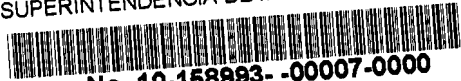


CASTELLANOS & Co.

Calle 94 A No.7A-09

Bogotá-Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-158993- -00007-0000

Fecha: 2013-07-17 14:24:09
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 523 RESPUESTA

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 64

Señor

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Desarrollo, Industria y Turismo

E.

S.

D.

Re.: Expediente No. **10.158.993**

Solicitud de Registro de Diseño Industrial para:

**AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 Y AXMI-184: PROTEINAS
INSECTICIDAS Y METODOS PARA SU USO**

Solicitante: **ATHENIX CORPORATION**

RESPUESTA A EXAMEN DE FONDO

Yo, **Margarita Castellanos Abondano**, obrando en mi calidad de apoderada de la sociedad solicitante de la solicitud de Patente de Invención citada en la referencia, en atención a su oficio No. **4316** notificado por fijación en lista el **05 de marzo de 2013**, estando dentro del término de prórroga solicitada el 30 de mayo de 2013, en los siguientes términos:

De la solicitud de patente

Su Despacho concluye que el pliego reivindicatorio de la presente solicitud de patente no cumple con las disposiciones de los artículos 14, 20, 21 y 30 de la Decisión 486. El Examinador señala lo siguiente:

- “El objeto de las reivindicaciones 6, 14-16, 18 y 19 no es patentable”.
- “La reivindicación 2 se define en términos de la aplicación de la molécula reclamada, es decir, en términos de la expresión de a secuencia de nucleótidos en una planta.”
- “Las reivindicación 4 no se encuentran claramente definida, ya que no define el casete de expresión por su estructura específica.”

Con el fin de atender las observaciones formuladas a este respecto, y de acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486, se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 13 reivindicaciones como sustituto del anteriormente presentado. De tal manera que, las objeciones formuladas a este respecto se deben tener por superadas de la siguiente manera:

Se ha redactado nuevamente el pliego reivindicatorio, de conformidad con las sugerencias del Señor Examinador con el fin de hacer claridad sobre la materia que se solicita proteger y el alcance de la misma.

En particular, el nuevo pliego reivindicatorio se enfoca en las SEQ ID NO: 3, 6, 15 y 16. La relación entre las secuencias SEQ ID NO: 3, 6, 15 y 16 se describe en la memoria descriptiva en la página 37, líneas 1 a 4, en donde se indica:

“En la presente se hace referencia a este nuevo gen como AXMI-115 (SEQ ID NO:3), y se hace referencia al aminoácido codificado como AXMI-115 (SEQ ID NO:6). Las secuencias sintéticas de nucleótidos que codifican el AXMI-115 se describen en la SEQ ID NO: 15 y 16.”

De esta forma, la nueva reivindicación 1 define la molécula de ácido nucleico aislada o recombinante reclamada, porque esta comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en:

- a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 11 ó 12, o un complemento de esta;
- b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14;
- d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, en donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
- e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14, en donde dicha variante es el

resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14; y

f) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con el complemento de la secuencia de nucleótidos de b) bajo condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas comprende la hibridación en 50% de formamida, 1M NaCl, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.1X SSC de 60 a 65 °C.

Por otro lado, las nuevas reivindicaciones 5 y 7, las cuales definen el casete de expresión y célula huésped según la presente invención, han sido modificadas siguiendo los comentarios del Señor Examinador y ahora mencionan la secuencia de nucleótidos que los definen.

Ahora bien, el Examinador objeta que la anterior reivindicación 5, correspondiente a la nueva reivindicación 6 no es clara ya que no define el polipéptido heterólogo. Sin embargo, llamamos la atención del Señor Examinador a las líneas 19 a 22 de la página 23 de la memoria descriptiva, donde claramente se indica que el término “heterólogo” se refiere a las secuencias de ácido nucleico que no son **endógenas a la célula o parte del genoma nativo** en el cual están presentes. De esta forma, esta sección de la memoria descriptiva sirve de soporte para la interpretación de la reivindicación, y por lo tanto se debe dar por superada la objeción.

Igualmente, deseamos aclarar que la reivindicación 8 reclama un polipéptido aislado, por lo que no repite la información dada en la reivindicación 1, la cual define una molécula de ácido nucleico.

Por último, se desea poner de presente que las anteriores reivindicaciones 9, 10, 11, 14 a 16 y 19 no han sido incluidas en el nuevo pliego reivindicatorio.

Memoria Descriptiva

Junto con el presente memorial se presenta una nueva copia de la memoria descriptiva, en la que se corrigen errores tipográficos y se restringe el alcance de acuerdo al nuevo pliego reivindicatorio.

Nivel Inventivo

Su Despacho concluye que los documentos D1 y D2 afectan el nivel inventivo de las reivindicaciones 1 a 19 de la presente solicitud. Su Despacho enuncia:

- “El efecto que logran las secuencias solicitadas en la reivindicación 1 sobre una proteína con actividad insecticida ya se conocía en el estado de la técnica cercana a la invención ya que los documentos D1 y D2 habían divulgado previamente tales secuencias, reportando específicamente su uso como proteína insecticida”.
- “Las características esencial de la molécula de ácido nucleico que se desea proteger en la reivindicación 1 habían sido divulgadas previamente en los documentos señalados, por lo cual la solicitud de la reivindicación 1 se considera obvia ya que las secuencias habían sido divulgadas previamente en los documentos D1 y D2 los cuales reportaron su uso insecticida”.

En cuanto a las objeciones del examinador deseamos poner de presente el artículo 18 de la Decisión 486:

*“**Artículo 18.-** Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica”.*

De conformidad con el anterior artículo, se exponen a continuación las razones por las cuales la presente invención posee nivel inventivo frente a las enseñanzas de los documentos citados D1 y D2:

La nueva reivindicación 1 reclama una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante enfocada a la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3 y 6 (favor referirse a los incisos b y d de la reivindicación 1). De acuerdo a la anterior modificación, la nueva reivindicación independiente 1 ya no hace referencia a las secuencia de nucleótidos que **tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 ó 4**, por lo que la presente solicitud y la anterioridad citada D1 no divulgan las mismas secuencias.

Por su parte, y como afirma el Señor Examinador en el oficio en cuestión, el documento D2 enseña moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden secuencias con 90% de similitud con la SEQ ID:5 y 70% de similitud con la SEQ ID NO:6. Sin embargo, el porcentaje de similitud enseñado con la SEQ ID NO:6 se encuentran muy por debajo de lo enseñado en la nueva reivindicación 1. Adicional a los porcentajes de identidad tan diferente, ninguna de las anterioridades citadas da indicio alguno sobre los posibles cambio a realizar en los amino ácidos para lograr la materia reivindica.

Ahora bien, para demostrar el efecto superior e inesperado de la invención de acuerdo a la presente solicitud frente a los documentos D1 y D2, llamamos la atención del Señor Examinador al ejemplo 9 de la memoria descriptiva, y especialmente a la tabla 1, la cual se presenta a continuación.

Tabla 1. Actividad insecticida de AXMI-115, AXMI-113 y AXMI-005*

	Axmi115 (pH 10,5)	Axmi115 (pH 8)	Axmi005 (pH10,5)	Axmi005 (pH 8)	Axmi113 (pH 10,5)
Hz	0	0	4	4	0
Infestación por ECB	2	4	0	0	0
Hv	0	0	4	4 /5	0
FAW	4	2	4/5	4/5	0
BCW	0	0	3/4	4	0
VBC	4	3	4	4/5	0
SWCB	4; 80% de mortalidad	3; 50% de mortalidad	2	ND	4; 20% de mortalidad
SCB	ND	3; 25% de mortalidad	ND	4; 100% de mortalidad	3; 50% de mortalidad
DBM	ND	2/3	0	0	0

* = representado como el porcentaje de atrofia y mortalidad donde la atrofia se califica de acuerdo con la escala que figura a continuación:

Como se puede concluir a partir de los datos anteriores, la AXMI-115 (por ejemplo, SEQ ID NO: 6) y la AXMI-113 (por ejemplo, SEQ ID NO: 5) presentan una actividad insecticida sorprendente. Por ejemplo, AXMI-115 demostró una actividad insecticida efectiva contra una amplia variedad de pestes, incluyendo el taladro europeo del maíz (ECB), palomilla del maíz (FAW), la oruga aterciopelada del frijol (VBC) y el barrenador del maíz del

sudoeste (SWCB). De igual manera, AXMI-113 también demostró una actividad insecticida efectiva frente a una gran variedad de pestes, incluyendo el barrenador del maíz del sudoeste (SWCB) y el barrenador del tallo (SCB)

En vista de lo anterior, no resulta obvio modificar las enseñanzas de D1 de acuerdo con las enseñanzas del documento D2 para que una persona versada en la materia logre alcanzar el resultado reclamado en la presente solicitud y así solucionar el problema técnico en cuestión, puesto que ninguno de los documentos citados enseña los porcentajes de identidad reclamados en el nuevo pliego reivindicatorio, o la escogencia específicas de los cambios en la secuencias que permiten lograr un efecto insecticida inesperado.

Por lo tanto, consideramos que la presente solicitud es inventiva sobre los documentos D1 y D2, toda vez que la molécula de ácido nucleico es diferente a aquellos previamente descritos en el estado del arte, y una persona medianamente versada en la materia tuvo que emplear habilidad inventiva para llegar a la solución técnica reivindicada. Dado lo anterior, consideramos que ninguna de las anterioridades citadas por el Examinador puede ser considerada una anterioridad válida capaz de afectar el nivel inventivo de la presente invención.

Anexos

Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por 13 reivindicaciones.
Memoria Descriptiva corregida.

Señor Director,


Margarita Castellanos Abondano

C.C. No. 39.779.654 de Usaquén

T.P.A. No. 70.819 de C.S.J.

Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá, D.C.

Tel.: 7560770

Bogotá D.C.
P2259

12 JUL. 2013

**AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 Y AXMI-184: PROTEÍNAS
INSECTICIDAS Y MÉTODOS PARA SU USO**

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la biología molecular. En la presente se proporcionan nuevos genes que codifican proteínas insecticidas. Estas proteínas y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican son útiles para preparar formulaciones insecticidas y para la producción de plantas transgénicas resistentes a los insectos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La *Bacillus thuringiensis* es una es una espora Gram positiva que forma las bacterias del suelo, caracterizada por su capacidad de producir inclusiones cristalinas que son específicamente tóxicas para ciertos órdenes y especies de insectos, pero que son inofensivas para las plantas y otros organismos que no constituyen su objetivo. Por esta razón, las composiciones que incluyen cepas de *Bacillus thuringiensis* o sus proteínas insecticidas pueden utilizarse como insecticidas ecológicamente aceptables para controlar plagas de insectos agrícolas e insectos vectores para una variedad de enfermedades humanas o animales.

