes: plásmidos de varios tamaños; cromosomas de fagos; fragmentos de ADN genómico no separados mediante el protocolo de purificación; otras moléculas extracromosómicas sin caracterizar.

25 Cizallamiento mecánico o enzimático del ADN extracromosómico para generar fragmentos distribuidos por tamaño.

30 Secuenciación del ADN fragmentado mediante métodos de pirosecuenciación de alto rendimiento.

Identificación de supuestos genes de toxinas mediante análisis de homología y/u otros análisis informáticos.

30 Cuando sea necesario, finalización de la secuencia del gen de interés mediante una de varias estrategias de PCR o clonación (por ejemplo, TAIL-PCR).

Ejemplo 2. Expresión heteróloga de AXMI-150

35 El ORF complete de *axmi-150* (~2 kb que codifican una proteína de ~77,5 kD) se clonó en un vector de expresión de *E. coli* basado en pRSF1b (para dar pAX5482). La secuencia génica de *axmi-150* comenzando con una metionina interna (19 aminoácidos cadena debajo de la metionina original en pAX5482) también se clonó en el vector basado en pRSF1b para dar pAX5484.

40 La secuencia que codifica *axmi-150* también se clonó en un vector de expresión de *Bacillus* basado en pAX916 (para dar pAX5483). Todos los clones resultantes se confirmaron mediante análisis de restricción y, por último, mediante secuenciación completa del gen clonado.

45 Para la expresión en *E. coli*, BL21 *DE3 se transformó con pAX5482 o pAX5484. Se inoculó una única colonia en medio LB suplementado con kanamicina y se cultivó durante la noche a 37 °C. Al día siguiente se inoculó medio fresco por duplicado con 1 % del cultivo durante la noche y se cultivó a 37 °C hasta la fase logarítmica. Después, se indujeron cultivos con IPTG 1mM durante 3 horas a 37 °C o durante la noche a 20 °C. Cada sedimento celular se suspendió en tampón de carbonato sódico 50mM, a pH 10,5 suplementado con DTT 1mM y se sometió a ultrasonidos. El análisis mediante SDS-PAGE detectó la expresión de una proteína de ~78kDa correspondiente a AXMI-150.

50 Para la expresión en *Bacillus*, Bt51 se transformó con pAX5483 y una única colonia se cultivó en medio CYS-glu durante 3 días hasta la esporulación. Después, el sedimento celular se extrajo con tampón Tris Cl 50mM, a pH 8,0, o con tampón de carbonato sódico 50mM, a pH 10,5, suplementado cada uno con DTT 1mM. La fracción soluble mostró presencia de una proteína de 78 kDa Axmi150. La tripsinización de AXMI-150 dio una ligera banda proteica de aproximadamente 55 kDa.

55 La secuencia del marco de lectura abierto de *axmi-150* se proporciona en el presente documento como la SEC ID N°: 1 y codifica la proteína AXMI-150 (SEC ID N°: 2).

60 La búsqueda de la secuencia de aminoácidos de AXMI-150 frente a las bases de datos de secuencias públicas muestra que AXMI-150 es homóloga a la proteína AXMI-004 (patente de EE.UU. 7.355.099). AXMI-150 también exhibe homología de aminoácidos con crylCa4, y con un grupo de proteínas de tipo AXMI-004 descritas en la publicación de la solicitud internacional n° WO2005/107383.

65 Homólogos conocidos y porcentaje de identidad aproximado:

AXMI-004 - 85,5 %
 CrylCa4 (dominio de la toxina) - 51,8 %

Ejemplo 3. Actividad plaguicida de AXMI-150

5 Los extractos solubles que contienen AXMI-150 se analizaron en ensayos de insectos con controles adecuados. Una
 lectura de 5 días de las placas mostró que AXMI-150 tenía actividad plaguicida sobre el taladrador europeo del maíz
 (ECB), la oruga del frijol terciopelo (VBC), y una elevada mortalidad (> 50 %) sobre la polilla dorso de diamante
 (DBM) y el taladrador del suroeste del maíz (SWCB). La Tabla 1 muestra una descripción de las asignaciones de
 10 puntuación usadas en el presente documento.

Tabla 1. Descripción del sistema de puntuación

Puntuación	Descripción
0	No se observa ningún efecto
1	Aturdimiento leve no uniforme
2	Aturdimiento moderado no uniforme
3	Aturdimiento uniforme moderado a intenso
4	mortalidad (< 100 %) con aturdimiento uniforme
5	Mortalidad completa

Tabla 2. Actividad plaguicida de AXMI-150.

Plaga	Actividad de AXMI-150
Taladrador europeo del maíz	+++
Oruga del frijol terciopelo	+
Polilla de dorso de diamante	+++++
Taladrador del suroeste del maíz	++++

15 Ejemplo 4. Ensayos adicionales para la actividad plaguicida

Las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden analizar para determinar su capacidad para producir
 proteínas plaguicidas. La capacidad de una proteína plaguicida para actuar como plaguicida sobre una plaga a
 20 menudo se evalúa de varias formas. Una forma bien conocida en la técnica es realizar un ensayo de alimentación.
 En dicho ensayo de alimentación, se expone la plaga a una muestra que contiene los compuestos a analizar o
 muestras control. A menudo esto se realiza colocando el material a analizar, o una dilución adecuada de dicho
 material, sobre un material que ingerirá la plaga, tal como una dieta artificial. El material a analizar puede estar
 25 compuesto por un líquido, sólido o suspensión espesa. El material a analizar se puede colocar sobre la superficie y
 después dejar secar. Como alternativa, el material a analizar se puede mezclar con una dieta artificial fundida,
 después dispensar en la cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una taza, un plato o un
 pocillo de una placa de microtitulación.

30 Los ensayos para plagas de succionadores (por ejemplo áfidos) pueden implicar separar el material a analizar del
 insecto mediante partición, idealmente una porción que puede perforar las partes succionadoras de la boca del
 insecto succionador, para permitir la ingestión del material a analizar. A menudo, el material a analizar se mezcla
 con un estimulante de la alimentación, tal como sacarosa, para estimular la ingestión del compuesto de ensayo.

35 Otros tipos de ensayos pueden incluir microinyección del material a analizar en la noca o intestino de la plaga, así
 como el desarrollo de plantas transgénicas, seguido del análisis de la capacidad de la plaga a la que se va a
 administrar la planta transgénica. El análisis de la planta puede implicar el aislamiento de las partes de la planta que
 normalmente se consumen, por ejemplo pequeñas jaulas fijadas a una hoja, o el aislamiento de plantas completas
 en jaulas que contienen insectos.

40 Otros métodos y abordajes para analizar plagas son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar en, por
 ejemplo, Robertson y Preisler, eds. (1992) Pesticide bioassays with arthropods, CRC, Boca Raton, FL. Como
 alternativa, los ensayos normalmente se describen en las revistas Arthropod Management Tests y Journal of
 Economic Entomology o mediante debates con miembros de la Sociedad Entomológica de América (ESA).

45 Ejemplo de referencia 1. Evolución directa de AXMI-004

La evolución directa se realizó con AXMI-004 (SEC ID N°: 14). La mutagénesis estaba dirigida a tres bucles en la
 región de unión al receptor. Como primera etapa se generaron deleciones de los bucles 1 (correspondientes a los
 residuos 311 - 316 de la SEC ID N°: 14), 2 (correspondientes a los residuos 368 - 378 de la SEC ID N°: 14) y 3

(correspondientes a los residuos 434 - 438 de la SEC ID N°: 14), se expresaron en Bt51 y se analizó la bioactividad. Las deleciones de los bucles 2 y 3 disminuyeron intensamente la solubilidad de las proteínas, mientras que la deleción del bucle 1 no afectó a la solubilidad de las proteínas. La deleción variante del bucle 1 mostró una toxicidad reducida contra el taladrador europeo del maíz (ECB), pero conservó su actividad contra la polilla dorso de diamante (DBM).

5 Después, dentro de estos 3 bucles se mutageneizó un total de 23 posiciones. Se generó un conjunto de mutantes puntuales.

10 El plásmido pAX5485 (His6-axmi004-m2 en pRSF1b) se usó para la expresión de axmi-004 salvaje y también fue la base para la mutagénesis y la expresión variante. La mutagénesis se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio óptica QUIKCHANGE® (Stratagene), se secuenciaron los mutantes y se identificaron variantes únicas. Se generó la siguiente diversidad de mutantes puntuales:

Tabla 3: Bucle 1:

Posición	311	312	313	314	315	316
Salvaje	Y	S	V	G	R	N
Diversidad	G	R	G	P	G	G
	C	G	R	R	A	R
	R	P	T	C	C	A
	S	C	A	S	S	S
	T	A	I	A	T	P
	A	E	H	T	W	T
	P	Q	D	W	P	W
	V	H	Q	H	N	K
	E	V	L	L	E	I
	L	N	E	V	L	E
	K	L	M	D	V	F
	Q	D		M	K	V
	D	K		E	Y	Q
	I			K	D	
					Q	
					I	
TOTAL	14	13	11	14	16	13

15

Tabla 4: Bucle 2:

Posición	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378
Salvaje	P	L	Q	Q	P	A	P	A	P	P	F
	A	A	P	R	D	G	R	G	S	C	A
	G	W	S	P	K	R	G	W	G	S	C
	T	G	G	S	V	s	A	C	T	T	T
	S	T	R	G	L	C	S	S	W	A	W
	C	R	W	T	N	P	T	R	C	W	G
	R	M	A	L	E	T	W	D	A	R	S
	L	F	T	V	F	V	V	L	R	G	R
	Q	K	V	H	H	N	H	V	I	I	V
	V	E	E	K	Q	E	F	K	V	L	Y
	N	V	L	F	M	D	L	I	L	H	K
	D	H	Y	N	A	M	D	E	D	V	Q
	E	I	I	D	G	I	Y	H	E	K	E
	H			Y	R	F	Q	Q	Q	Q	I

Posición	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378
	I			M	T	K	E	M	M	D	L
				E	S	E	M		N	E	I
					W	L	N		H	Y	D
						Y					
						H					
TOTAL	14	12	12	15	16	18	14	14	16	16	16

Tabla 5: Bucle 3:

Posición	434	435	436	437	438
Salvaje	K	S	G	T	P
MUTANTES	T	R	P	A	G
	G	T	R	G	R
	A	G	T	P	T
	R	A	A	T	S
	S	P	S	S	W
	W	W	V	R	A
	P	L	K	I	F
	E	E	E	M	L
	Q	V	L	E	V
	V	M	D	H	Q
	L	D	H	Y	K
	N	H	Q	V	F
	F		N	K	I
	M			D	P
	I			F	N
	K			L	
	H			N	
TOTAL	17	12	13	17	15

Las variantes para el bucle 1, el bucle 2 y el bucle 3 se combinaron por separado.