Las proteínas cristalinas (Cry) (delta-endotoxinas) de *Bacillus thuringiensis* tienen una poderosa actividad insecticida predominantemente contra larvas lepidópteras, dípteras y coleópteras. Estas proteínas también han mostrado actividad contra los órdenes de plaga *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga* y *Acari*, así como también otros órdenes de invertebrados como *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes* y *Sarcomastigophora* (Feitelson (1993) "The *Bacillus Thuringiensis* family tree". En *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.). Estas proteínas se clasificaron originariamente como CryI a CryV basándose principalmente en su actividad insecticida. Las clases principales fueron *Lepidoptera*-específica (I), *Lepidoptera*- y *Diptera*-específica (II), *Coleoptera*-específica (III), *Diptera*-específica (IV) y nemátodo-específica (V) y (VI). Las proteínas se clasificaron además en subfamilias; a las proteínas más relacionadas dentro de cada familia se les asignaron letras divisionales como *Cry1A*, *Cry1B*, *Cry1C*, etc. A las proteínas mucho más

relacionadas dentro de cada división se les dieron los nombres *Cry1C1*, *Cry1C2*, etc.

Recientemente se ha descrito una nueva nomenclatura para los genes Cry basada en la homología de las secuencias de aminoácidos en lugar de 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 nombre único que incluye una primera categoría (un número arábigo), una segunda categoría (una letra mayúscula), una tercera categoría (una letra minúscula) y una cuarta categoría (otro número arábigo). En la nueva clasificación, se cambiaron los números romanos por números arábigos en la primera categoría. Las proteínas que presentan una identidad de secuencia menor al 45% tienen diferentes categorías primarias y los criterios para las segundas y terceras categorías son el 78% y 95% respectivamente.

La proteína cristalina no muestra actividad insecticida hasta que se ingiere y se solubiliza en el intestino medio del insecto. La prototoxina ingerida se hidroliza en proteasas en el tracto digestivo del insecto a una molécula tóxica activa. (Höfte y Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). Esta toxina se une a los receptores apicales con borde en cepillo en el intestino medio de la larva diana y se inserta en la membrana apical creando canales o poros de iones, lo que produce la muerte de la larva.

Las delta-endotoxinas generalmente tienen cinco dominios de secuencia conservados y tres dominios estructurales conservados (ver, por ejemplo Maagd *et al.* (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). El primer dominio estructural conservado consiste en siete hélices alfa y participa en la inserción en la membrana y en la formación de poros. El dominio II consiste en tres hojas beta dispuestas en una configuración “greca” y el dominio III consiste en dos hojas beta antiparalelas en formación “arrollada” (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Los dominios II y III participan en el reconocimiento y unión de receptores y se consideran por tanto determinantes de la especificidad de la toxina.

Además de las delta-endotoxinas, existen varias clases conocidas de toxinas de proteínas pesticidas. Las toxinas VIP1/VIP2 (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,770,696) son toxinas pesticidas binarias que muestran una fuerte actividad sobre los insectos mediante un mecanismo que se cree implica una endocitosis mediada por receptores seguida de toxificación celular, de forma similar al modo de acción de otras toxinas binarias (“A/B”). Las toxinas A/B como VIP, C2, CDT, CST o el edema *B. anthracis* y toxinas letales en

un principio interactúan con células diana mediante un enlace específico mediado por receptores de los componentes "B" como monómeros. Estos monómeros después forman homoheptámeros. El complejo heptámero-receptor "B" después actúa como una plataforma de anclaje que se une posteriormente y permite el desplazamiento de un componente(s) "A" enzimático al citosol a través de una endocitosis mediada por receptores. Una vez dentro del citosol de la célula, los componentes "A" inhiben la función normal de las células mediante, por ejemplo, la ribosilación del ADP de la G-actina o el aumento de los niveles intracelulares de AMP (AMPc). Ver Barth *et al.* (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* 68:373--402.

El uso intenso de insecticidas basados en *B. thuringiensis* ya ha suscitado la resistencia en las poblaciones de campo de la polilla de crucíferas *Plutella xylostella* (Ferré y Van Rie (2002) *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533). El mecanismo más común de resistencia es la reducción de enlaces de la toxina a sus receptores específicos del intestino medio. Esto también puede conferir resistencia cruzada a otras toxinas que comparten el mismo receptor (Ferré y Van Rie (2002)).

SUMARIO DE LA INVENCION

Se proporcionan composiciones y métodos para conferirle resistencia a insectos a las bacterias, plantas, células de plantas, tejidos y semillas. Las composiciones incluyen moléculas de ácidos nucleicos que codifican secuencias para polipéptidos de delta-endotoxinas, vectores que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos y células huésped que comprenden los vectores. Las composiciones también incluyen las secuencias de polipéptidos de la endotoxina y anticuerpos de dichos polipéptidos. Las secuencias de nucleótidos pueden utilizarse en las construcciones de ADN o casetes para la transformación y expresión en organismos, que incluyen microorganismos y plantas. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden ser secuencias sintéticas que se diseñaron para la expresión en un organismo que incluye, a modo no taxativo, un microorganismo o una planta. Las composiciones también comprenden bacterias, plantas, células de plantas, tejidos y semillas transformados.

En particular, se proporcionan las moléculas aisladas de ácidos nucleicos que corresponden a las secuencias de ácidos nucleicos de delta-endotoxinas. Además, se encuentran comprendidas las secuencias de aminoácidos que corresponden a los polinucleótidos. En particular, la presente invención proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una

secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, o una secuencia de nucleótidos descrita en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12, así como sus variantes y fragmentos. También están incluidas las secuencias de nucleótidos que complementan a una secuencia de nucleótidos de la invención o que se hibridan a una secuencia de la invención.

Las composiciones y métodos de la invención son útiles para la producción de organismos con resistencia a insecticida, específicamente bacterias y plantas. Estos organismos y composiciones derivados de estos son deseables para uso agrícola. Las composiciones de la invención también son útiles para generar proteínas de delta-endotoxina alteradas o mejoradas que tienen actividad insecticida o para detectar la presencia de proteínas delta-endotoxina o ácidos nucleicos en productos u organismos.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A y 1B muestran un alineamiento de AXMI-113 (SEQ ID NO:5), AXMI-005 (SEQ ID NO: 4) y AXMI-115 (SEQ ID NO:6). Las flechas a la derecha y a la izquierda marcan los límites de la región C-terminal 1/3^{ra} de las proteínas.

La figura 2 describe los dominios dentro de AXMI-005 y AXMI-115 que se intercambian para generar nuevas toxinas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para regular la resistencia a insectos en organismos, especialmente plantas o células de plantas. Los métodos implican transformar organismos con una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína delta-endotoxina de la invención. En particular, las secuencias de nucleótidos de la invención son útiles para preparar plantas y microorganismos que tienen actividad insecticida. De este modo, se proporcionan bacterias, plantas, células de plantas, tejidos de plantas y semillas transformados. Las composiciones son ácidos nucleicos y proteínas delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Las secuencias se utilizan en la construcción de vectores de expresión para su posterior transformación en organismos de interés, como sondas para la aislación de otros genes de delta-endotoxina y para la generación de proteínas insecticidas alteradas mediante métodos conocidos en la técnica, como el intercambio de dominio o transposición de ADN. Ver, por ejemplo, la tabla 2 y figura 2. Las proteínas se utilizan para controlar o matar lepidópteros,

coleópteros y otras poblaciones de insectos y para producir composiciones con actividad insecticida.

El término “delta-endotoxina” significa una toxina de *Bacillus thuringiensis* que tiene actividad tóxica contra una o más plagas, que incluyen, a modo no taxativo, miembros de los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* o una proteína que presenta homología con dicha proteína. En algunos casos, las proteínas delta-endotoxina se aislaron de otros organismos, que incluyen *Clostridium bifermentans* y *Paenibacillus popilliae*. Las proteínas delta-endotoxinas incluyen secuencias de aminoácidos que se deducen de las secuencias de nucleótidos en toda su longitud descritas en la presente y las secuencias de aminoácidos que son más cortas que las secuencias de longitud completa, ya sea debido al uso de un sitio de partida corriente abajo alternativo o debido al procesamiento que produce una proteína más corta que tiene actividad insecticida. El procesamiento puede ocurrir en el organismo en que la proteína se expresa, o en la plaga después de la ingestión de la proteína.

Las delta-endotoxinas incluyen 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 variedad de especificidades y toxicidades. Para una lista completa ver Crickmore *et al.* (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813, y para actualizaciones periódicas ver Crickmore *et al.* (2003) “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature,” en www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.

En la presente se proporcionan nuevas secuencias de nucleótidos aisladas que confieren actividad insecticida. También se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las proteínas delta-endotoxinas. La proteína que resulta de la traducción de este gen permite que las células controlen o maten a los insectos que las ingieren.

Moléculas de ácidos nucleicos aisladas y sus variantes y fragmentos

Un aspecto de la invención se relaciona con moléculas de ácidos nucleicos aisladas o recombinantes que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas delta-endotoxinas y polipéptidos o sus porciones biológicamente activas, así como las moléculas de ácidos nucleicos suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar las delta-endotoxinas que codifican los ácidos nucleicos. Como se utiliza en la presente, el término “molécula de ácido nucleico” pretende incluir las moléculas de ADN (por ejemplo, ADN

recombinante, ADNc o ADN genómico) y las moléculas de ARN (por ejemplo ARNm) y análogos del ADN o ARN generados mediante el uso de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena simple o de cadena doble, pero preferentemente es ADN de cadena doble.

- 5 Una molécula o proteína de ácido nucleico “aislada” o “purificada”, o su porción biológicamente activa, se encuentran sustancialmente libres de otros materiales celulares, o medios de cultivo cuando se producen mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libres de precursores químicos u otros químicos cuando se sintetizan químicamente. Preferentemente, un ácido nucleico “aislado”
- 10 se encuentra libre de secuencias (preferentemente secuencias que codifican proteínas) que naturalmente flanquean el ácido nucleico (es decir, secuencias ubicadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual se deriva el ácido nucleico. A los efectos de la invención, cuando se utiliza “aislado” para referirse a moléculas de ácido nucleico se excluye
- 15 a los cromosomas aislados. Por ejemplo, en varias realizaciones, la delta-endotoxina aislada que codifica a la molécula de ácido nucleico puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb ó 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que flanquean naturalmente a la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual se deriva el ácido nucleico.
- 20 Una proteína delta-endotoxina que se encuentra sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteínas que tienen menos de aproximadamente un 30%, 20%, 10% ó 5% (en peso seco) de proteína no delta-endotoxina (también referida en la presente como “proteína contaminante”).