Expresión y detección selectiva en bibliotecas

5

Detección selectiva primaria:

Las variantes de la biblioteca combinada, así como pAX5485, se transformaron en células BL21*DE3 y se sembraron en LB+ Kanamicina (100 µg/ml). Las colonias frescas se introdujeron en 16 ml de medio líquido LB+ Kanamicina (100 µg/ml) y se cultivaron en bloques de 24 pocillos profundos a 37 °C y 300 rpm hasta alcanzar una DO600 nm de 0,3 - 0,4. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales a 20 °C. La DO600 nm se determinó y las células se recogieron mediante centrifugación (10 minutos a 4.500 rpm, 4 °C). Los sedimentos celulares se resuspendieron en carbonato sódico 50 mM a pH 10,5, DTT 1 mM a una densidad de OD600/ml 10. Las células se rompieron mediante batido con esferas y los extractos solubles se obtuvieron tras centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

Los extractos se analizaron para determinar la actividad contra el ECB, el taladrador del suroeste del maíz (SWCB), *Heliothis virescens* (Hz), la oruga del fríjol terciopelo (VBC) y el DBM a 4 duplicados por cada variante. Tras 5 días se determinaron las puntuaciones de la toxicidad mediante el promedio de las puntuaciones de 4 duplicados. Se analizaron 122 variantes del conjunto del bucle 1, 240 variantes del conjunto del bucle 2 y 121 variantes del conjunto del bucle 3, respectivamente, en esta detección selectiva primaria, proporcionando una cobertura de 1,5x de la

20

biblioteca.

Repetición de los ensayos y escalado:

- 5 Las variantes que mostraban puntuaciones mejoradas sobre el ECB o el SWCB se secuenciaron y se volvieron a analizar a 4 duplicados por variante. Las variantes que mostraban de nuevo una mejor actividad contra el ECB o el SWCB se seleccionaron para el escalado.

- 10 Para los escalados, se escogieron 3 colonias recién transformadas en 70 ml de LB+Kanamicina (100 µg/ml) y se cultivaron en matraces de agitación de 0,5 litros a 37 °C y 150 rpm hasta alcanzar una DO600 nm de 0,3 - 0,4. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales a 20 °C. La DO600 nm se determinó y las células se recogieron mediante centrifugación (10 minutos a 5000 rpm, 4 °C). Los sedimentos celulares se resuspendieron en carbonato sódico 50 mM a pH 10,5, DTT 1 mM a una densidad de OD600/ml 10. Las células se rompieron mediante batido con esferas y los extractos solubles se obtuvieron tras centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Las variantes de Axmi-004 en dichos extractos se cuantificaron en SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie comparando diluciones en serie del extracto con un patrón de BSA de concentración conocida. Todas las proteínas variantes analizadas se expresan a niveles muy similares.
- 15 Las preparaciones de escalado se analizaron contra ECB, SWCB, VBC, Hz y DBM a 16 duplicados por variante y plaga. Se realizó el promedio de las puntuaciones.
- 20 Las siguientes variantes del bucle 2 mostraron una toxicidad mejorada en la detección selectiva primaria, la repetición del ensayo y los escalados.

Tabla 6

	ECB		SWCB	
	Aturdimiento	Porcentaje de mortalidad	Aturdimiento	Porcentaje de mortalidad
axmi-004	+++	13 %	-	6 %
L21B11	+	9 %	+	16 %
L21F2	++	6 %	+	14 %
L23G5	+	9 %	+	16 %
L21A5	++		-	-
L22H7	++			
L22E7	+			
L22F7	++			
pRSF1b	-	-		

- 25 La diversidad de la secuencia en las posiciones 370, 373, 376 y 377 se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

	370	371	372	373	374	375	376	377	378
AXMI004	Q	Q	P	A	P	A	P	P	F
L21A5	Q	Q	P	A	P	A	P	Q	F
L21F2	R	Q	P	A	P	A	P	P	F
L21B11	Q	Q	P	A	P	A	T	P	F
L22F7	Q	Q	P	A	P	A	G	P	F
L23G5	Q	Q	P	M	P	A	P	P	F

- 30 Tres variantes de la biblioteca del bucle 1 mostraron una toxicidad mejorada en el ensayo principal y en la repetición del ensayo (Tabla 8).

Tabla 8.

	Hz	ECB	VBC	DBM	SWCB
axmi004	-	+	++	+++++	+
L11H11	-	++	+	+++++	+
L11E8	-	++	++	+++++	Sin datos
L11F9	+	++	+	+++++	Sin datos

Las tres variantes mejoradas están mutadas en la posición 316 de la SEC ID N°: 14, donde el residuo de asparagina se mutó a valina, prolina o fenilalanina en los mutantes L11E8, L11F9 y L11H11, respectivamente, lo que sugiere que se ha identificado una posición importante relacionada con la actividad mejorada.

Las siguientes variantes del bucle 3 mostraron una toxicidad mejorada en la detección selectiva primaria, la repetición del ensayo de la actividad del ECB y los escalados.

Tabla 9:

	Puntuación de aturdimiento	Mortalidad (porcentaje)
AXMI004	++	28 %
L31B10	++	Sin datos
L31A11	++	20 %
L31H11	++	33 %

Las variantes mejoradas están mutadas desde lisina en la posición 434 de AXMI004 a treonina y valina en los mutantes L31B10 y L31A11, respectivamente, y de prolina en la posición 438 de AXMI004 a serina en el mutante L31H11. En una estructura de cristal simulada de estos AXMI004, las cadenas laterales de las posiciones mutadas en los bucles 1, 2 y 3 miran todas en la misma dirección general. Este hallazgo sugiere que los aminoácidos en varios bucles pueden contribuir a una interfaz de unión común. Por tanto, las permutaciones adicionales que incorporan una diversidad funcionalmente mejorada en varios bucles pueden proporcionar todavía más mejoras en la actividad.

Ejemplo 5. Evolución dirigida de AXMI-150

Este ejemplo describe la evolución dirigida de AXMI-150 (SEC ID N°: 2). La mutagénesis se ha dirigido a un bucle en la supuesta región de procesamiento.

El plásmido pAX5482 (His6-axmi150 en pRSF1b) se usó para la expresión de axmi-150 salvaje y también fue la base para la mutagénesis y la expresión variante. La mutagénesis se realizó usando el kit Lightning QUIKCHANGE® (Stratagene), se secuenciaron los mutantes y se identificaron variantes únicas. Se generó la siguiente diversidad de mutantes puntuales:

Tabla 10

	116	117	118	119	120	121	122
AXMI150	N	N	T	G	S	S	K
	P	T	S	A	P	A	G
	R	G	P	S	T	G	C
	T	S	A	E	R	T	P
	G	C	R	M	C	P	S
	Y	A	G	V	A	R	T
	Q	P	N	L	G	Q	R
	K	R	D	Q	L	E	H
	A	K	M	D	E	L	I
	W	E	L	H	Q	H	E
	S	M	V	K	H	D	N
		F	H		V	V	D
			E			F	L
			Y				Y
			K				M
							Q
TOTAL	10	11	14	10	11	12	15

Expresión y detección selectiva en bibliotecas

Detección selectiva primaria:

- Las variantes de la biblioteca combinada, así como pAX5482, se transformaron en células BL21*DE3 y se sembraron en LB+ Kanamicina (100 µg/ml). Se seleccionaron las colonias frescas en 16 ml de medio líquido LB+ Kanamicina (100 µg/ml) y se cultivaron en bloques de 24 pocillos profundos a 37 °C y 300 rpm hasta alcanzar una DO600 nm de 0,3 - 0,4. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales a 20 °C. La DO600 nm se determinó y las células se recogieron mediante centrifugación (10 minutos a 4.500 rpm, 4 °C). Los sedimentos celulares se resuspendieron en carbonato sódico 50 mM a pH 10,5, DTT 1 mM a una densidad de OD600/ml 10. Las células se rompieron mediante batido con esferas y los extractos solubles se obtuvieron tras centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- Los extractos se analizaron para determinar la actividad contra ECB, SWCB, Hz, VBC y DBM a 4 duplicados por cada variante. Tras 5 días se determinaron las puntuaciones de la toxicidad mediante el promedio de las puntuaciones de 4 duplicados. Se cribaron 119 variantes, dando una cobertura 1,5x de la biblioteca.
- Repetición de los ensayos y escalado:
- Las variantes que mostraban puntuaciones mejoradas sobre el ECB o el SWCB se secuenciaron y se volvieron a analizar a 4 duplicados por variante. Las variantes que mostraban de nuevo una mejor actividad contra el ECB o el SWCB se seleccionaron para el escalado.
- Para los escalados, se escogieron 3 colonias recién transformadas en 70 ml de LB+Kanamicina (100 µg/ml) y se cultivaron en matraces de agitación de 0,5 litros a 37 °C y 150 rpm hasta alcanzar una DO600 nm de 0,3 - 0,4. Se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales a 20 °C. La DO600 nm se determinó y las células se recogieron mediante centrifugación (10 minutos a 5000 rpm, 4 °C). Los sedimentos celulares se resuspendieron en carbonato sódico 50 mM a pH 10,5, DTT 1 mM a una densidad de OD600/ml 10. Las células se rompieron mediante batido con esferas y los extractos solubles se obtuvieron tras centrifugar a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Las variantes de Axmi-150 en dichos extractos se cuantificaron en SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie comparando diluciones en serie del extracto con un patrón de BSA de concentración conocida. Todas las proteínas variantes analizadas se expresan a niveles muy similares.
- Las preparaciones de escalado se analizaron contra ECB, SWCB, VBC, Hz y DBM a 16 duplicados por variante y plaga. Se realizó el promedio de las puntuaciones y se determinaron las desviaciones estándar. Las actividades de las variantes que mostraban mejoras en los escalados se muestran en las Tablas 11-13 a continuación:

Tabla 11:

n= 16	Actividad contra ECB		Actividad contra SWCB	
	Puntuación de aturdimiento	Mortalidad	Puntuación de aturdimiento	Mortalidad
AXMI150	+	-	+++	25 %
L11D3	+	-	+++	38 %
L11D6	-	-	+++	25 %
L11B6	+	-	+++	16 %
L11E5	-	-	+++	19 %
pRSF1b	-	-	-	-

35

Tabla 12

n= 16	Actividad contra ECB		Actividad contra SWCB	
	Puntuación de aturdimiento	Mortalidad	Puntuación de aturdimiento	Mortalidad
AXMI150	+	8 %	+++ (n=12)	58 %
L11C10	+	13 %	++++	97 %
L11D10	++	8 %	+++	75 %
L11F10	+	-	+++	72 %
L11E12	+	-	+ (n=12)	31 %

Tabla 13

n= 16	Actividad contra ECB		Actividad contra SWCB	
	Puntuación de aturdimiento	Mortalidad	Puntuación de aturdimiento	Mortalidad
AXMI150	+	-	+++	41 %
L11G5	-	-	-	6 %
L11D1	-	2 %	+++	64 %
L11A6	-	3 %	++	41 %
L11B5	-	5 %	+	19 %
L12C1	-	-	++	37 %

La diversidad de la secuencia en dichas variantes mejoradas se describe a continuación:

5

Tabla 14

	116	117	118	119	120	121	122
AXMI150	N	N	T	G	S	S	K
L11A6	N	N	S	G	S	S	K
L11B5	N	N	N	G	S	A	K
L11B6	N	N	T	G	S	S	K
L11C10	K	N	T	G	S	S	K
L11D1	N	N	T	G	G	S	K
L11D10	N	N	T	G	Q	S	K
L11D3	N	N	T	K	S	S	K
L11F10	N	N	T	G	S	P	K

Ejemplo 6. Vectorización de los genes para la expresión en plantas

10 Las regiones de codificación de la invención están unidas con las secuencias adecuadas del promotor y el terminador para la expresión en plantas. Dichas secuencias son bien conocidas en la técnica y pueden incluir el promotor de la actina del arroz o el promotor de la ubiquitina del maíz para la expresión en monocotiledóneas, el promotor de UBQ3 de *Arabidopsis* o el promotor 35 S del CaMV para la expresión en dicotiledóneas y los terminadores nos o PinII. Las técnicas para producir y confirmar construcciones promotor-gen-terminador también son bien conocidas en la técnica.