- 25 Las secuencias de nucleótidos que codifican a las proteínas de la presente invención incluyen la secuencia señalada en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11, ó 12, y sus variantes, fragmentos y complementos. El término “complemento” significa una secuencia de nucleótidos que complementa de forma suficiente a una secuencia de nucleótidos dada de forma tal que se puede hibridar a la secuencia de nucleótidos dada para así formar un dúplex estable. La secuencia de
- 30 aminoácidos correspondiente para la proteína delta-endotoxina codificada por esta secuencia de nucleótidos se señala en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14.

- 35 La moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de estas delta-endotoxinas que codifican secuencias de nucleótidos también se encuentran comprendidas en la presente invención. El término “fragmento” significa una porción de secuencia de nucleótidos que codifica una proteína delta-endotoxina. Un fragmento de una secuencia de nucleótidos puede codificar una porción

biológicamente activa de una proteína delta-endotoxina, o puede ser un fragmento que puede utilizarse como sonda de hibridación o cebador PCR mediante el uso de los métodos descritos a continuación. Las moléculas de ácidos nucleicos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos de delta-endotoxina comprenden al menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950, 2000, 2050, 2100, 2150, 2200, 2250, 2300, 2350, 2400, 2450, 2500, 2550, 2600, 2650, 2700, 2750, 2800, 2850, 2900, 2950, 3000, 3050, 3100, 3150, 3200, 3250, 3300, 3350 nucleótidos contiguos o hasta el número de nucleótidos presentes en una delta-endotoxina de longitud completa que codifica las secuencias de nucleótidos divulgadas en la presente en función del uso deseado. El término nucleótidos "contiguos" significa residuos de nucleótidos que son inmediatamente contiguos el uno del otro. Los fragmentos de las secuencias de nucleótidos de la presente invención codificarán los fragmentos de proteína que retienen la actividad biológica de la proteína delta-endotoxina y, por lo tanto, retienen la actividad insecticida. La expresión "retiene la actividad" significa que el fragmento tendrá al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 70%, 80%, 90%, 95% o mayor, de la actividad insecticida de la proteína delta-endotoxina. Los métodos para medir la actividad insecticida son muy conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Czapla 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 los Estados Unidos No. 5.743.477, que se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Un fragmento de una delta-endotoxina que codifica una secuencia de nucleótidos 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, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína delta-endotoxina de longitud completa de la invención.

Las proteínas delta-endotoxinas preferidas de la presente invención se codifican mediante una secuencia de nucleótidos suficientemente idéntica a la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12. La expresión "suficientemente idéntica" significa una secuencia de aminoácidos o nucleótidos que tiene al menos un 60% ó 65% de identidad de secuencia, aproximadamente

un 70% ó 75% de identidad de secuencia, aproximadamente un 80% ó 85% de identidad de secuencia, aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia que utiliza uno de los programas de alineación descritos en la presente mediante el uso de parámetros estándar. Un entendido en la técnica reconocerá que estos valores pueden ajustarse de forma apropiada para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento de los marcos de lectura y similares.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean a los efectos de una 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, superposición de posiciones) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud. En otra realización, la comparación se realiza a lo largo de la totalidad de la secuencia de referencia (por ejemplo, a lo largo de la totalidad de una de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12, o a lo largo de la totalidad de una de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14). El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse utilizando técnicas similares a las que se describen a continuación, con o sin permitir espacios. En el cálculo del porcentaje de identidad, generalmente se cuentan las coincidencias exactas.

Determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse mediante el uso de algoritmos matemáticos. Un ejemplo no restrictivo de algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. Las búsquedas de nucleótidos de BLAST pueden realizarse con el programa BLASTN, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de tipo delta-endotoxina de la invención. Las búsquedas de la proteína BLAST pueden realizarse con el programa BLASTX, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína delta-endotoxina de la invención. Para obtener alineaciones con huecos a los efectos de la comparación, se puede emplear el BLAST con huecos (en BLAST

2.0) como se describe en Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. De manera alternativa, se puede emplear el PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones lejanas entre las moléculas. Ver Altschul *et al.* (1997) *supra*. Cuando se utilizan los programas BLAST, BLAST con huecos, y PSI-Blast, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTX y BLASTIN). La alineación también puede realizarse manualmente mediante inspección.

Otro ejemplo no restrictivo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). El ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o ADN, y de ese modo puede proporcionar datos sobre la conservación de la secuencia de la totalidad de la secuencia de aminoácidos. El algoritmo ClustalW se utiliza en varios paquetes de software de análisis de ADN/aminoácidos disponibles comercialmente, como el módulo ALIGNX del programa vector NTI (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de la alineación de las secuencias de aminoácidos con ClustalW, puede evaluarse el porcentaje de identidad de aminoácidos. Un ejemplo no restrictivo de un software útil para el análisis de las alineaciones de ClustalW es el GENEDOC™. El GENEDOC™ (Karl Nicholas) permite la evaluación de la similitud o identidad de los aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no restrictivo de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Dicho algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del paquete de software GCG Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible por Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, EE.UU). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede emplearse una tabla PAM120 sobre peso de restos, una penalización por longitud de espacio 12, y una penalización por espacio de 4.

A menos que se indique lo contrario, el GAP versión 10, que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, se empleará para determinar la identidad o similitud de secuencias mediante el uso de los parámetros que se mencionan a continuación: El % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos mediante el uso de un peso GAP de 50 y un peso de longitud de 3, y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; el % de identidad y % de similitud para una secuencia de aminoácidos mediante el uso de un peso GAP de 8 y un peso de longitud de 2, y el programa de puntuación

BLOSUM62. También pueden utilizarse programas equivalentes. El término “programa equivalente” significa cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualesquiera en cuestión, genera un alineamiento que tiene emparejamientos de restos de nucleótidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se lo compara con el alineamiento correspondiente generado por GAP Versión 10. La invención también comprende variantes de moléculas de ácidos nucleicos. Las “variantes” de delta-endotoxinas que codifican secuencias de nucleótidos incluyen aquellas secuencias que codifican las proteínas delta-endotoxinas descritas en la presente pero que difieren de forma conservadora debido a la degeneración del código genético así como aquellas que son suficientemente idénticas como se describe anteriormente. Las variantes alélicas que ocurren de forma natural pueden identificarse mediante el uso de técnicas de biología molecular conocidas, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación como se explica a continuación.

Las variantes de secuencias de nucleótidos incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente que se generaron, por ejemplo, mediante el uso de mutagénesis dirigida al sitio que aún codifica las proteínas delta-endotoxinas descritas en la presente invención como se plantea a continuación. Las variantes de proteínas comprendidas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan teniendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, retienen la actividad insecticida. La expresión “retiene la actividad” significa que la variante tendrá al menos aproximadamente un 30%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 80% de la actividad insecticida de la proteína nativa. Los métodos para medir la actividad insecticida son muy conocidos en la técnica. Ver, 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 los Estados Unidos No. 5,743,477, todos los cuales se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad.

El entendido en la técnica apreciará además que se pueden introducir cambios mediante mutación de las secuencias de nucleótidos de la invención lo que conduce a cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas delta-endotoxinas codificadas, sin alterar la actividad biológica de las proteínas. Por lo tanto, las variantes de moléculas de ácidos nucleicos aisladas pueden crearse mediante la introducción de una o más sustituciones adiciones o eliminaciones de nucleótidos, en la secuencia de nucleótidos correspondiente descrita en la

presente, de forma tal que se pueden introducir una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos en la proteína codificada. Las mutaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar, como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Tales variantes de secuencias de nucleótidos
5 también se encuentran comprendidas por la presente invención.

Por ejemplo, las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden realizarse en uno o más residuos previstos de aminoácidos no esenciales. Un residuo de aminoácidos “no esencial” es un residuo que puede alterarse de la secuencia de tipo salvaje de una proteína delta-endotoxina sin alterar la actividad
10 biológica, mientras que un residuo de aminoácidos “esencial” se requiere para la actividad biológica. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es aquella en la que el residuo de aminoácidos se reemplaza con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias
15 incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, aspargina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano),
20 cadenas laterales ramificadas beta (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 (ver, por ejemplo Maagd
25 *et al.* (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). El primer dominio estructural conservado consiste en siete hélices alfa y participa en la inserción en la membrana y en la formación de poros. El dominio II consiste en tres hojas beta dispuestas en una configuración “greca” y el dominio III consiste en dos hojas beta antiparalelas en formación “arrollada” (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Los dominios
30 II y III participan en el reconocimiento y unión de receptores y se consideran por tanto determinantes de la especificidad de la toxina.

Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse en regiones no conservadas que retienen la función. En general, dichas sustituciones no se realizan para residuos de aminoácidos conservados ni para residuos de
35 aminoácidos que se encuentran en una forma conservada, donde dichos residuos son esenciales para la actividad de la proteína. Los ejemplos de residuos

conservados que pueden ser esenciales para la actividad proteica incluyen, por ejemplo, residuos que son idénticos entre todas las proteínas contenidas en una alineación de las secuencias de aminoácidos de la presente invención y secuencias conocidas de delta-endotoxinas. Los ejemplos de residuos
5 conservados pero que pueden permitir sustituciones conservadoras de aminoácidos y aún retener la actividad incluyen, por ejemplo, residuos que tienen únicamente sustituciones conservadoras entre todas las proteínas contenidas en una alineación de las secuencias de aminoácidos de la presente invención y secuencias conocidas de delta-endotoxinas. Sin embargo, un entendido en la
10 técnica podrá entender que las variantes funcionales pueden presentar alteraciones menores conservadas o no conservadas en los residuos conservados.

De manera alternativa, las variantes de secuencias de nucleótidos pueden realizarse mediante la introducción de mutaciones de forma aleatoria a lo largo de
15 toda o parte de la secuencia de codificación, como mediante mutagénesis por saturación y los mutantes resultantes pueden detectarse por su habilidad para conferir actividad de delta-endotoxina con el fin de identificar los mutantes que retienen la actividad. Después de la mutagénesis, la proteína codificada puede expresarse de forma recombinante y la actividad de la proteína puede
20 determinarse utilizando técnicas de ensayo estándar.