15 En un aspecto de la invención, las secuencias de ADN sintético se diseñan y generan. Estas secuencias sintéticas tienen una secuencia de nucleótidos alterada respecto a la secuencia parental, pero codifican proteínas que son esencialmente idénticas a la proteína AXMI-150 parental (por ejemplo, las SEC ID N°: 3, 4,5,6, o 7).

20 En otro aspecto de la invención, se incluyen las secuencias de ADN sintético que codifican proteínas que son esencialmente idénticas a la proteína AXMI-004 (por ejemplo, las SEC ID N°: 8 - 12). La proteína AXMI-004 se describe en la patente de EE.UU. N° 7.355.099 y la solicitud de la patente de EE.UU. N° 12/209.354, presentada el 12 de septiembre de 2008, titulada "Synthetic AXMI-004 Delta-endotoxin Genes and Methods for Their Use," y publicada como documento US 2010/0099081.

25 En otro aspecto de la invención se diseñan versiones modificadas de los genes sintéticos de forma que el péptido resultante está dirigido a un orgánulo de la planta, tal como el retículo endoplasmático o el apoplasto. Las secuencias peptídicas que se sabe que dirigen las proteínas de fusión a los orgánulos de plantas se conocen en la técnica. Por ejemplo, la región en N-terminal del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco *Lupinus albus* (ID en GENBANK® GI:14276838, Miller et al. (2001) Plant Physiology 127: 594 - 606) que dan como resultado un retículo endoplasmático diana de las proteínas heterólogas. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención del retículo endoplasmático que comprende el extremo N-lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo "KDEL", SEC ID N°: 13) en el extremo C, la proteína de fusión estará dirigida al retículo endoplasmático. Si la proteína de fusión carece de una secuencia de dirección del retículo endoplasmático en el extremo C, la proteína estará dirigida al retículo endoplasmático pero en última instancia será secuestrada en el apoplasto.

30 Por tanto, este gen codifica una proteína de fusión que contiene los treinta y un aminoácidos en N-terminal del gen de la fosfatasa ácida del altramuz blanco *Lupinus albus* (ID en GENBANK® GI:14276838, Miller et al., 2001, citado anteriormente) fusionados con el extremo N de la secuencia de aminoácidos de la invención, así como la secuencia

40

KDEL en el extremo C. Por tanto, se ha predicho que la proteína resultante está dirigida al retículo endoplasmático de la planta tras la expresión en una célula vegetal.

Los casetes de expresión vegetal descritos anteriormente se combinan con un marcador seleccionable vegetal adecuado para ayudar en la selección de células y tejidos transformados, y se unen en los vectores de transformación vegetales. Estos pueden incluir vectores binarios de la transformación mediada por *Agrobacterium* o simples vectores plasmídicos para transformación por aerosol o biolística.

Ejemplo 7. Vectorización de los genes para la expresión en plantas

Los ADN de la región de codificación de los genes de la invención están conectados operativamente con las secuencias adecuadas del promotor y el terminador para la expresión en plantas. Dichas secuencias son bien conocidas en la técnica y pueden incluir el promotor de la actina del arroz o el promotor de la ubiquitina del maíz para la expresión en monocotiledóneas, el promotor de UBQ3 de *Arabidopsis* o el promotor 35 S del CaMV para la expresión en dicotiledóneas y los terminadores nos o PinII. Las técnicas para producir y confirmar construcciones promotor-gen-terminador también son bien conocidas en la técnica.

Los casetes de expresión vegetal descritos anteriormente se combinan con un marcador seleccionable vegetal adecuado para ayudar en la selección de células y tejidos transformados, y se unen en los vectores de transformación vegetales. Estos pueden incluir vectores binarios de la transformación mediada por *Agrobacterium* o simples vectores plasmídicos para transformación por aerosol o biolística.

Ejemplo 8. Transformación de células de maíz con los genes de proteínas plaguicidas descritos en el presente documento

Las mazorcas de maíz se recogen mejor 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas y se prefieren los embriones 0, 8-1, 5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Los embriones se siembran en placas con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado, tal como medio DN62A5S (Sales N6 3, 98 g/l; 1 ml/l (de reservas 1.000x) de vitaminas N6; 800 mg/l de L-asparagina; 100 mg/l de mio-inositol; 1, 4 g/l de L-Prolina; 100 mg/l de casaminoácidos; 50 g/l de sacarosa; 1 mL/l (del reservas de 1 mg/ml) de 2, 4-D). No obstante, son adecuados medios y sales distintos a DN62A5S y son conocidos en la técnica. Los embriones se incuban durante la noche a 25 °C en oscuridad. No obstante, no es necesario *per se* incubar los embriones durante la noche.

Los explantes resultantes se transfieren a cuadrados de malla (30-40 por placa), se transfieren a medios osmóticos durante aproximadamente 30-45 minutos, después se transfieren a una placa radiante (ver, por ejemplo, la publicación PCT Núm. WO/0138514 y la patente de EE.UU. Nº 5.240.842).

Las construcciones de ADN diseñadas para los genes de la invención en células vegetales se aceleran en el tejido vegetal usando un acelerador de haz de aerosol, usando las condiciones esencialmente como se describe en la publicación PCT Nº WO/0138514. Después de la irradiación, los embriones se incuban durante aproximadamente 30 minutos en medios osmóticos, a continuación se colocan en medios de incubación durante la noche a 25 °C en oscuridad. Para evitar dañar de forma indebida a los explantes irradiados, se incuban durante al menos 24 horas antes de la transferencia al medio de recuperación. Después, los embriones se esparcen sobre el medio para el período de recuperación, durante aproximadamente 5 días, a 25 °C en la oscuridad, a continuación se transfieren a un medio de selección. Los explantes se incuban en medio de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, el callo resultante se transfiere al medio de maduración de embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Los embriones somáticos maduros resultantes se colocan a continuación con poca luz y el proceso de regeneración se inicia mediante métodos conocidos en la técnica. Se permite que los brotes resultantes enraícen en medio de enraizamiento, y las plantas resultantes se transfieren a macetas y se propagan como plantas transgénicas.

Materiales

Medio DN62A5S

Componentes	Por litro	Fuente
Mezcla de sales basales Chu N6 (Núm. de Prod. C 416)	3,98 g/l	Phytotechnology Labs
Solución de vitamina Chu N6 (Núm. de Prod. C 149)	1 ml/l (de reservas 1.000x)	Phytotechnology Labs
L-Asparagina	800 mg/l	Phytotechnology Labs
Mio-inositol	100 mg/l	Sigma
L-Prolina	1,4 g/l	Phytotechnology Labs

Componentes	Por litro	Fuente
Casaminoácidos	100 mg/l	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/l	Phytotechnology Labs
2, 4-D (Núm. de Prod. D-7299)	1 ml/l (de reservas 11 mg/ml)	Sigma

El pH de la solución se ajusta a un pH de 5, 8 con KOH 1N/KCl 1N, se añade Gelrita (Sigma) a una concentración de hasta 3 g/l y el medio se introduce en autoclave. Después de enfriar hasta 50 °C, se añaden 2 ml/l de una solución de reserva de 5 mg/ml de nitrato de plata (Phytotechnology Labs).

5 Ejemplo 9. Transformación de los genes de la invención en células vegetales mediante transformación mediada por *Agrobacterium*

10 Las mazorcas se recogen mejor 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las mazorcas y se prefieren los embriones 0, 8-1, 5 mm de tamaño para su uso en la transformación. Los embriones se siembran en placa con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado y se incuban durante la noche a 25 °C en oscuridad. No obstante, no es necesario *per se* incubar los embriones durante la noche. Los embriones se ponen en contacto con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores apropiados para la transferencia mediada por el plásmido Ti durante aproximadamente 5-10 min y a continuación se siembran en medio de cocultivo durante 15 aproximadamente 3 días (25 °C en oscuridad). Después del cocultivo, los explantes se transfieren a medios para el período de recuperación durante aproximadamente cinco días (a 25 °C en oscuridad). Los explantes se incuban en medio de selección durante hasta ocho semanas, dependiendo de la naturaleza y las características de la selección particular utilizada. Después del periodo de selección, el callo resultante se transfiere al medio de maduración de 20 embriones, hasta que se observa la formación de embriones somáticos maduros. Los embriones somáticos maduros resultantes se introducen a continuación con poca luz y se inicia el proceso de regeneración como se conoce en la técnica.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, resultará evidente que se pueden poner en práctica ciertos cambios y modificaciones dentro del 25 alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Kimberly S. Sampson Daniel J. Tomso Volker Heinrichs
 <120> GEN AXMI-150 DE LA DELTA-ENDOTOXINA Y MÉTODOS PARA SU USO
 <130> 45600/382950
 35 <150> 61/140.427
 <151> 23-12-2008
 <160> 14
 40 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 <210> 1
 <211> 2028
 <212> ADN
 45 <213> *Bacillus thuringiensis*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(2028)
 50 <400> 1

ES 2 534 581 T3

ttg gag gaa aga agt atg aac tca aat gaa cat gat tat ttg aaa gtt	48
Met Glu Glu Arg Ser Met Asn Ser Asn Glu His Asp Tyr Leu Lys Val	
1 5 10 15	
tgat gat gat tta agt gaa act aat atg gag agg ttt gac aaa aat gat	96
Cys Asp Asp Leu Ser Glu Thr Asn Met Glu Arg Phe Asp Lys Asn Asp	
20 25 30	
gca ctg gag att ggt atg tct att gta tct gaa ctt ctt ggc atg att	144
Ala Leu Glu Ile Gly Met Ser Ile Val Ser Glu Leu Leu Gly Met Ile	
35 40 45	
cca ggc gga gca gcc tta caa ttt gtg ttt aat caa ttg tgg tcg cgt	192
Pro Gly Gly Ala Ala Leu Gln Phe Val Phe Asn Gln Leu Trp Ser Arg	
50 55 60	
tta ggt gat tct gga tgg agt gca ttc atg gaa cat gtt gaa gaa tta	240
Leu Gly Asp Ser Gly Trp Ser Ala Phe Met Glu His Val Glu Glu Leu	
65 70 75 80	
att gat act aaa ata gaa ggg tat gca aaa aat aaa gcc tta tct gag	288
Ile Asp Thr Lys Ile Glu Gly Tyr Ala Lys Asn Lys Ala Leu Ser Glu	
85 90 95	
tta gca ggt atg cac aga aat ctt gaa aca tat ata aaa ttg ctt aat	336
Leu Ala Gly Met His Arg Asn Leu Glu Thr Tyr Ile Lys Leu Leu Asn	
100 105 110	
gaa tgg gaa aat aat act gga agt tca aaa gca caa ggt aga gta gct	384
Glu Trp Glu Asn Asn Thr Gly Ser Ser Lys Ala Gln Gly Arg Val Ala	
115 120 125	

ES 2 534 581 T3

aat tat ttt gaa agt ctt gag cag gcg gtt gaa aga ggt atg cct caa	432
Asn Tyr Phe Glu Ser Leu Glu Gln Ala Val Glu Arg Gly Met Pro Gln	
130 135 140	
ttc gca gtt ggt aat ttc gaa ata ccc ctt tta act gtt tat gta caa	480
Phe Ala Val Gly Asn Phe Glu Ile Pro Leu Leu Thr Val Tyr Val Gln	
145 150 155 160	
gct gct aac ctt cat tta ttg tta tta aga gat gtt tca gtt tat gga	528
Ala Ala Asn Leu His Leu Leu Leu Leu Arg Asp Val Ser Val Tyr Gly	
165 170 175	
aaa cgc tgg gga tgg tca gat cag aaa att aag att tat tat gag aaa	576
Lys Arg Trp Gly Trp Ser Asp Gln Lys Ile Lys Ile Tyr Tyr Glu Lys	
180 185 190	
caa gtt aag tat act cat gaa tac acc aat cat tgt tgc act tgg tat	624
Gln Val Lys Tyr Thr His Glu Tyr Thr Asn His Cys Ser Thr Trp Tyr	
195 200 205	
aat aga gga cta gat aaa ttg aaa aat aag ggt tct tct tac caa gat	672
Asn Arg Gly Leu Asp Lys Leu Lys Asn Lys Gly Ser Ser Tyr Gln Asp	
210 215 220	
tgg tac aac tat aat cgt ttc cgt aga gaa att act ctt act gtt cta	720
Trp Tyr Asn Tyr Asn Arg Phe Arg Arg Glu Ile Thr Leu Thr Val Leu	
225 230 235 240	
gat atc gtc gct gta ttc cca cac tat gat gtg aaa gct tat cca att	768
Asp Ile Val Ala Val Phe Pro His Tyr Asp Val Lys Ala Tyr Pro Ile	
245 250 255	
caa aca gtt ggc caa tta aca agg gaa gtt tat aca gac cct tta att	816
Gln Thr Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile	
260 265 270	
aat ttt aat ccg caa cta gat tct gta tct caa tta cct act ttt agt	864
Asn Phe Asn Pro Gln Leu Asp Ser Val Ser Gln Leu Pro Thr Phe Ser	
275 280 285	
gat atg gaa aat gca aca att aga acc cca cat ctg atg gag ttt tta	912
Asp Met Glu Asn Ala Thr Ile Arg Thr Pro His Leu Met Glu Phe Leu	
290 295 300	
aga atg cta aca atc tat aca gat tgg tat agt gtg gga aga aac tat	960
Arg Met Leu Thr Ile Tyr Thr Asp Trp Tyr Ser Val Gly Arg Asn Tyr	
305 310 315 320	
tat tgg gga gga cat cga gtg act tct tac cgt gta gga gga gaa aat	1008
Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Thr Ser Tyr Arg Val Gly Gly Glu Asn	
325 330 335	
ata acc tcc cct tta tat gga agt gag gca aat caa gag ctg cct aga	1056
Ile Thr Ser Pro Leu Tyr Gly Ser Glu Ala Asn Gln Glu Leu Pro Arg	
340 345 350	
caa ctg tat ttt tat ggg ccg gtt ttt aga aca tta tca aat cct act	1104
Gln Leu Tyr Phe Tyr Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr	
355 360 365	
tta aga tac tta cag caa cct gcg cca gct ccg ccg ttt gct tta cgt	1152

ES 2 534 581 T3

Leu	Arg	Tyr	Leu	Gln	Gln	Pro	Ala	Pro	Ala	Pro	Pro	Phe	Ala	Leu	Arg		
	370					375					380						
cgc	tta	gaa	gga	gta	gaa	ttt	cac	acc	act	aca	ggt	act	gat	atg	tat		1200
Arg	Leu	Glu	Gly	Val	Glu	Phe	His	Thr	Thr	Thr	Gly	Thr	Asp	Met	Tyr		400
	385				390					395							
cgt	gaa	aga	gga	tcg	gta	gat	tct	ttt	aat	gag	cta	ccg	cct	ttt	aat		1248
Arg	Glu	Arg	Gly	Ser	Val	Asp	Ser	Phe	Asn	Glu	Leu	Pro	Pro	Phe	Asn		415
				405					410					415			
cca	gtt	gga	cta	cct	cgt	aat	gca	tat	agt	cac	cgt	tta	tgt	cat	gca		1296
Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Arg	Asn	Ala	Tyr	Ser	His	Arg	Leu	Cys	His	Ala		430
			420					425					430				
acg	ttt	gtc	cgt	aaa	tct	ggg	acc	cct	tat	cta	ata	acc	ggt	act	gtc		1344
Thr	Phe	Val	Arg	Lys	Ser	Gly	Thr	Pro	Tyr	Leu	Ile	Thr	Gly	Thr	Val		445
	435					440						445					
ttt	tct	tgg	aca	cat	cgt	agt	gct	gaa	gaa	acc	aat	aca	att	gat	tca		1392
Phe	Ser	Trp	Thr	His	Arg	Ser	Ala	Glu	Glu	Thr	Asn	Thr	Ile	Asp	Ser		460
	450					455					460						
aat	aga	atc	acg	caa	att	cca	ttg	gtg	aaa	gca	tat	caa	att	agc	tcg		1440
Asn	Arg	Ile	Thr	Gln	Ile	Pro	Leu	Val	Lys	Ala	Tyr	Gln	Ile	Ser	Ser		480
	465				470					475							
ggc	act	act	gtg	agg	aga	ggt	cca	gga	ttc	aca	gga	ggc	gat	ata	ctt		1488
Gly	Thr	Thr	Val	Arg	Arg	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Gly	Asp	Ile	Leu		495
				485				490						495			
cga	aga	act	ggt	ccc	ggt	aca	ttt	ggg	gat	ata	aaa	cta	aat	atc	aat		1536
Arg	Arg	Thr	Gly	Pro	Gly	Thr	Phe	Gly	Asp	Ile	Lys	Leu	Asn	Ile	Asn		510
			500					505						510			
tca	cca	tta	tct	caa	aga	tat	cgc	gta	agg	att	cgt	tat	gct	tct	act		1584
Ser	Pro	Leu	Ser	Gln	Arg	Tyr	Arg	Val	Arg	Ile	Arg	Tyr	Ala	Ser	Thr		525
		515					520					525					
act	gat	tta	caa	ttt	ttc	acg	aat	att	aat	gga	act	acc	att	aat	atg		1632
Thr	Asp	Leu	Gln	Phe	Phe	Thr	Asn	Ile	Asn	Gly	Thr	Thr	Ile	Asn	Met		540
	530					535					540						
ggt	aat	ttc	cca	aaa	acc	gtg	aat	aat	tcg	agt	tct	gaa	ggc	tat	aga		1680
Gly	Asn	Phe	Pro	Lys	Thr	Val	Asn	Asn	Ser	Ser	Ser	Glu	Gly	Tyr	Arg		560
	545				550					555					560		
act	gta	tca	ttt	agt	act	cca	ttt	agc	ttt	tca	aat	gca	caa	agt	ata		1728
Thr	Val	Ser	Phe	Ser	Thr	Pro	Phe	Ser	Phe	Ser	Asn	Ala	Gln	Ser	Ile		575
				565					570					575			
ttt	aga	tta	ggt	ata	caa	gct	ttt	tct	gga	gtc	cac	gag	att	cac	gtt		1776
Phe	Arg	Leu	Gly	Ile	Gln	Ala	Phe	Ser	Gly	Val	His	Glu	Ile	His	Val		590
		580						585					590				
gat	aga	att	gaa	ttt	gtc	ccg	gca	gag	gta	aca	ttt	gag	gca	gag	tat		1824
Asp	Arg	Ile	Glu	Phe	Val	Pro	Ala	Glu	Val	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Tyr		605
		595				600						605					
gat	tta	gaa	agg	gcg	caa	aag	gcg	gta	aat	gca	cta	ttt	aca	tct	aca		1872
Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Thr		

ES 2 534 581 T3

610	615	620	
aat cca aaa gat atg aaa aca tat gtg aca gaa tct cag att gac caa			1920
Asn Pro Lys Asp Met Lys Thr Tyr Val Thr Glu Ser Gln Ile Asp Gln			
625	630	635	640
gtg ttc aat cta gta gag tgc tta tcg gac gag gtc tgt ctc gat gag			1968
Val Phe Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Val Cys Leu Asp Glu			
	645	650	655
aag aga gaa tta ttc aag aaa gta aaa tac gcg aag caa ctc aat att			2016
Lys Arg Glu Leu Phe Lys Lys Val Lys Tyr Ala Lys Gln Leu Asn Ile			
	660	665	670
gag cgt aac atg			2028
Glu Arg Asn Met			
	675		