Mediante el uso de el uso de métodos como PCR, hibridación y similares se pueden identificar las secuencias de delta-endotoxinas correspondientes que se identifican sustancialmente con las secuencias de la invención. Ver, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring
25 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 la delta-endotoxina puede utilizarse para detectar ADNc o bibliotecas genómicas. Los métodos para la construcción de dicho ADNc y bibliotecas
30 genómicas son generalmente conocidos en la técnica y se describen en Sambrook y Russell, 2001, *supra*. Las llamadas 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 como ^{32}P , o cualquier otro marcador detectable, como otros radioisótopos, un compuesto
35 fluorescente, una enzima, o un co-factor enzimático. Las sondas para hibridación pueden prepararse mediante el marcado de oligonucleótidos sintéticos basados en

la secuencia conocida de nucleótidos que codifica delta-endotoxinas descrita en la presente. Además pueden utilizarse los cebadores degenerados diseñados con base en nucleótidos conservados o residuos de aminoácidos en la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos codificada. La sonda en general
5 comprende una región de secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a al menos aproximadamente 12, a al menos aproximadamente 25, a al menos aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 ó 400 nucleótidos consecutivos de delta-endotoxina que codifican una secuencia de nucleótidos de la invención o su fragmento o variante. Los métodos para la
10 preparación de sondas para hibridación son generalmente conocidos en la técnica y se describen en Sambrook y Russell, 2001, anteriormente incorporados como referencia en la presente.

Por ejemplo, una secuencia completa de delta-endotoxinas descrita en la presente, o una o más porciones de esta, puede utilizarse como sonda capaz de
15 hibridar específicamente a secuencias de tipo delta-endotoxina correspondientes y ARNs mensajero. Para alcanzar la hibridación específica en una variedad de condiciones, dichas sondas incluyen secuencias que son únicas y tienen preferentemente al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud o al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. Dichas sondas pueden
20 utilizarse para amplificar las secuencias de delta-endotoxinas correspondientes de un organismo elegido mediante PCR. Esta técnica puede emplearse para aislar secuencias de codificación adicionales de un organismo deseado o como un ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de secuencias de codificación en un organismo. Las técnicas de hibridación incluyen detección de hibridación de
25 bibliotecas de ADN en placas (ya sea placas o colonias; ver, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

La hibridación de dichas secuencias puede llevarse a cabo en condiciones rigurosas. La expresión “condiciones rigurosas” o “condiciones de hibridación
30 rigurosas” significa las condiciones en las cuales una sonda se hibridará a su secuencia diana en un grado mayor que a sus otras secuencias (por ejemplo, al menos dos veces por encima del fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en función de las circunstancias. Mediante el control del rigor en la hibridación y/o condiciones de lavado, pueden identificarse
35 las secuencias diana que son un 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo). De manera alternativa, las condiciones rigurosas pueden ajustarse

para permitir algunos emparejamientos erróneos en las secuencias para que puedan detectarse grados menores de similitud (sondeo heterólogo). Generalmente, la sonda tiene menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, preferentemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

5 Generalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las cuales la concentración de sal es menor que aproximadamente un ión Na 1,5 M, generalmente aproximadamente de concentración de ión Na 0,01 a 1,0 M (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos
10 aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, con más de 50 nucleótidos). Las condiciones rigurosas también pueden alcanzarse con la adición de agentes desestabilizadores como formamida. Los ejemplos de condiciones moderadamente rigurosas incluyen la hibridación con una solución amortiguadora de un 30% a un 35% de formamida, NaCl 1M, un 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio) a 37 °C y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = NaCl 3,0 M/ citrato trisódico 0,3 M) a 50 a 55 °C. Los ejemplos de condiciones moderadamente
15 rigurosas incluyen la hibridación en un 40 a un 45% de formamida, NaCl 1,0 M , 1% SDS a 37 °C, y un lavado en 0,5X a 1X SSC a 55 a 60 °C. Los ejemplos de condiciones de rigor elevado incluyen la hibridación en un 50% de formamida,
20 NaCl 1,0 M , 1% de SDS a 37 °C, y un lavado en 0,1X SSC a 60 a 65 °C. Opcionalmente, los tampones de lavado pueden comprender aproximadamente de un 0,1% a aproximadamente un 1% de SDS. La duración de la hibridación es generalmente menor a 24 horas, habitualmente de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 horas.

25 La especificidad es generalmente la función de los lavados post-hibridación, los factores críticos son la fuerza iónica y la temperatura de la solución final de lavado. Para los híbridos de ADN-ADN, el T_f puede aproximarse a la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_f = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log M) + 0,41 (\%GC) - 0,61 (\% \text{ form.}) - 500/L$; donde M es la molaridad de los cationes
30 monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form. es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_f es la temperatura (en condiciones de fuerza iónica y pH definidas) a la cual el 50% de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. La T_f se
35 reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de emparejamiento erróneo; de este modo, la T_f , la hibridación, y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse

para que hibriden con las secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se desean secuencias con una identidad $\geq 90\%$, la T_f puede disminuirse 10°C . Generalmente, se seleccionan las condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_f) para la
5 secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y un pH definidos. No obstante, en condiciones de rigor elevado puede utilizarse una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 ó 4°C menos que el punto de fusión térmica (T_f); en condiciones moderadamente rigurosas puede utilizarse una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 ó 10°C menos que el punto de fusión térmico (T_f); en condiciones moderadamente
10 rigurosas puede utilizarse una hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 ó 20°C menos que el punto de fusión térmico (T_f). Mediante el uso de la ecuación, la hibridación y las composiciones de lavado, y una T_f deseada, los entendidos en la técnica comprenderán que las variaciones en la astringencia de la hibridación y/o las soluciones de lavado se describen inherentemente. Si el grado deseado de
15 error en el emparejamiento da lugar a una T_f de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución en formamida), se prefiere incrementar la concentración de SSC de manera que pueda utilizarse una temperatura más alta. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Publicación Greene y Wiley-Interscience, Nueva York). Ver, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2da edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

25

Proteínas aisladas y sus variantes y fragmentos

Las proteínas delta-endotoxinas también se encuentran comprendidas en la presente invención. El término “proteína delta-endotoxina” significa una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos señalada en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó
30 14. También se proporcionan fragmentos, porciones biológicamente activas y sus variantes, y pueden utilizarse para poner en práctica los métodos de la presente invención.

Los “fragmentos” o “porciones biológicamente activas” incluyen fragmentos de polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente
35 idénticas a la secuencia de aminoácidos señalada en cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 y que muestran actividad insecticida. Una porción

biológicamente activa de una proteína delta-endotoxina puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 ó más aminoácidos de longitud. Dichas porciones biológicamente activas pueden prepararse mediante técnicas recombinantes y evaluarse para la actividad insecticida. Los métodos para medir la actividad insecticida son muy conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Czapla 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 los Estados Unidos No. 5,743,477, todos los cuales se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad. Como se utiliza en la presente, un fragmento comprende al menos 8 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 o 14. La invención abarca otros fragmentos, sin embargo, como cualquier fragmento en la proteína con más de aproximadamente 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250 ó 1300 aminoácidos.

El término "variantes" significa proteínas o polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 en al menos aproximadamente un 60%, 65%, aproximadamente un 70%, 75%, aproximadamente un 80%, 85%, aproximadamente un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99%. Las variantes también incluyen polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12, o sus complementos, en condiciones rigurosas. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis. Las variantes de proteínas comprendidas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan teniendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, es decir, retienen la actividad insecticida. Los métodos para medir la actividad insecticida son muy conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Czapla 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 los Estados Unidos No. 5,743,477, todos los cuales se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad.

Los genes bacterianos, como los genes *axmi* de la presente invención, muy a menudo poseen múltiples codones de inicio de metionina próximos al inicio del marco abierto de lectura. Con frecuencia, el inicio de la traducción en uno o más de estos codones de inicio conduce a la generación de una proteína funcional. Estos codones de inicio pueden incluir codones ATG. No obstante, las bacterias

como *Bacillus sp.* también reconocen al codón GTG como un codón de inicio, y las proteínas que inician la traducción en los codones GTG contienen una metionina en el primer aminoácido. Asimismo, generalmente no se determina *a priori* cuál de estos codones se utiliza naturalmente en la bacteria. De este modo, se entiende
5 que el uso de uno de los codones de metionina alternativos también puede conducir a la generación de proteínas delta-endotoxinas que codifican la actividad insecticida. Estas proteínas delta-endotoxinas se encuentran comprendidas en la presente invención y pueden utilizarse en los métodos de la presente invención.

También se encuentran comprendidos los anticuerpos para los polipéptidos
10 de la presente invención, o para sus variantes o fragmentos. Los métodos para producir anticuerpos son muy conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; patente de los Estados Unidos No. 4,196,265).

15 Variantes alteradas o mejoradas

Se reconoce que las secuencias de ADN de una delta-endotoxina puede alterarse mediante varios métodos y estas alteraciones pueden resultar en secuencias de ADN que codifican proteínas con secuencias de aminoácidos diferentes a aquellas codificadas por una delta-endotoxina de la presente
20 invención. Esta proteína puede alterarse de varias formas que incluyen sustituciones de aminoácidos, eliminaciones, truncamientos e inserciones de uno o más aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, que incluyen hasta aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8,
25 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,
30 aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125, aproximadamente 130 ó más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos.

35 Los métodos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, las variantes de secuencias de aminoácidos de una

proteína delta-endotoxina pueden prepararse mediante mutaciones en el ADN. Esto también puede lograrse mediante una o varias formas de mutagénesis y/o en evolución dirigida. En algunos aspectos, los cambios codificados en la secuencia de aminoácidos no afectarán de forma sustancial la función de la proteína. Dichas

5 variantes tendrán la actividad insecticida deseada. No obstante, se entiende que la habilidad de una delta-endotoxina de conferir actividad insecticida puede mejorarse mediante el uso de dichas técnicas sobre las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, una delta-endotoxina puede expresarse en células huésped que muestran índices elevados de error de incorporación de

10 bases durante la réplica de ADN, como XL-1 Red (Stratagene). Después de la propagación en dichas cepas, el ADN de delta-endotoxina puede aislarse (por ejemplo mediante la preparación de ADN plásmido o mediante la amplificación mediante PCR y la clonación del fragmento de PCR resultante en un vector), pueden cultivarse las mutaciones de delta-endotoxina en una cepa no mutagénica,

15 e identificar los genes mutados de delta-endotoxina con actividad insecticida, por ejemplo, mediante un ensayo para probar la actividad insecticida. Generalmente, la proteína se mezcla y se utiliza en ensayos de alimentación. Ver, por ejemplo, Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Dichos ensayos pueden incluir poner en contacto las plantas con uno o más insectos y determinar

20 la habilidad de la planta para sobrevivir y/o provocar la muerte de los insectos. Los ejemplos de mutaciones que resultan en un aumento de la toxicidad se encuentran en Schnepf *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

De manera alternativa, pueden alterarse las secuencias de muchas proteínas en el terminal amino o carboxilo sin afectar la actividad de forma

25 sustancial. Esto puede incluir inserciones, eliminaciones o alteraciones introducidas mediante métodos moleculares modernos, como PCR, que incluyen amplificaciones de PCR que alteran o extienden la secuencia de codificación de la proteína mediante la inclusión de secuencias de codificación de aminoácidos en los oligonucleótidos utilizados en la amplificación de PCR. De manera alternativa,

30 las secuencias de proteína agregadas incluyen secuencias completas de codificación de proteínas, como aquellas utilizadas comúnmente en la técnica para generar fusiones de proteínas. Dichas proteínas de fusión se utilizan habitualmente para (1) aumentar la expresión de una proteína de interés, (2) introducir un dominio de unión, actividad enzimática o epítopes para facilitar tanto

35 la purificación de proteínas, detección de proteínas como otros usos experimentales conocidos en la técnica, (3) apuntar a la secreción diana o la

traducción de una proteína a un organelo subcelular, como el espacio periplasmático de la bacteria Gram-negativa o el retículo endoplasmático de las células eucariotas, este último a menudo resulta en la glicosilación de la proteína.

5 Las secuencias variantes de nucleótidos y aminoácidos de la presente invención también comprenden secuencias derivadas de procedimientos mutagénicos y recombinogénicos como la traducción de ADN. Con dicho procedimiento, pueden utilizarse una o más regiones diferentes que codifican proteínas delta-endotoxinas para crear nuevas proteínas delta-endotoxinas que
10 posean las propiedades deseadas. De esta manera, se generan bibliotecas de polinucleótidos recombinantes a partir de una población de polinucleótidos de secuencia relacionada que comprenden regiones de secuencia que presentan identidad de secuencia sustancial y se pueden recombinar de forma homóloga *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, mediante el uso de este abordaje, se pueden trasponer
15 los motivos de secuencia que codifican un dominio de interés entre un gen de delta-endotoxina de la invención y otros genes de delta-endotoxina conocidos para obtener una nueva codificación de genes para una proteína con una propiedad de interés mejorada, como un aumento en la actividad insecticida. Las estrategias para dicha trasposición de ADN son muy conocidas en la técnica. Ver, por
20 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 los Estados Unidos Nos. 5,605,793 y 5,837,458.

25 El intercambio de dominio o la transposición es otro mecanismo para generar proteínas delta-endotoxinas alteradas. Se pueden intercambiar los dominios II y III entre las proteínas delta-endotoxinas, lo que resulta en toxinas híbridas o quiméricas con actividad insecticida mejorada o espectro diana. Los métodos para generar proteínas recombinantes y probar su actividad insecticida
30 son muy conocidos en la técnica (ver, 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).

35

Vectores

Una secuencia de delta-endotoxinas de la invención puede proporcionarse en un casete de expresión para su expresión en una planta de interés. La expresión "casete de expresión de una planta" significa una construcción de ADN que es capaz de resultar en la expresión de una proteína a partir de un marco de lectura abierto en una célula de la planta. Por lo general, estos contienen un promotor y una secuencia de codificación. Generalmente, dichas construcciones también contendrán una región 3' no traducida. Dichas construcciones pueden contener una "secuencia de señal" o "secuencia líder" para facilitar el transporte de co-traslación o post-traslación del péptido a ciertas estructuras intracelulares como el cloroplasto (u otro plastidio), el retículo endoplasmático o el aparato de Golgi.

El término "secuencia de señal" significa una secuencia que se sabe o se sospecha que resultará en el transporte de péptidos co-traslacional o post-traslacional a través de la membrana. En las células eucariotas, esto generalmente implica la secreción en el aparato de Golgi con alguna glicosilación resultante. La expresión "secuencia líder" significa cualquier secuencia que al ser traducida resulta en una secuencia de aminoácidos suficiente para disparar el transporte co-traslacional de la cadena de péptidos a un organelo subcelular. Por lo tanto, esto incluye las secuencias líder que dirigen el transporte y/o glicosilación mediante el pasaje al retículo endoplasmático, pasaje a las vacuolas, a los plastidios que incluyen los cloroplastos, mitocondrias y similares.

La expresión "vector de transformación de plantas" significa una molécula de ADN que es necesaria para la transformación eficiente de una célula de la planta. Dicha molécula puede consistir en uno o más casetes de expresión de plantas y puede organizarse en más de una molécula "vector" de ADN. Por ejemplo, los vectores binarios son vectores de transformación de plantas que utilizan dos vectores de ADN no contiguos para codificar todas las funciones cis y trans de actuación requeridas para la transformación de las células de plantas (Hellens y Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). El término "vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes células huésped. El "vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar, integrar y expresar secuencias o fragmentos de ADN heterólogos en una célula extraña. El casete incluirá secuencias reguladoras 3' y 5' conectadas operablemente a una secuencia de la invención. La expresión "conectadas operablemente" significa un enlace funcional entre un promotor y una segunda secuencia, donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda

secuencia. Generalmente, conectado operablemente significa que las secuencias de ácidos nucleicos que están siendo conectadas son contiguas y, cuando es necesario reunir dos regiones codificadoras de proteínas, contiguas y en el mismo marco de lectura. Además, el casete puede contener adicionalmente al menos un gen adicional que se transforma simultáneamente en el organismo. De manera alternativa, el gen o los genes adicionales pueden proporcionarse en múltiples casetes de expresión.

El término “promotora” se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que funciona para dirigir la transcripción de una secuencia de codificación corriente abajo. El promotor, junto con otras secuencias de ácidos nucleicos reguladoras, transcripcionales y translacionales (también llamadas “secuencias de control”) son necesarias para la expresión de una secuencia de ADN de interés.

Dicho casete de expresión se proporciona con una pluralidad de sitios de restricción para la inserción de la secuencia de delta-endotoxinas que va a estar 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 transcripcional y translacional (es decir, un promotor) una secuencia de ADN de la invención, una región de terminación translacional y transcripcional (es decir, región de terminación) funcional en plantas. El promotor puede ser nativo, o análogo, o extraño o heterólogo, al huésped de la planta y/o a la secuencia de ADN de la invención. Además, el promotor puede ser la secuencia natural o de manera alternativa, una secuencia sintética. Cuando el promotor es “nativo” u “homólogo” al huésped de la planta, significa que el promotor se encuentra en la planta nativa en la cual se introduce el promotor. En donde el promotor es “extraño” o “heterólogo” a la secuencia de ADN de la invención, significa que el promotor no es el promotor nativo o aquel de origen natural para la secuencia de ADN de la invención conectada operablemente.

La región de terminación puede ser nativa con la región de inicio transcripcional, puede ser nativa con la secuencia de ADN conectada operablemente de interés, puede ser nativa con el huésped de la planta o puede derivarse de otra fuente (es decir, extraña o heteróloga con respecto al promotor, la secuencia de ADN de interés, el huésped de la planta o cualesquiera de sus combinaciones). Las regiones de terminación convenientes se encuentran disponibles en el plásmido Ti de *A. tumefaciens*, como las regiones de terminación de sintasa de octopina y sintasa de nopalina. Ver también Guerineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991) *Cell* 64:671-674; Sanfacon *et al.*

(1991) *Genes Dev.* 5:141-149; Mogen *et al.* (1990) *Plant Cell* 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.

5 Cuando corresponda, el/los gen(es) pueden optimizarse para un aumento en la expresión en la célula huésped transformada. Es decir, los genes pueden sintetizarse mediante el uso de codones preferidos por la célula huésped para lograr un aumento en la expresión o pueden sintetizarse mediante el uso de codones a una frecuencia de uso del codón preferida por el huésped. Generalmente, aumentará el contenido de GC del gen. Ver, por ejemplo, Campbell
10 y Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 para un estudio del uso del codón preferido por la célula huésped. Los métodos para sintetizar los genes de plantas preferidos se encuentran disponibles en la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos 5.380.831, y 5.436.391, y Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, incorporados a modo de referencia a la presente.

15 En una realización, la delta-endotoxina se dirige al cloroplasto para la expresión. De esta manera, donde la delta-endotoxina no se inserta directamente en el cloroplasto, el casete de expresión contendrá además un ácido nucleico que codifica un péptido de tránsito para dirigir la delta-endotoxina a los cloroplastos. Dichos péptidos de tránsito son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Von
20 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.

25 El gen de la delta-endotoxina que se dirigirá al cloroplasto puede optimizarse para la expresión en el cloroplasto para explicar las diferencias en el uso de codones entre el núcleo de la planta y este organelo. De esta manera, los ácidos nucleicos de interés pueden sintetizarse mediante el uso de codones preferidos por los cloroplastos. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,380,831 incorporada como referencia en la presente.

30

Transformación de la planta

Los métodos de la invención implican la introducción de una construcción nucleotídica en una planta. El término "introducir" significa presentar la construcción nucleotídica a la planta de forma tal que la construcción logra entrar
35 en el interior de la célula de la planta. Los métodos de la invención no requieren el uso de un método particular para introducir una construcción nucleotídica en una

planta, únicamente requieren que la construcción nucleotídica logre entrar en el interior de al menos una célula de la planta. Los métodos para introducir construcciones nucleotídicas en las plantas son conocidos en la técnica e incluyen, a modo no taxativo, métodos de transformación estable, métodos de transformación transitoria y métodos mediados por virus.

El término “planta” se refiere a la totalidad de las plantas, órganos de la planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.), semillas, células de la planta, propágulos, embriones y progenies de esta. Las células de la planta pueden ser diferenciadas o indiferenciadas (por ejemplo, callos, cultivos de células en suspensión, protoplastos, células de hojas, células de raíces, células del floema, polen).

Las expresiones “plantas transgénicas” o “plantas transformadas” o plantas o células o tejidos “transformados de forma estable” se refieren a las plantas que han incorporado o integrado secuencias de ácido nucleico exógeno o fragmentos de ADN en la célula de la planta. Estas secuencias de ácidos nucleicos incluyen aquellas que son exógenas o que no están presentes en la célula de la planta no transformada, así como aquellas que pueden ser endógenas o que están presentes en la célula de planta no transformada. El término “heterólogo” generalmente se refiere a las secuencias de ácido nucleico que no son endógenas a la célula o parte del genoma nativo en el cual están presentes, y han sido agregadas a la célula mediante infección, transfección, microinyección, electroporación, microproyección o similares.

La transformación de células de plantas puede lograrse mediante una o varias técnicas conocidas en la técnica. El gen de la delta-endotoxina de la invención puede modificarse para obtener o mejorar la expresión en las células de planta. Generalmente, una construcción que expresa dicha proteína contiene un promotor para dirigir la transcripción del gen, así como una región 3' no traducida para permitir la terminación y poliadenilación de la transcripción. La organización de dichas construcciones es muy conocida en la técnica. En algunos casos, puede resultar útil manipular el gen de forma tal que se secrete el péptido resultante, o de lo contrario se dirija dentro de la célula de la planta. Por ejemplo, el gen puede manipularse para contener un péptido señal para facilitar la transferencia del péptido al retículo endoplasmático. También puede preferirse la manipulación del casete de expresión de la planta para que contenga un intrón, de forma tal que se requiera el procesamiento del ARNm del intrón para la expresión.