<210> 2
 <211> 676
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

5

<400> 2

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

10

Asp Met Glu Asn Ala Thr Ile Arg Thr Pro His Leu Met Glu Phe Leu
 290 295 300
 Arg Met Leu Thr Ile Tyr Thr Asp Trp Tyr Ser Val Gly Arg Asn Tyr
 305 310 315 320
 Tyr Trp Gly Gly His Arg Val Thr Ser Tyr Arg Val Gly Gly Glu Asn
 325 330 335
 Ile Thr Ser Pro Leu Tyr Gly Ser Glu Ala Asn Gln Glu Leu Pro Arg
 340 345 350
 Gln Leu Tyr Phe Tyr Gly Pro Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr
 355 360 365
 Leu Arg Tyr Leu Gln Gln Pro Ala Pro Ala Pro Pro Phe Ala Leu Arg
 370 375 380
 Arg Leu Glu Gly Val Glu Phe His Thr Thr Thr Gly Thr Asp Met Tyr
 385 390 395 400
 Arg Glu Arg Gly Ser Val Asp Ser Phe Asn Glu Leu Pro Pro Phe Asn
 405 410 415
 Pro Val Gly Leu Pro Arg Asn Ala Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala
 420 425 430
 Thr Phe Val Arg Lys Ser Gly Thr Pro Tyr Leu Ile Thr Gly Thr Val
 435 440 445
 Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Glu Glu Thr Asn Thr Ile Asp Ser
 450 455 460
 Asn Arg Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala Tyr Gln Ile Ser Ser
 465 470 475 480
 Gly Thr Thr Val Arg Arg Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu
 485 490 495
 Arg Arg Thr Gly Pro Gly Thr Phe Gly Asp Ile Lys Leu Asn Ile Asn
 500 505 510
 Ser Pro Leu Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr
 515 520 525
 Thr Asp Leu Gln Phe Phe Thr Asn Ile Asn Gly Thr Thr Ile Asn Met
 530 535 540
 Gly Asn Phe Pro Lys Thr Val Asn Asn Ser Ser Ser Glu Gly Tyr Arg
 545 550 555 560
 Thr Val Ser Phe Ser Thr Pro Phe Ser Phe Ser Asn Ala Gln Ser Ile
 565 570 575
 Phe Arg Leu Gly Ile Gln Ala Phe Ser Gly Val His Glu Ile His Val
 580 585 590
 Asp Arg Ile Glu Phe Val Pro Ala Glu Val Thr Phe Glu Ala Glu Tyr
 595 600 605
 Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr
 610 615 620
 Asn Pro Lys Asp Met Lys Thr Tyr Val Thr Glu Ser Gln Ile Asp Gln
 625 630 635 640
 Val Phe Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu Val Cys Leu Asp Glu
 645 650 655
 Lys Arg Glu Leu Phe Lys Lys Val Lys Tyr Ala Lys Gln Leu Asn Ile
 660 665 670
 Glu Arg Asn Met
 675

<210> 3
 <211> 2031
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica AXMI-150

<400> 3

5

10

ES 2 534 581 T3

```

atggaggaga ggagcatgaa cagcaatgaa catgactacc tcaaggtttg tgatgatctt 60
tcagaaacaa acatggagag atttgacaag aatgatgctc tggagattgg gatgagcadc 120
gtcagcgagc tgctggggat gatccccggc ggcgcccgcc tccagtttgt tttcaatcag 180
ctctggagca ggctgggaga ttctggatgg agcgcttca tggagcatgt ggaggagctg 240
atcgacacca agattgaagg atatgccaa aacaaggcgc tctcagagct ggctgggatg 300
cacaggaacc tggagacata catcaagctg ctgaatgaat gggagaacaa cactggaagc 360
tcaaaaagctc aaggaagggt ggccaactac tttgagagct tggagcaago tgtggagaga 420
gggatgccgc agttcgcggt cggcaacttc gagatcccgc tgctcacogt ctatgttcaa 480
gctgccaaac tccacctgct gctgctgaga gatgtttcag tttatggaaa aagatggggc 540
tggagcgacc agaagatcaa gatctactat gagaagcagg tgaagtacac ccatgagtac 600
accaaccact gctccacctg gtacaacaga gggctggaca agctgaagaa caaaggatca 660
agctaccaag attggtacaa ctacaacagg ttcagaaggg agatcacctt gacgggtgctg 720
gacatcgctg ccgtctttcc catttatgat gtcaaggcct accccatcca aactgttggc 780
cagctgacaa gggaggtgta cacagatcct ctcatcaact tcaaccccc a gctggacagc 840
gtcagccagc tgccaacctt ctcagacatg gagaatgcc a ccatcaggac gccgcacctg 900
atggagtctt tgaggatgct caccatctac actgattggg actctgttgg aaggaactac 960
tactggggag gccaccgctg caccagctac agggttggag gagaaaacat cacctcgccg 1020
ctctatggat cagaagcaaa ccagagctg cgcgggcagc tctacttcta tgggccgggtg 1080
ttcagaaccc tctctaatec aaccttgaga tatctccagc agccggcgcc gccgcccga 1140
tttgctctcc gccgcttga aggagtggag ttccacaaca ccaccggcac cgacatgtac 1200
agagaaagag gaagcgtgga ttcaatcaat gagctgcgc ccttaacccc tgttgggctg 1260
ccaagaaatg cctacagcca ccgcctctgc catgccacct tcgtgaggaa gagcggcacc 1320
ccctacctca tcaccggcac cgtgttcagc tggaccacc gctctgctga agaacaacac 1380
accatcgaca gcaacaggat caccagatc ccgctgggta agcctacca gatctcctca 1440
ggcaccaccg tccgcccggg ccctggcttc actggaggag acatcttgag aagaactgga 1500
cctggcacct tcggcgacat caagctcaac atcaactcgc cgctctccca aagatacagg 1560
gtgaggatca gatatgctt acaactgat cttcagttct tcaccaacat caatggcacc 1620
accatcaaca tgggcaactt cccaaaaact gtcaacaaca gcagctcaga aggctacagg 1680
acggtgagct tctccacccc cttctccttc agcaatgctc aaagcatctt ccgcctcggc 1740
atccaggcct tctccggcgt ccatgagatc catgtggaca ggattgaatt tgttctgct 1800
gaagtcacct ttgaagcaga atatgatctg gagagggcgc agaaggcgt caatgctctc 1860
ttcacctcaa caaaccccaa ggacatgaaa acatatgtca cagaaagcca gattgatcaa 1920
gttttcaacc tgggtggagt cctctctgat gaagtttctg tggatgagaa gagggagctg 1980
ttcaagaagg tgaatatgc caagcagctc aacatcgaga ggaacatgtg a 2031

```

<210> 4
 <211> 2031
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica AXMI-150

10

<400> 4

ES 2 534 581 T3

atggaggaga ggagcatgaa cagcaatgaa catgactacc tcaaggtttg tgatgatctt 60
 tcagaaacaa acatggagag atttgacaag aatgatgctc tggagattgg gatgagcatc 120
 gtcagcgagc tgctggggat gatccccggc ggccggccc tccagtttg tttcaatcag 180
 ctctggagca ggctgggaga ttctggatgg agcgccttca tggagcatgt ggaggagctg 240
 atcgacacca agattgaagg atatgccaag aacaaggcgc tctcagagct ggctgggatg 300
 cacaggaacc tggagacata catcaagctg ctgaatgaat gggagaacaa cactggaagc 360
 tcaaaaagctc aaggaagggg ggccaactac tttgagagct tggagcaagc tgtggagaga 420
 gggatgcccgc agttcgccgt cggcaacttc gagatcccgc tgetcaccgt ctatgttcaa 480
 gctgccaacc tccacctgct gctgctgaga gatgtttcag tttatggaaa aagatggggc 540
 tggagcgacc agaagatcaa gatctactat gagaagcagg tgaagtacac ccatgagtac 600
 accaaccact gctccacctg gtacaacaga gggctggaca agctgaagaa caaaggatca 660
 agctaccaag attggtacaa ctacaacagg ttcagaaggg agatcacctt gacggtgctg 720
 gacatcgctg ccgtctttcc tcattatgat gtcaaggcct accccatcca aactgttggc 780
 cagctgacaa gggaggtgta cacagatcct ctcatcaact tcaacccccca gctggacagc 840
 gtcagccagc tgccaacctt ctcaagatg gagaatgcca ccatcaggac gccgcacctg 900
 atggagtctc tgaggatgct caccatctac actgattggg actctgttgg aaggaactac 960
 tactggggag gccaccgctg caccagctac agggttggag gagaaaacat cacctcgccc 1020

ctctatggat cagaagcaaa ccaggagctg ccgcggcagc tctacttcta tgggcccgtg 1080
 ttcagaaccc tctctaatec aaccttgaga tatctccagc agccggcggc ggccggccca 1140
 tttgctctcc gccgcctgga aggagtggag ttccacacca ccaccggcac cgacatgtac 1200
 agagaaagag gaagcgtgga ttcatcaat gagctgccc ccttcaacc tgttgggctg 1260
 ccaagaaatg cctacagcca ccgcctctgc catgccacct tctgtaggaa gagcggcacc 1320
 ccctacctca tcaccggcac cgtgttcagc tggaccacc gctctgctga agaaacaaac 1380
 accatcgaca gcaacaggat caccagatc ccgctggtga aggctacca gatctcctca 1440
 ggcaccaccg tccgcccggg ccctggcttc actggaggag acatcttgag aagaactgga 1500
 cctggcacct tccgcgacat caagetcaac atcaactcgc cgctctcca aagatacagg 1560
 gtgaggatca gatatgcttc aacaactgat cttcagttct tcaccaacat caatggcacc 1620
 accatcaaca tgggcaactt cccaaaaact gtcaacaaca gcagctcaga aggctacagg 1680
 acggtgagct tctccacccc cttctccttc agcaatgctc aaagcatctt ccgcctcggc 1740
 atccaggcct tctccggcgt ccattgagatc catgtggaca ggattgaatt tgttctctgct 1800
 gaagtcacct ttgaagcaga atatgatctg gagagggcgc agaaggccgt caatgctcta 1860
 tttacctcaa caaaccccaa ggacatgaaa acatatgtca cagaaagcca gattgatcaa 1920
 gttttcaacc tgggtggagt cctctctgat gaagtttctg tggatgagaa gagggagctg 1980
 ttcaagaagg tgaatatatc caagcagctc aacatcgaga ggaacatgtg a 2031

<210> 5
 <211> 2028
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica AXMI-150