Generalmente este “casete de expresión de la planta” se inserta en un “vector de transformación de planta”. Este vector de transformación de planta puede constar de uno o más vectores de ADN necesarios para lograr la transformación de la planta. Por ejemplo, utilizar vectores de transformación de planta que constan de más de un segmento de ADN contiguo es una práctica común en la técnica. Estos vectores se conocen en la técnica como “vectores binarios”. Los vectores binarios así como los vectores con plásmidos auxiliares se utilizan con más frecuencia para la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el tamaño y la complejidad de los segmentos de ADN necesaria para alcanzar una transformación eficaz son bastante importantes, y es ventajoso separar las funciones en diferentes moléculas de ADN. Los vectores binarios generalmente contienen un vector plásmido que contiene las secuencias cis de actuación necesarias para la transferencia de T-ADN (como el borde izquierdo y el borde derecho), un marcador seleccionable diseñado para lograr la expresión en una célula de la planta y un “gen de interés” (un gen diseñado para lograr la expresión en una célula de la planta que se desea genere plantas transgénicas). En este vector plásmido también se encuentran presentes las secuencias requeridas para la réplica bacteriana. Estas secuencias cis de actuación se disponen de manera tal de permitir una transferencia eficaz a las células de la planta y la expresión en esta. Por ejemplo, el gen del marcador seleccionable y la delta-endotoxina se sitúan entre los márgenes derecho e izquierdo. A menudo, un segundo vector plásmido contiene los factores de actuación en trans que actúan de mediadores en la transferencia de T-ADN desde las *Agrobacterium* a las células de la planta. Este plásmido con frecuencia contiene funciones de virulencia (genes Vir) que permiten la infección de las células de la planta mediante la *Agrobacterium* y la transferencia del ADN mediante la escisión en las secuencias de los bordes 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 de plantas. El segundo vector plásmido no es necesario para transformar las plantas mediante otros métodos como la microproyección, microinyección, electroporación, polietilenglicol, etc.

En general, los métodos para la transformación de plantas implican transferir ADN heterólogo a las células de planta diana (por ejemplo, embriones maduros o inmaduros, cultivos de suspensión, callos indiferenciados, protoplastos,

etc.), y después aplicar un nivel máximo de umbral de selección adecuada (en función del gen del marcador seleccionable) para recuperar las células transformadas de la planta de un grupo de masa celular no transformada. Los explantes generalmente 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 colocarlas en un medio de regeneración complementado con un nivel máximo de umbral de agente de selección. Los brotes después se transfieren a un medio de enraizamiento selectivo para recuperar los brotes o plántulas enraizados. La plántula transgénica después crece y llega a ser una planta madura que produce semillas fértiles (por ejemplo Hiei *et al.* (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Los explantes se transfieren generalmente a un suministro fresco del mismo medio y se cultivan de forma rutinaria. Se puede encontrar una descripción general de las técnicas y métodos para generar plantas transgénicas en Ayres y Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 y Bommineni y Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Debido a que el material transformado contiene muchas células, tanto las células transformadas como las no transformadas se encuentran presentes en cualquier parte del callo o tejido diana o grupo de células tratado. La capacidad de matar células no transformadas y permitir que las células transformadas proliferen resulta en cultivos de plantas transformados. Con frecuencia, la capacidad para eliminar células no transformadas es una limitación para la recuperación rápida de las células de la planta transformadas y la generación exitosa de plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación así como los protocolos para introducir secuencias de nucleótidos en las plantas pueden variar en función del tipo de planta o célula de planta, es decir, monocotiledóneas o dicotiledóneas propuestas para la transformación. La generación de plantas transgénicas puede realizarse mediante uno de los diversos métodos que incluyen, a modo no taxativo, microinyección, electroporación, transferencia directa de genes, introducción de ADN heterólogo en las células de la planta mediante la *Agrobacterium* (transformación mediada por *Agrobacterium*), bombardeo de las células de la planta con ADN extraño heterólogo adherido a las partículas, aceleración balística de partículas, transformación por rayo de aerosol (solicitud publicada de los Estados Unidos No. 20010026941; patente de los Estados Unidos No. 4,945,050; publicación internacional No. WO 91/00915; solicitud publicada de los Estados

Unidos No. 2002015066), transformación Lec1 y otros métodos varios no dirigidos, mediados por partículas para transferir ADN.

Los métodos para la transformación de cloroplastos son conocidos en la técnica. Ver, 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 consiste en la liberación de partículas de ADN que contienen un marcador seleccionable y el abordaje del ADN al genoma de plastidios mediante recombinación homóloga. Además, la transformación de plastidios puede lograrse mediante la transactivación de un transgén silencioso transmitido por plastidios mediante la expresión preferida del tejido de una polimerasa de ARN codificada en el núcleo y dirigida al plastidio. Dicho sistema se presentó en McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Después de la integración del ADN extraño heterólogo en las células de planta, se aplica un nivel máximo de umbral de selección adecuada en el medio para matar las células no transformadas y separar y proliferar las células supuestamente transformadas que sobreviven a este tratamiento de selección mediante la transferencia de forma regular a un medio fresco. Mediante el pasaje y la inoculación continuos con selección apropiada, se identifican y proliferan las células que se transforman con el vector plásmido. Se pueden emplear métodos moleculares y bioquímicos para confirmar la presencia del gen heterólogo de interés integrado en el genoma de la planta transgénica.

Las células que se transformaron pueden crecer y llegar a ser plantas de conformidad con las formas convencionales. Ver, por ejemplo McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. Estas plantas pueden cultivarse e incluso polinizarse con la misma cepa transformada o cepas diferentes y el híbrido resultante presentará una expresión constitutiva de la característica fenotípica deseada identificada. Pueden cultivarse dos o más generaciones para asegurarse de que la expresión de la característica fenotípica deseada se mantenga y se herede de forma estable y después se pueden recolectar las semillas para asegurarse de que se ha logrado la expresión fenotípica deseada. De esta manera, la presente 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.

35

Evaluación de la transformación de la planta

A continuación de la introducción de ADN extraño heterólogo en las células de la planta, se confirma la transformación o integración del gen heterólogo en el genoma de la planta mediante métodos variados como el análisis de los ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos asociados con el gen integrado.

El análisis de PCR es un método rápido para detectar las células, tejidos o brotes transformados y determinar la presencia del gen incorporado en la etapa inicial antes del trasplante al suelo (Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). El PCR se realiza mediante el uso de cebadores de oligonucleótidos específicos para el gen de interés o un fondo de vector *Agrobacterium*, etc.

La transformación de la planta puede confirmarse mediante el análisis Southern blot del ADN genómico (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). En general, se extrae la totalidad del ADN del transformante, digerido con enzimas de restricción adecuadas, resuelto en gel de agarosa y transferido a una nitrocelulosa o membrana de nailon. La membrana o "mancha" después se prueba con, por ejemplo, un fragmento de ADN diana radiomarcado con ^{32}P para confirmar la integración del gen introducido en el genoma de la planta de conformidad con las técnicas estándar (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

En el análisis Northern blot, el ARN se aísla de los tejidos específicos del transformante, se fracciona en gel de agarosa con formaldehído, y se transfiere a un filtro de nailon de conformidad con los procedimientos estándar que se usan rutinariamente en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*). La expresión del ARN codificado por la delta-endotoxina después se prueba mediante la hibridación del filtro a una sonda radioactiva derivada de la delta-endotoxina, mediante métodos conocidos en la técnica (Sambrook y Russell, 2001, *supra*).

Se puede llevar a cabo el análisis Western blot, análisis bioquímicos y similares en las plantas transgénicas para confirmar la presencia de proteínas codificadas por el gen de la delta-endotoxina mediante procedimientos estándar (Sambrook y Russell, 2001, *supra*) con el uso de anticuerpos que se unen a uno o más epitopos presentes en la proteína delta- endotoxina.

Actividad insecticida en plantas

En otro aspecto de la invención, pueden generarse plantas transgénicas que expresen una delta-endotoxina que tiene actividad insecticida. Los métodos descritos anteriormente a modo de ejemplo pueden utilizarse para generar plantas

transgénicas, pero la forma en que las células de plantas transgénicas se generan no es de importancia fundamental para la presente invención. Los métodos conocidos o descritos en la técnica como la transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación por biolística y métodos no mediados por partículas
5 pueden utilizarse a criterio del investigador. Las plantas que expresan una delta-endotoxina pueden aislarse mediante métodos comunes descritos en la técnica, por ejemplo mediante la transformación de callos, la selección de callos transformados y la regeneración de plantas fértiles a partir de dichos callos transgénicos. En dicho proceso, puede utilizarse cualquier gen como marcador
10 seleccionable hasta que su expresión en las células de la planta confiera capacidad para identificar o seleccionar las células transformadas.

Se desarrolló un número de marcadores para su uso con células de la planta, como la resistencia al cloramfenicol, el aminoglucósido G418, la higromicina o similares. También pueden utilizarse como marcadores
15 seleccionables otros genes que codifican un producto implicado en el metabolismo de cloroplastos. Por ejemplo, puede encontrarse un uso particular para los genes que proporcionan resistencia a herbicidas de plantas como el glifosato, bromoxinilo o imidazolinona. Dichos genes han sido descritos en (Stalker *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (gen de nitrilasa resistente a bromoxinil); y
20 Sathasivan *et al.* (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (gen AHAS resistente a la imidazolinona). Asimismo, los genes descritos en la presente son útiles como marcadores para evaluar la transformación de células de plantas o bacterianas. Los métodos para detectar la presencia de un transgén en una planta, órgano de la planta (por ejemplo, hojas, tallos, raíces, etc.) semillas, células de la planta,
25 propágulos, embriones o progenies de esta son muy conocidos en la técnica. En una realización, la presencia del transgén se detecta mediante análisis para probar la actividad insecticida.

Las plantas fértiles que expresan una delta-endotoxina pueden analizarse para probar su actividad insecticida y las plantas que muestran actividad óptima
30 pueden seleccionarse para el cultivo adicional. En la técnica se encuentran disponibles los métodos para probar la actividad insecticida. Generalmente, la proteína se mezcla y se utiliza en ensayos de alimentación. Ver, por ejemplo, Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293.

La presente invención puede utilizarse para la transformación de cualquier
35 especie de planta, que incluyen, a modo no taxativo, monocotiledóneas y dicotiledóneas. Los ejemplos de plantas de interés incluyen, a modo no taxativo,

maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, papa, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla oleaginosa, *Brassica* sp., alfalfa, centeno, mijo, cártamo, maní, papa dulce, yuca, café, coco, piña, árboles cítricos, cacao, té, banana, aguacate, higo, guayaba, mango, olivo, papaya, cajú, macadamia, almendro, avena, vegetales, ornamentales y coníferas.

Los vegetales incluyen, a modo no taxativo, tomates, lechuga, chauchas, alubias de lima, arvejas y miembros del género *Curcumis* como pepino, melón y melín amizcleño. Las plantas ornamentales incluyen, a modo no taxativo, azaleas, hortensias, hibiscos, rosas, tulipanes, narcisos, petunias, claveles, poinsetias y crisantemos. Preferentemente, las plantas de la presente invención son plantas de cultivo (por ejemplo, maíz, sorgo, trigo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, papa, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla oleaginosa, etc.).

15 Uso en el control de insectos

Los métodos generales para utilizar cepas que comprenden una secuencia de nucleótidos de la presente invención, o una variante de esta, en el control de insectos o en la manipulación de otros organismos como agentes insecticidas son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5,039,523 y la patente europea 0480762A2.

Las cepas de *Bacillus* que contienen una secuencia de nucleótidos de la presente invención o una variante de esta o los microorganismos que se alteraron genéticamente para contener un gen y una proteína insecticida pueden utilizarse para proteger los cultivos y productos agrícolas de los insectos. En un aspecto de la invención, la totalidad, es decir, las células no lisadas de un organismo que produce toxinas (insecticida) se tratan con reactivos que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al ambiente del/de los insectos(s) diana.

De manera alternativa, el insecticida se produce mediante la introducción de un gen de delta-endotoxina en una célula huésped. La expresión de los genes de delta-endotoxina resulta, directamente o indirectamente, en la producción intracelular y mantenimiento del insecticida. En un aspecto de la presente invención, estas células después se tratan en condiciones que prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula se aplica al ambiente del/de los insecto(s) diana. El producto resultante retiene la toxicidad de la toxina. Estos insecticidas encapsulados naturalmente pueden formularse de conformidad

con las técnicas convencionales para la aplicación al ambiente que hospeda al insecto diana, por ejemplo, suelo, agua y follaje de plantas. Ver por ejemplo, la solicitud de patente europea 0192319, y las referencias citadas en ella. De manera alternativa, pueden formularse células que expresen un gen de la presente invención de forma tal de permitir la aplicación del material resultante como un insecticida.

Composiciones insecticidas

Los ingredientes activos de la presente invención se aplican normalmente en la forma de composiciones y pueden aplicarse al área de cultivo o planta que va a tratarse, de forma simultánea o sucesiva, con otros compuestos. Estos compuestos pueden ser fertilizantes, herbicidas, crioprotectores, surfactantes, detergentes, jabones insecticidas, aceites minerales insecticidas, polímeros y/o formulaciones de vehículos de liberación prolongada o biodegradables que permiten la dosificación a largo plazo de un área diana después de una aplicación unitaria de la formulación. También pueden ser herbicidas selectivos, insecticidas químicos, virucidas, microbicidas, amoebicidas, pesticidas, fungicidas, bacteriocidas, nematocidas, moluscocidas o mezclas de varias de estas preparaciones, si se desea, junto con vehículos, surfactantes, o adyuvantes que promueven la aplicación agronómicamente aceptables normalmente empleados en la técnica de formulación. Los vehículos y adyuvantes adecuados pueden ser sólidos o líquidos y corresponden a las sustancias empleadas normalmente en la tecnología de formulación, por ejemplo, sustancias minerales, solventes, dispersantes, agentes humectantes, adherentes, aglutinantes o fertilizantes naturales o regenerados. Del mismo modo, las formulaciones pueden prepararse en "cebos" comestibles o fabricarse en forma de "trampas" para plagas para permitir que la plaga diana ingiera la formulación insecticida.

Los métodos para aplicar un ingrediente activo de la presente invención o una composición agroquímica de la presente invención que contiene al menos una de las proteínas insecticidas producidas por las cepas bacterianas de la presente invención, incluyen la aplicación a las hojas, recubrimiento de las semillas y aplicación al suelo. El número de aplicaciones y la velocidad de aplicación dependen de la intensidad de la infestación por parte del insecto correspondiente.

La composición puede formularse como un polvo, gragea, gránulo, aerosol, emulsión, coloide, solución o similar y pueden prepararse a través de medios convencionales como la disecación, liofilización, homogeneización, extracción,

filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de las células de un cultivo que comprende el polipéptido. En todas aquellas composiciones que contienen al menos un polipéptido insecticida, el polipéptido puede presentarse en una concentración de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 99% en peso.

Se pueden matar o reducir en número los lepidópteros, coleópteros u otros insectos en un área dada mediante los métodos de la invención, o pueden aplicarse profilácticamente a un área medioambiental para prevenir la infestación por parte de un insecto susceptible. Preferentemente, el insecto ingiere o toma contacto con una cantidad insecticidamente eficaz del polipéptido. La expresión “cantidad insecticidamente eficaz” significa una cantidad del insecticida que es capaz de causar la muerte de al menos un insecto, o de reducir sensiblemente el crecimiento, alimentación o desarrollo fisiológico normal de los insectos. Esta cantidad variará en función de los factores como, por ejemplo, los insectos diana específicos que se van a controlar, el ambiente específico, ubicación, planta, cultivo o sitio agrícola que se va a tratar, las condiciones ambientales, y el método, velocidad, concentración, estabilidad y cantidad de aplicación de la composición de polipéptidos insecticidamente eficaz. Las formulaciones también pueden variar con respecto a las condiciones climáticas, las consideraciones ambientales y/o frecuencia de aplicación y/o gravedad de la infestación por insectos.

Las composiciones insecticidas descritas pueden prepararse mediante la formulación de ya sea la célula bacteriana, suspensión cristalina y/o de esporas o componentes de proteína aislados con el vehículo agronómicamente aceptable deseado. Las composiciones pueden formularse con anterioridad a la administración en un medio adecuado, como un medio liofilizado, desicado, o en un vehículo acuoso o diluyente adecuado, como una solución salina u otra solución amortiguadora. Las composiciones formuladas pueden encontrarse en forma de un polvo o un material granulado, o una suspensión en aceite (vegetal o mineral) o emulsiones de aceite/agua o como un polvo humectable, o en combinación con cualquier otro material portador adecuado para la aplicación agrícola. Los vehículos agrícolas adecuados pueden ser sólidos o líquidos y son muy conocidos en la técnica. La expresión “vehículo agronómicamente aceptable” abarca a todos los adyuvantes, componentes inertes, dispersantes, surfactantes, adherentes, aglutinantes, etc. que se utilizan normalmente en la tecnología de la formulación insecticida; estos son muy conocidos por los entendidos en la formulación insecticida. Las formulaciones pueden mezclarse con uno o más

adyuvantes sólidos o líquidos y pueden prepararse a través de varios medios, por ejemplo, mediante la mezcla, combinación y/o molienda homogénea de la composición insecticida con adyuvantes adecuados mediante el uso de técnicas de formulación convencionales. Las formulaciones y métodos de aplicación
5 adecuados se describen en la patente de los Estados Unidos No. 6,468,523 incorporados como referencia en la presente.

Las "plagas" incluyen, a modo no taxativo, insectos, hongos, bacterias, nemátodos, acáridos, garrapatas y similares. Las plagas insecticidas incluyen insectos que se seleccionan de los órdenes *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*,
10 *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera*, etc., particularmente *Coleoptera*, *Lepidoptera*, y *Diptera*.

El orden *Coleoptera* incluye los subórdenes *Adephaga* y *Polyphaga*. El suborden *Adephaga* incluye las superfamilias *Caraboidea* y *Gyrinoidea*, mientras
15 que el suborden *Polyphaga* incluye las superfamilias *Hydrophiloidea*, *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*.
20 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 *Lampyridae*. La superfamilia *Cleroidea* incluye las familias *Cleridae* y *Dermestidae*. La superfamilia *Elateroidea* incluye las familias
25 *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*
30 incluye la familia *Chrysomelidae*. La superfamilia *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*,
35 y *Cecidomyiidae*. El suborden *Brachycera* incluye las familias *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *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 *Acalyptratae* y *Calypttratae*. La sección *Acalyptratae* incluye las familias *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae* y *Drosophilidae*. La sección

5 *Calypttratae* incluye las familias *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae* y *Sarcophagidae*.

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

10 *Tineidae*.

Los nemátodos incluyen nemátodos parasíticos como formadores de agallas, quísticos y nemátodos de lesiones que incluyen *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., y *Globodera* spp.; particularmente miembros de los nemátodos quísticos, que incluyen, a modo no taxativo, *Heterodera glycines* (nemátodo quístico en la soja); *Heterodera schachtii* (nemátodo quístico en la remolacha);

15 *Heterodera avenae* (nemátodo quístico en el cereal); y *Globodera rostochiensis* y *Globodera pailida* (nemátodos quísticos en la papa). Los nemátodos de lesiones incluyen *Pratylenchus* spp.

Las plagas de insectos de la invención para los cultivos principales incluyen:

20 Maíz: *Ostrinia nubilalis*, taladro europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano trozador negro; *Helicoverpa zea*, gusano bellotero del maíz; *Spodoptera frugiperda*, gusano cogollero; *Diatraea grandiosella*, barrenador del maíz del sudoeste; *Elasmopalpus lignosellus*, barrenador menor del tallo del maíz; *Diatraea saccharalis*, barrenador de la caña de azúcar; *Diabrotica virgifera*, gusano de las

25 raíces del maíz del oeste; *Diabrotica longicornis barberi*, gusano de las raíces del maíz del norte; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de las raíces del maíz del sur; *Melanotus* spp., gusano de alambre; *Cyclocephala borealis*, cascarudo enmascarado del norte (gusano blanco); *Cyclocephala immaculata*, cascarudo enmascarado del sur (gusano blanco); *Popillia japonica*, escarabajo japonés; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*, pulgón del cogollo; *Anuraphis maidiradicis*, pulgón radicular del maíz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche de la raíz del maíz; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Hylemya platura*, gusano de la

30 semilla del maíz; *Agromyza parvicornis*, minadora del maíz; *Anaphothrips obscurus*, trips del maíz; *Solenopsis milesta*, hormiga ladrona; *Tetranychus*