10

<400> 5

ES 2 534 581 T3

```

atggaggaga ggagcatgaa cagcaatgaa catgactacc tcaaggtttg tgatgatctt 60
tcagaaacaa acatggagag atttgacaag aatgatgctc tggagatttg gatgagcatc 120
gtcagcgagc tgctggggat gatccccgpc ggcgcgcgcc tccagtttgt tttcaatcag 180
ctctggagca ggctgggaga ttctggatgg agcgccttca tggagcatgt ggaggagctg 240
atcgacacca agattgaagg atatgccaa aacaaggcgc tctcagagct ggctgggatg 300
cacaggaacc tggagacata catcaagctg ctgaatgaat gggagaacaa cactggaagc 360
tcaaaagctc aaggaagggt ggccaactac tttgagagct tggagcaagc tgtggagaga 420
gggatgccgc agttcgccgt cggcaacttc gagatcccgc tgctcaccgt ctatgttcaa 480
gtgccaacc tocacctgct gctgctgaga gatgtttcag tttatggaaa aagatggggc 540
tggagcgacc agaagatcaa gatctactat gagaagcagg tgaagtacac ccatgagtac 600
accaaccact gctccacctg gtacaacaga gggctggaca agctgaagaa caaaggatca 660
agctaccaag attggtacaa ctacaacagg ttcagaaggg agatcacctt gacggtgctg 720
gacatcgctc ccgtctttcc tcattatgat gtcaaggcct accccatcca aactgttggc 780
cagctgacaa gggaggtgta cacagatcct ctcatcaact tcaacccccca gctggacagc 840
gtcagcagc tgccaacctt ctcagacatg gagaatgcca ccatcaggac gccgcacctg 900
atggagtctc tgaggatgct caccatctac actgattggt actctgttgg aaggaactac 960
tactggggag gccaccgctc caccagctac agggttggag gagaaaacat cacctcgccg 1020
ctctatggat cagaagcaaa ccaggagctg ccgcggcagc tctacttcta tgggcccggg 1080
ttcagaaccc tctctaattc aaccttgaga tatctccagc agccggcgcc ggcgcgcgca 1140
tttgctctcc gccgcctgga aggagtggag ttccacacca ccaccggcac cgacatgtac 1200
agagaaagag gaagcgtgga ttcattcaat gagctgccgc ctttcaacce tghtgggctg 1260
ccaagaaatg cctacagcca ccgcctctgc catgccacct tcgtgaggaa gagcggcacc 1320
ccctacctca tcaccggcac cgtgttcagc tggaccacc gctctgctga agaaacaaac 1380
accatcgaca gcaacaggat caccagatc ccgctggtga aggcctacca gatctcctca 1440
ggcaccaccg tccgcccggc ccctggcttc actggaggag acatcttgag aagaactgga 1500
cctggcacct tcggcgacat caagctcaac atcaactcgc cgctctccca aagatacagg 1560
gtgaggatca gatatgcttc aacaactgat cttcagttct tcaccaacat caatggcacc 1620
accatcaaca tgggcaactt cccaaaaact gtcaacaaca gcagctcaga aggctacagg 1680
acggtgagct tctccaccoc cttctccttc agcaatgctc aaagcatctt ccgcctcggc 1740
atccaggcct tctccggcgt ccatgagatc catgtggaca ggattgaatt tgttctctgt 1800
gaagtcacct ttgaagcaga atatgatctg gagagggcgc agaaggccgt caatgctctc 1860
ttcacctcaa caaaccccaa ggacatgaaa acatatgtca cagaaagcca gattgatcaa 1920
gttttcaacc tgggtggagt cctctctgat gaagtttctg tggatgagaa gagggagctg 1980
ttcaagaagg tgaaatatgc caagcagctc aacatcgaga ggaacatg 2028

```

<210> 6
 <211> 2028
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica AXMI-150

<400> 6

5

10

ES 2 534 581 T3

atggaggaga ggagcatgaa cagcaatgaa catgactacc tcaaggtttg tgatgatctt 60
 tcagaaacaa acatggagag atttgacaag aatgatgctc tggagattgg gatgagcadc 120
 gtcagcgagc tgctggggat gatccccggc ggcgcccgcc tccagtttgt tttcaatcag 180
 ctctggagca ggctgggaga ttctggatgg agcgccttca tggagcatgt ggaggagctg 240
 atcgacacca agattgaagg atatgccaa aacaaggcgc tctcagagct ggctgggatg 300
 cacaggaacc tggagacata catcaagctg ctgaatgaat gggagaacaa cactggaagc 360
 tcaaaagctc aaggaagggt ggccaactac tttgagagct tggagcaagc tgtggagaga 420
 gggatgccgc agttcgccgt cggcaacttc gagatcccgc tgctcaccgt ctatgttcaa 480
 gctgccaacc tccacctgct gctgctgaga gatgtttcag tttatggaaa aagatggggc 540
 tggagcgacc agaagatcaa gatttattat gaaaagcagg tgaagtacac ccatgagtac 600
 accaaccact gctccacctg gtacaacaga gggctggaca agctgaagaa caaaggatca 660
 agctaccaag attggtacaa ctacaacagg ttcagaagg agatcacctt gacggtgctg 720
 gacatcgctc ccgtctttcc tcattatgat gtcaaggcct accccatcca aactgttggc 780
 cagctgacaa gggaggtgta cacagatcct ctcatcaact tcaaccccc gctggacagc 840
 gtcagccagc tgccaacctt ctcagacatg gagaatgcca ccatcaggc gccgcacctg 900
 atggagttct tgaggatgct caccatctac actgattggt actctgttgg aaggaactac 960
 tactggggag gccaccgctt caccagctac agggttggag gagaaaacat cacctcgccg 1020
 ctctatggat cagaagcaaa ccaggagctg ccgcggcagc tctacttcta tgggcccgtg 1080
 ttcagaaccc tctctaattc aaccttgaga tatctccagc agccggcgcc ggcgcccgca 1140
 tttgctctcc gccgcctgga aggagtggag ttccacacca ccaccggcac cgacatgtac 1200
 agagaaagag gaagcgtgga ttcattcaat gagctgccgc ctttcaacc tgttgggctg 1260
 ccaagaaatg cctacagcca ccgctctgct catgccacct tegtgaggaa gagcgccacc 1320
 ccctacctca tcaccggcac cgtgttcagc tggaccacc gctctgctga agaaacaaac 1380
 accatcgaca gcaacaggat caccagatc ccgctggtga aggcctacca gatctcctca 1440
 ggcaccaccg tccgcccggc cctggcttc actggaggag acatcttgag aagaactgga 1500
 cctggcacct tcggcgacat caagctcaac atcaactcgc cgctctccca aagatacagg 1560
 gtgaggatca gatatgctt aacaactgat cttcagttct tcaccaacat caatggcacc 1620
 accatcaaca tgggcaactt cccaaaaact gtcaacaaca gcagctcaga aggtacagg 1680
 acggtgagct tctccacccc cttctccttc agcaatgctc aaagcatctt ccgctcggc 1740
 atccaggcct tctccggcgt ccatgagatc catgtggaca ggattgaatt tgttctctgt 1800
 gaagtccact ttgaagcaga atatgatctg gagagggcgc agaaggccgt caatgctctc 1860
 ttcacctcaa caaaccccaa ggacatgaaa acatatgtca cagaaagcca gattgatcaa 1920
 gttttcaacc tgggtggagt cctctctgat gaagtttget tggatgagaa gagggagctg 1980
 ttcaagaagg tgaaatatgc caagcagctc aacatcgaga ggaacatg 2028

<210> 7
 <211> 2028
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica AXMI-150

<400> 7

atggaggaga ggagcatgaa cagcaatgaa catgactacc tcaaggtttg tgatgatctt 60
 tcagaaacaa acatggagag atttgacaag aatgatgctc tggagattgg gatgagcadc 120
 gtcagcgagc tgctggggat gatccccggc ggcgcccgcc tccagtttgt tttcaatcag 180
 ctctggagca ggctgggaga ttctggatgg agcgccttca tggagcatgt ggaggagctg 240
 atcgacacca agattgaagg atatgccaa aacaaggcgc tctcagagct ggctgggatg 300
 cacaggaacc tggagacata catcaagctg ctgaatgaat gggagaacaa cactggaagc 360
 tcaaaagctc aaggaagggt ggccaactac tttgagagct tggagcaagc tgtggagaga 420

ES 2 534 581 T3

```

gggatgccgc agttcgccgt cggcaacttc gagatcccgc tgctcacctg ctatgttcaa 480
gctgccaacc tccacctgct gctgctgaga gatgtttcag tttatggaaa aagatggggc 540
tggagcgacc agaagatcaa gatctactat gagaagcagg tgaagtacac ccatgagtac 600
accaaccact gctccacctg gtacaacaga gggctggaca agctgaagaa caaaggatca 660
agctaccaag attggtacaa ctacaacagg ttcagaaggg agatcacctt gacggtgctg 720
gacatcgtcg ccgtctttcc tcattatgat gtcaaggcct accccatcca aactgttggc 780
cagctgacaa gggaggtgta cacagatcct ctcatcaact tcaaccccca gctggacagc 840
gtcagccagc tgccaacctt ctcagacatg gagaatgcca ccatcaggac gccgcacctg 900
atggagttct tgaggatgct caccatctac actgattggt actctgttgg aaggaactac 960
tactggggag gccaccgctg caccagctac agggttggag gagaaaacat cacctcgccg 1020
ctctatggat cagaagcaaa ccaggagctg ccgcggcagc tctacttcta tgggcccgtg 1080
ttcagaaccc tctctaatec aaccttgaga tatctccagc agccggcgcc ggcgcccgca 1140
tttgcctctc gccgcctgga aggagtggag ttccacacca ccaccggcac cgacatgtac 1200
agagaaagag gaagcgtgga ttcattcaat gagctgccgc ccttcaacct tgttgggctg 1260
ccaagaaatg cctacagcca ccgcctctgc catgccacct tcgtgaggaa gagcggcacc 1320
ccctacctca tcaccggcac cgtgttcagc tggaccacc gctctgctga agaaacaaac 1380
accatcgaca gcaacaggat caccagatc ccgctggtga aggcctacca gatctcctca 1440
ggcaccaccg tccgcccggc ccttggttc actggaggag acatcttgag aagaactgga 1500
cctggcacct tcggcgacat caagctcaac atcaactcgc cgctctccca aagatacagg 1560
gtgaggatca gatatgcttc aacaactgat ctccagttct tcaccaacat caatggcacc 1620
accatcaaca tgggcaactt cccaaaaact gtcaacaaca gcagctcaga aggctacagg 1680
acggtgagct tctccacccc cttctccttc agcaatgctc aaagcatctt ccgcctcggc 1740
atccaggcct tctccggcgt ccatgagatc catgtggaca ggattgaatt tgttcctgct 1800
gaagtccact ttgaagcaga atatgatctg gagagggcgc agaaggcctg caatgctcta 1860
tttacctcaa caaaccccaa ggacatgaaa acatatgtca cagaaagcca gattgatcaa 1920
gttttcaacc tgggtggagt cctctctgat gaagtttgct tggatgagaa gagggagctg 1980
ttcaagaagg tgaaatatgc caagcagctc aacatcgaga ggaacatg 2028

```

<210> 8

<211> 1806

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que codifica axmi-004

10

<400> 8

ES 2 534 581 T3

atgaacagca	aggagcatga	ctacctcaag	gtctgcaatg	atctttctga	tgccaacatc	60
aacatggaga	gatttgacaa	gaatgatgct	ctggagattg	ggatgagcat	cgctcagcgag	120
ctgattggga	tgatccctgg	aggcacggcg	ctgcaatttg	ttttcaatca	gctctggagc	180
aggctgggag	actcaggatg	gaatgccttc	atggagcatg	tggaggagct	catcgacacc	240
aagattgaag	gatatgcaa	gaacaaggcg	ctctccgagc	tggctggcat	ccagaggaa	300
ctggagacat	acatccagct	gagaaatgaa	tgggagaatg	acatcgagaa	cagcaaggct	360
caaggaaagg	tggccaacta	ctatgagagc	tgggagcaag	ctgtggagag	atcaatgccg	420
cagttcgccg	tggagaactt	cgaggtgccg	ctgctcaccg	tctatgttca	agctgccaac	480
ctccatctgc	tgctgctgag	agatgtttct	gtttatggaa	aatgctgggg	ctggagcgag	540
cagaagatca	agatttatta	tgataagcag	atcaagtaca	cccattgagta	caccaaccac	600
tgcgtcaact	ggtacaacaa	ggggctagag	aggctgaaga	acaaaggaag	cagctaccac	660
gattgggtaca	actacaacag	gttcagaagg	gagatgacct	tcaccgtgct	ggacattgtt	720
gctctcttcc	ctcattatga	tgttcaaaca	tatcccatca	ccactgttgc	tcagctgaca	780
agagaagtct	acacagatcc	tcttctcaac	ttcaatccaa	agctacattc	tgtttctcag	840
cttcttctct	tctctgacat	ggaaaatgca	accatcagga	cgctcattt	gatggagttc	900
ttgaggatgc	tcaccatcta	cacagattgg	tattcagttg	gaagaaacta	ctactgggga	960
ggacaccgcg	tcacaagcta	tcatgttggg	ggtgaaaaca	tcagatctcc	tctttatgga	1020
agagaagcaa	atcaagaagt	tccaagagat	ttctacttct	atggacctgt	gttcaaaaaca	1080
ttgagcaagc	caacattgag	gcctcttcag	cagccggcgc	cggcgcctcc	tttcaacttg	1140
agatcattgg	aaggagtgga	gttccacaca	ccaactggca	gcttcatgta	cagagaaaag	1200
ggatctgttg	acagcttcaa	tgagettcct	ccettcaatc	ctgttggcct	tcctcacaag	1260
gcttacagcc	accgcctctg	ccatgcaaca	tttgtgagga	agagcggcac	gccatatctc	1320
accaccggcg	ccatcttcag	ctggaccac	cgctcagcag	aagaaacaaa	caccattgaa	1380
agcaacatca	tcaccagat	tcctctggtg	aaggcctacc	aaattggaag	cgccaccacc	1440
gtcagaaaag	gacctggctt	cactggagga	gatattttga	gaagaactgg	acctggaaca	1500
tttgagagaca	tgaggatcaa	catcaatgct	cctctctctc	aaagatacag	ggtgaggatc	1560
agatatgctt	caacaactga	tcttcaattt	gtcacctcca	tcaatggcac	caccatcaac	1620
attggaaact	tcccaaaaac	catcaacaac	ctcaacaccc	ttggatcaga	aggatacag	1680
acagtgagct	tctccacccc	cttctccttc	agcaatgctc	aaagcatctt	cagattgggc	1740
atccaagcct	tctccggcgt	ccaagaagtt	tatgttgaca	agattgagtt	catccctgtg	1800
gaataa						1806

<210> 9

<211> 1806

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que codifica axmi-004

10

<400> 9

ES 2 534 581 T3

```

atgaactcca aggagcacga ctacctcaag gtgtgcaacg acctctctga cgccaacatc 60
aacatggagc gcttcgacaa gaacgacgcc ctcgagatcg gcatgtcaat cgtgtccgag 120
ctcatcggca tgatcccggg cggaaccgcc ctccagttcg tgttcaacca gctctggctc 180
cgcctcggcg actccggctg gaacgccttc atggagcacg tggaggagct catcgacacc 240
aagatcgagg gctacgctaa gaacaaggcc ctctcagagc tcgcccggcat ccagcgcaac 300
ctcgagacct acatccagct ccgcaacgag tgggagaacg acatagagaa ctccaaggcc 360
cagggcaagg tggccaacta ctacgagtc ctcgagcagg ccgtggagcg ctccatgccc 420
cagttcggcg tggagaactt cgaggtgccc ttactcacog tgtacgtgca agccgctaac 480
ctccacctoc tctcctccg cgacgtgtcc gtgtacggca agtgctgggg ctggctccgag 540
cagaagataa agatctacta cgacaagcag atcaagtaca cccacgagta caccaaccac 600
tgcgtgaact ggtacaacaa gggcctcgag cgcctcaaga acaagggtc atcctaccag 660
gactggtaca actacaaccg ctccgtagg gagatgacct tcaccgtgt cgacatcgtg 720
gccctcttcc cgcactacga cgtgcagacc tacccgatca ccaccgtggc ccagttaacc 780
cgcgaggtgt acaccgacc gctcctcaac ttcaaccoga agctccactc cgtgtcccag 840
ctcccgtcct tctccgacat ggagaacgcc accatccgca ccccgacct catggagttc 900
cttaggatgc tcaccatcta caccgactgg tactccgtgg gccgcaacta ctactggggc 960
ggccaccgag tgacctcata ccacgtgggc ggtgagaaca tccgctccc gctctaccg 1020
cgcgaggcca accaggagggt gccgcgcgac ttctacttct acggcccgtt gttcaagacc 1080
ctctccaagc cgaacctccg cccgctccag cagccggccc cggcccggcc gtttaacctc 1140
cgctccttag agggcgtgga gttccacacc ccgaccggct cattcatgta ccgcgagcgc 1200
ggctccgtag actccttcaa tgagctccc cggttcaacc cgggtggcct cccgcacaag 1260
gtgtactctc accgcctctg ccacgccacc ttcgtgcgca agtccggcac cccgtacctc 1320
accaccggcg ccattctctc ctggaccac cgtccgctg aggagaccaa caccatcgag 1380
tcaaacatca tcaccagat cccgctcgtg aaggcctacc agatcggctc cggcaccacc 1440
gtgcgcaagg gcccgggctt caccggcggc gacatcctcc gccgcaccgg cccgggcaacc 1500
ttcggcgaca tgcgcatcaa catcaacgcc ccgctctccc agcgtaccg cgtgcgcatc 1560
cgctacgcta gcaccacoga cctccagttc gtgacctcaa tcaacggcac caccatcaac 1620
atcggcaact tcccgaagac catcaacaac ctcaacacc tgggtccga gggctaccgc 1680
accgtgagct tctcaacccc gttctccttc tccaacgcc agtccatctt ccgctcggc 1740
atccaggcct tctccggcgt gcaagagggt tacgtggaca agattgagtt catcccggtg 1800
gagtga 1806

```

<210> 10

<211> 1743

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que codifica axmi-004

10

<400> 10

```

atggagcgtc tcgacaagaa cgacgccctc gagatcggca tgtcaatcgt gtccgagctc 60
atcggcatga tcccggcgcg caccgccctt cagttcgtgt tcaaccagct ctggctccgc 120
ctcggcgact ccggctggaa cgccttcatg gagcacgtgg aggagctcat cgacaccaag 180

```


ES 2 534 581 T3

```

atcgagggct acgctaagaa caaggccctc tcagagctcg ccggcatcca gcgcaacctc 240
gagacctaca tccagctccg caacgagtg gagaacgaca tagagaactc caaggcccag 300
ggcaaggtgg ccaactacta cgagtcctc gagcaggccg tggagcgctc catgccgcag 360
ttcgccgtgg agaacttoga ggtgocgta ctaccogtg acgtgcaagc cgctaacctc 420
cacctcctcc tctcccgga cgtgtccgtg tacggcaagt gctggggctg gtccgagcag 480
aagataaaga tctactacga caagcagatc aagtacaccc acgagtacac caaccactgc 540
gtgaactggt acaacaaggg cctcgagcgc ctcaagaaca agggctcatc ctaccaggac 600
tggtaacct acaaccgctt ccgtagggag atgaccctca ccgtgctoga catcgtggcc 660
ctcttcccgc actacgacgt gcagacctac ccgatcacca ccgtggccca gttaaccgcg 720
gaggtgtaca ccgaccogct cctcaacttc aaccogaagc tccactccgt gtcccagctc 780
ccgtccttct ccgacatgga gaaccacc atccgcaccc cgcacctcat ggagttcctt 840
aggatgctca ccatctacac cgactggtac tccgtgggcc gcaactacta ctggggcgcc 900
caccgcgtga cctcatacca cgtggcggtt gagaacatcc gctcccgcgt ctaccggcgc 960
gaggccaacc aggagtgcc gcgcgacttc tacttctacg gcccggtgtt caagaccctc 1020
tccaagccga ccctccgcc gctccagcag ccggccccgg ccccgccgtt taacctccgc 1080
tccttagagg gcgtggagtt ccacacccc accggctcat tcatgtaccg cgagcgcgcg 1140
tcogtagact ccttcaatga gctcccgcc ttcaaccogg tgggcctccc gcacaaggtg 1200
tactctcacc gcctctgcca cgccaccttc gtgogcaagt ccggcacccc gtacctcacc 1260
accggcgcca tttctcctg gaccacccg tcogctgagg agaccaacac catcgagtca 1320
aacatcatca occagatccc gctcgtgaag gcctaccaga tcggctccgg caccaccgtg 1380
cgcaagggcc cgggcttcac cggcggcgac atcctccgcc gcaccggccc gggcaccttc 1440
ggcgacatgc gcatcaacat caacgcccc ctctcccagc gctaccgctg gcgcatccgc 1500
tacgctagca ccaccgacct ccagttcgtg acctcaatca acggcaccac catcaacatc 1560
ggcaacttcc cgaagaccat caacaacctc aacaccctcg gctccgaggg ctaccgcacc 1620
gtgagcttct ccacccggt ctccttctcc aacgcccagt ccattctccg cctcggcatc 1680
caggccttct ccggcgtgca agaggtgtac gtggacaaga ttgagttcat cccggtggag 1740
tga 1743

```

<210> 11
 <211> 1890
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica axmi-004

10

<400> 11

ES 2 534 581 T3

```

atgagcgagc tgaagggcaa gttcaagaag agcaccaaca ggacctgctg cttgctgaag 60
atcatcaaca ttggaggaag agggatgaac agcaaggagc atgactacct caaggtgtgc 120
aacgacctct cagatgccaa catcaacatg gagagatttg acaagaatga tgctctggag 180
attgggatga gcatcgtctc cgagctgatt gggatgattc ctggagggac ggcgctgcaa 240
tttgtcttca atcagctgtg gtcaaggctg ggagattctg gatggaatgc cttcatggag 300
catgtggagg agctcatcga caccaagatt gaaggatatg ccaagaacaa ggcgctctca 360
gagctggccg gcatccagag gaacctggag acctacatcc agctgaggaa tgaatgggag 420
aatgacatcg agaacagcaa ggctcaaggc aaggtggcca actactacga gagcttggag 480
caagctggtg aaagatcaat gcctcaattt gctgtggaga acttogaggt gccgctgctc 540
accgtctatg ttcaagctgc caacctccac ctgctgctgc tgagagatgt ttcagtttat 600
ggaaaatgct ggggctggag cgagcagaag atcaagatct actacgacaa gcagatcaag 660
tacaccatg agtacaccaa ccaactgctc aactgggtaca acaaggggct ggagaggctg 720
aagaacaagg gctcaagcta ccaagattgg tacaactaca acaggttcag aagggagatg 780
acattgacgg tgctggacat cgtggcgtc ttcctcatt atgatgttca aacctacccc 840
atcaccaccg tggcgcagct gacaagagaa gtctacaccg acccgctgct aaacttcaac 900
cccaagctgc attctgtgag ccagctgccg agcttctccg acatggagaa tgccaccatc 960
aggacgccgc acctgatgga gttcttgagg atgctcacca tctacactga ttggtattct 1020
gttgaagga actactactg ggcggccac cgcgtcacct catatcatgt tgggtgtgag 1080
aacatccgct cgcgctcta tggaaagaaa gcaaatcaag aagttccaag agatttctac 1140
ttctatggac ctgtcttcaa gacctgtca aagccaacat tgaggccgct ccagcagccg 1200
gcgcccggcg cgcccttcaa cctgaggagc ttggaaggag ttgagttcca cacgccaact 1260
ggcagcttca tgtacagaga aagaggatca gtggacagct tcaacgagct gccgcccttc 1320
aacctggtg ggctgccga caaggtctac agccaccgcc tctgcatgc caccttctgt 1380
aggaagagcg gcacgccgta cctcaccacc ggcgccatct tctcatggac ccaccgctct 1440

gctgaagaaa ccaacacat cgagagcaac atcatcacc agatcccgct ggtgaaggcc 1500
taccagattg gatcaggcac cacogtgagg aaaggacctg gcttactgg aggagacatc 1560
ttgaggagga ctggacctgg aacatttggg gatcatgagga tcaacatcaa cgcgcccgctg 1620
agccaaagat acaggtgtg gatcagatat gcttcaacaa ctgatcttca atttgtgaca 1680
agcatcaatg gcaccacat caacatcggc aacttcccca agaccatcaa caacctcaac 1740
accttgggct cagaaggcta caggacggtg agcttctcca cgcccttcag cttcagcaat 1800
gctcaaagca tcttccgct cggcatccaa gccttctctg gagttcaaga agtttatgtg 1860
gacaagattg agttcatccc ggtggagtaa 1890

```

<210> 12
 <211> 1890
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintética que codifica axmi-004

10

<400> 12

ES 2 534 581 T3

```

atgagcgagc tgaagggcaa gttcaagaag agcaccaaca ggacatgctg cttgctgaag 60
atcatcaaca ttggaggaag aggaatgaac agcaaggagc atgactacct caaggtttgc 120
aatgatcttt cagatgccaa catcaacatg gaaagatttg acaagaatga tgctctggag 180
attgggatga gcatcgtctc cgagctgatt gggatgattc ctggaggaac ggcgctgcaa 240
tttgtcttca atcagctgtg gtcaaggcct ggagattctg gatggaatgc cttcatggag 300
catgtggagg agtcatcoga caccaagatt gaaggatatg ccaagaacaa ggcgctctca 360
gagctggctg gcatccaaag aaatttggag acctacatcc agctgagaaa tgaatgggaa 420
aatgacattg agaacagcaa ggctcaagga aagggtggcca actactatga gagcttggag 480
caagctgttg aaagatcaat gcctcaattt gctgtggaga acttcgaggt gccgctgctc 540
accgtctatg ttcaagctgc caacctccac ctgctgctgc tgagagatgt ttcagtttat 600
ggaaaatgct ggggatggag cgagcagaag atcaagatct actacgacaa gcagatcaag 660
tacctcatg agtacaccaa ccattgtgtc aactggtaca acaaaggact ggagaggctg 720
aagaacaaag gatcaagcta ccaagatttg tacaactaca acagattcag aagagagatg 780
acattgacag tgetggacat tgtggcgctc tttctctatt atgatgttca aacctacccc 840
atcaccacog tggcgagct gacaagagaa gtctacaccg acccgctgct aaacttcaac 900
cccaagctgc attctgtgag ccagctgcca tccttctcog acatggaaaa tgccaccatc 960
aggacgcccg acctgatgga gttcttgagg atgctcacca tctacactga ttggtattct 1020
gttggaaagaa actactactg gggcgccac cgcgtgacat catatcatgt tgggtgggaa 1080
aacatcagat cgccgctcta tggaaagaaa gcaaatcaag aagttccaag agatttctac 1140
ttctatggac ctgtcttcaa gacattgtca aagccaacat tgaggccgct ccagcagccg 1200
gcgccgcgcg cgccattcaa ctgaggagc ttggaaggag ttgagttcca cacaccaact 1260
ggcagcttca tgtacagaga aagaggatca gtggacagct tcaatgagct gccgccattc 1320
aacctgttg ggcttctca caaggtctac agccaccgcc tctgccatgc aaccttctg 1380
aggaagagcg gcacgccgta cctcaccacc ggcgcatct totcatggac ccaccgctct 1440
gctgaagaaa caaacacat cgagagcaac atcatcacc agatcccgt ggtgaaggcc 1500
taccaaatg gatcaggaac aacagtgagg aaaggacctg gcttactgg aggagacatc 1560
ttgagaagaa ctggacctgg aacatttggg gacatgagga tcaacatcaa cgcgccgctg 1620
agccaaagat acaggtgag gatcagatat gcttcaacaa ctgatcttca atttgtgaca 1680
agcatcaatg gcaccacat caacatcggc aacttcccc agaccatcaa caacctcaac 1740
accttgggct cagaaggcta caggacggtg agcttctcca cgccattcag cttctcaaat 1800
gctcaaagca tcttccgct cgccatccaa gccttctctg gagttcaaga agtttatgtg 1860
gacaagattg agttcatccc ggtggaataa 1890

```

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido dirigido al RE

10

<400> 13

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 14
 <211> 601
 <212> PRT
 <213> *Bacillus thuringiensis*

15

<400> 14

20

ES 2 534 581 T3

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

ES 2 534 581 T3

Leu Pro His Lys Val Tyr Ser His Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Val
 420 425 430
 Arg Lys Ser Gly Thr Pro Tyr Leu Thr Thr Gly Ala Ile Phe Ser Trp
 435 440 445
 Thr His Arg Ser Ala Glu Glu Thr Asn Thr Ile Glu Ser Asn Ile Ile
 450 455 460
 Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ala Tyr Gln Ile Gly Ser Gly Thr Thr
 465 470 475 480
 Val Arg Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr
 485 490 495
 Gly Pro Gly Thr Phe Gly Asp Met Arg Ile Asn Ile Asn Ala Pro Leu
 500 505 510
 Ser Gln Arg Tyr Arg Val Arg Ile Arg Tyr Ala Ser Thr Thr Asp Leu
 515 520 525
 Gln Phe Val Thr Ser Ile Asn Gly Thr Thr Ile Asn Ile Gly Asn Phe
 530 535 540
 Pro Lys Thr Ile Asn Asn Leu Asn Thr Leu Gly Ser Glu Gly Tyr Arg
 545 550 555 560
 Thr Val Ser Phe Ser Thr Pro Phe Ser Phe Ser Asn Ala Gln Ser Ile
 565 570 575
 Phe Arg Leu Gly Ile Gln Ala Phe Ser Gly Val Gln Glu Val Tyr Val
 580 585 590
 Asp Lys Ile Glu Phe Ile Pro Val Glu
 595 600

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1;
 b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
 c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2.
- 15 2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde dicha molécula de ácido nucleico está unida operativamente a un promotor que dirige la expresión de dicha molécula de ácido nucleico en una célula vegetal.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, donde dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia sintética que se ha diseñado para su expresión en una planta.
- 20 4. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, 2 o 3, preferentemente que comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.
5. Una célula huésped que contiene el vector de la reivindicación 4, que es preferentemente:
- 25 (a) una célula huésped bacteriana; o
 (b) una célula vegetal.
6. Una planta transgénica que comprende la célula huésped vegetal de la reivindicación 5, donde preferentemente dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, col, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, patata, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla oleaginosa.
- 30 7. Una semilla transgénica que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3.
8. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 3, 4, 5, 6 y 7.
- 35 9. Un polipéptido con actividad plaguicida, seleccionado del grupo que consiste en:
- 40 a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;
 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
 c) un polipéptido que está codificado por la SEC ID N°: 1,
- 45 preferentemente que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas.
10. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 9, donde:
- 50 (a) dicha composición se selecciona del grupo que consiste en un polvo, un polvo fino, una bolita, un gránulo, un aerosol, una emulsión, un coloide y una solución;
 (b) dicha composición se puede obtener mediante desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración de un cultivo de células bacterianas; o
 (c) dicha composición comprende del 1 % al 99 % en peso de dicho polipéptido.
- 55 11. Un método para controlar una población de plagas de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad plaguicidamente eficaz de un polipéptido de la reivindicación 9.
- 60 12. Un método para destruir una población de plagas de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros que comprende poner en contacto dicha plaga con, o alimentar a dicha plaga con, una cantidad plaguicidamente eficaz de un polipéptido de la reivindicación 9.
13. Un método para producir un polipéptido con actividad plaguicida, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 4 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.
- 65 14. Una planta que tiene incorporado establemente en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad plaguicida, donde dicha secuencia de

nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1;
b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2;

10 donde dicha secuencia de nucleótidos está unida operativamente a un promotor que dirige la expresión de una secuencia codificante en una célula vegetal.

15 15. Un método para proteger a una planta de una plaga, que comprende introducir en dicha planta o célula de la misma al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido plaguicida, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

- 20 a) la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°: 1;
b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2; y
c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 % con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, donde preferentemente dicha planta produce un polipéptido plaguicida que tiene actividad plaguicida contra una plaga de lepidópteros, coleópteros, nematodos o dípteros.