- urticae*, arañita bimaclada; Sorgo: *Chilo partellus*, barrenador manchado del tallo; *Spodoptera frugiperda*, palomilla del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano del fruto; *Elasmopalpus lignosellus*, gusano saltarín; *Feltia subterranea*, cortador pequeño; *Phyllophaga crinita*, escarabajo de mayo; *Eleodes*, *Conoderus*, y *Aeolus spp.*, gusanos de alambre; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja de cereales; *Chaetocnema pulicaria*, escarabajo pulga del maíz; *Sphenophorus maidis*, picudo del maíz; *Rhopalosiphum maidis*; pulgón del cogollo; *Sipha flava*, pulgón amarillo de la caña de azúcar; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche de la raíz del arroz; *Contarinia sorghicola*, mosca del sorgo; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja;
- 10 *Tetranychus urticae*, arañita bimaclada; Trigo: *Pseudaletia unipunctata*, gusano soldado; *Spodoptera frugiperda*, palomilla del maíz; *Elasmopalpus lignosellus*, gusano saltarín; *Agrotis orthogonia*, gusano cortador pálido del oeste; *Elasmopalpus lignosellus*, gusano saltarín; *Oulema melanopus*, escarabajo de la hoja de cereales; *Hypera punctata*, picudo de la hoja
- 15 del trébol; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, gusano de las raíces del maíz del sur; pulgón del trigo ruso; *Schizaphis graminum*, pulgón verde; *Macrosiphum avenae*, pulgón de la espiga; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferenciales; *Melanoplus sanguinipes*, saltamontes migratorio; *Mayetiola destructor*, mosca de Hess;
- 20 *Sitodiplosis mosellana*, mosquito rojo del trigo; *Meromyza americana*, gusano del tallo del trigo; *Hylemya coarctata*, mosca del bulbo del trigo; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Cephus cinctus*, mosca sierra del tallo del trigo; *Aceria tulipae*, acaro erófico; 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 del girasol; Algodón: *Heliothis virescens*, bellotero; *Helicoverpa zea*, gusano del fruto; *Spodoptera exigua*, palomilla del maíz; *Pectinophora gossypiella*, gusano rosado de la India; *Anthonomus grandis*, picudo del algodón; *Aphis gossypii*, pulgón del algodón; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltona del algodón; *Trialeurodes abutilonea*, mosca Blanca bandeada; *Lygus lineolaris*, chinche Lygus; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Frankliniella fusca*, trips del tabaco; *Tetranychus cinnabarinus*, araña roja; *Tetranychus urticae*, arañita
- 35 bimaclada; Arroz: *Diatraea saccharalis*, barrenador del tallo; *Spodoptera frugiperda*, palomilla del maíz; *Helicoverpa zea*, gusano del fruto; *Colaspis*

brunnea, colaseis de la uva; *Lissorhoptrus oryzophilus*, picudo acuático del arroz; *Sitophilus oryzae*, picudo del arroz; *Nephotettix nigropictus*, pulga de la hoja del arroz; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche de la raíz del arroz; *Acrosternum hilare*, chinche verde hedionda; Soja: *Pseudoplusia includens*, falso mediador;

5 *Anticarsia gemmatalis*, oruga de las leguminosas; *Plathypena scabra*, gusano verde del trébol; *Ostrinia nubilalis*, perforador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Spodoptera exigua*, gusano soldado de la remolacha; *Heliothis virescens*, bellotero; *Helicoverpa zea*, mazorquero; *Epilachna varivestis*, conchuela del frijol; *Myzus persicae*, pulgón verde del duraznero; *Empoasca fabae*, cotorrita; *Acrosternum hilare*, chinche verde hedionda; *Melanoplus femurrubrum*, saltamontes de patas rojas; *Melanoplus differentialis*, saltamontes diferencial; *Hylemya platura*, gusano de la semilla del maíz; *Sericothrips variabilis*, trips de la soja; *Thrips tabaci*, trips de la cebolla; *Tetranychus turkestani*, araña de la fresa; *Tetranychus urticae*, arañita bimaclada; Cebada: *Ostrinia nubilalis*,

15 perforador europeo del maíz; *Agrotis ipsilon*, gusano cortador negro; *Schizaphis graminum*, pulgón verde de los cereales; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinche de la raíz de la cebada; *Acrosternum hilare*, chinche verde hedionda; *Euschistus servus*, chinche hedionda marrón; *Delia platura*, gusano del maíz; *Mayetiola destructor*, mosca de Hess; *Petrobia latens*, ácaro de los ajos; Colza de semillas oleaginosas: *Brevicoryne brassicae*, pulgón de la col; *Phyllotreta cruciferae*, escarabajo de la pulga; *Mamestra configurata*, gusano soldado de bertha; *Plutella xylostella*, polilla de crucíferas; *Delia ssp.*, gusano de las raíces.

Métodos para aumentar la productividad de la planta

25 Se proporcionan los métodos para aumentar la productividad de la planta. Los métodos comprenden introducir en una planta o célula de la planta un polinucleótido que comprende una secuencia insecticida descrita en la presente. Como se define en la presente, la "productividad" de la planta se refiere a la calidad y/o cantidad de biomasa producida por la planta. El término "biomasa" se

30 refiere a cualquier producto de la planta medido. Un aumento en la producción de biomasa es cualquier mejora registrada en la productividad del producto de la planta. El aumento de la productividad de la planta tiene varias aplicaciones comerciales. Por ejemplo, el aumento en la biomasa de las hojas de la planta puede aumentar la productividad de vegetales frondosos para el consumo humano

35 o animal. Asimismo, el aumento en la biomasa de las hojas de la planta puede utilizarse para aumentar la producción de productos farmacéuticos o industriales

derivados de plantas. El aumento en la productividad puede comprender cualquier aumento estadísticamente significativo que incluye, a modo no taxativo, al menos un aumento del 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 la productividad en comparación con una planta que no expresa la secuencia insecticida.

En métodos específicos, la productividad de la planta se aumenta como resultado de la mejora en la resistencia a insectos de una planta que expresa una proteína insecticida descrita en la presente. La expresión de la proteína insecticida resulta en la capacidad reducida de un insecto de infestar o alimentarse de la planta, lo que aumenta la productividad de la planta.

Los ejemplos que se brindan a continuación son a modo de ejemplo no taxativo.

15

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Descubrimiento de un nuevo gen de toxina Axmi115 de la cepa ATX12983 de *Bacillus thuringiensis*.

Se identificó la secuencia de genes completa a partir de la cepa que se selecciona mediante el abordaje genómico MiDAS de la manera que se describe a continuación:

- Preparación de ADN extracromosómico de la cepa. El ADN extracromosómico contiene una mezcla de algunos o todos de los siguientes: plásmidos de diferentes tamaños; cromosomas fágicos; fragmentos de ADN genómico no separados mediante el protocolo de purificación; otras moléculas extracromosómicas no caracterizadas.
- Cizallamiento mecánico o enzimático del ADN extracromosómico para generar fragmentos distribuidos por tamaño.
- Secuenciado del ADN fragmentado.
- Identificación de genes de toxinas putativos mediante la homología y/u otros análisis computacionales.
- Cuando se requiera, finalización de secuencia del gen de interés mediante una de las varias reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) o estrategias de clonación (por ejemplo, TAIL-PCR).

35

En la presente se hace referencia a este nuevo gen como *axmi-115* (SEQ ID NO:3), y se hace referencia al aminoácido codificado como AXMI-115 (SEQ ID NO:6). Las secuencias sintéticas de nucleótidos que codifican el AXMI-115 se describen en la SEQ ID NO: 15 y 16.

5

Características del gen y de la proteína

Longitud del gen, pares de bases de ADN: 2409

Longitud de la proteína, residuos de aminoácidos: 803

Peso molecular estimado de la proteína, Da: 90877

10 Homólogos conocidos y porcentaje de identidad aproximado:

Vip3Af1 – 70,7%

Axmi005 – 70,4%

Axmi026 – 70,4%

Vip3Aa7 – 70,1

15

Ejemplo 2. Nueva proteína insecticida AXMI-005 de la cepa ATX13002 de *Bacillus thuringiensis*

El gen insecticida AXMI-005 se identificó a partir de la cepa ATX13002 mediante el uso del abordaje MiDAS como se describe en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 20040014091, que se incorpora en la presente en su totalidad a modo de referencia, mediante las etapas que figuran a continuación:

Pasos llevados a cabo en la estrategia actual para el descubrimiento de genes:

Etapa 1: Se cultivó el cultivo de la cepa en grandes cantidades. El ADN plásmido se separó después del ADN cromosómico mediante un hilo de gradiente de cloruro de cesio en una ultracentrifugadora. El ADN plásmido purificado después se nebulizó a un intervalo de tamaño adecuado de 5-10kb para la cobertura de una región de codificación de un tamaño promedio. Los extremos del fragmento se pulieron y después se ligaron durante la noche a un corte de vector con una enzima de restricción que produce extremos cortantes.

Etapa 3: Una vez que se controló y se confirmó la calidad de la biblioteca genómica, se cultivaron, se prepararon y secuenciaron las colonias en un formato de 96 pocillos. Las placas de la biblioteca se secuenciaron en los extremos de la estructura base del vector para el análisis inicial.

Etapa 5: Todas las lecturas se compilaron en un proyecto de ensamblaje y se alinearon juntas para formar cóntigos. Estos cóntigos, junto con cualquier lectura

individual que puede no haberdr añadido al cóntigo, se analizaron mediante el uso de BLAST, el uso de un formato de lote, contra una base de datos interna compuesta de todas las clases de genes de delta-endotoxina conocidos. Todos los cóntigos o lecturas individuales que presentaban cualquier tipo de homología con un gen conocido se analizaron adicionalmente mediante la selección de un clon unitario de la biblioteca que abarcaba la totalidad de la región de codificación hipotetizada.

Etapas 6: El clon individual que abarca el área de interés se recorrió después lectura por lectura para diseñar cebadores para extender la secuencia. Esto se realizó hasta que ambas lecturas finales del clon se unieron y la cobertura fue de al menos 2X. El cóntigo completado del clon unitario se analizó después mediante el uso de BLAST (tanto blastn como blastx) contra una base de datos pública de todos los genes insecticidas conocidos. Los resultados de ambas búsquedas se extrajeron después de una base de datos interna de todos los genes (sujetos a la secuencia de codificación únicamente) y se alinearon con la secuencia completa del clon de la biblioteca para determinar el porcentaje de divergencia con relación con el gen conocido.

En este abordaje se identificó un nuevo gen denominado *axmi-005* en la presente (SEQ ID NO:1) y el aminoácido codificado denominado AXMI-005 (SEQ ID NO: 4). La búsqueda de bases de datos públicas de secuencias, que incluyen las bases de datos GENBANK®, mostraron que la AXMI-005 es una proteína única que presenta la homología más alta (94,9%) con respecto a la proteína insecticida vip3Aa (GenePept ID L48841).

Se diseñó una secuencia sintética que codifica la proteína AXMI-005 y se denominó *optaxmi-005*. La secuencia de nucleótidos se describe en la SEQ ID NO:7 y codifica la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO:9 (con la adición de un marcador de histidina C-terminal). El gen *optaxmi-005* descrito en la presente puede utilizarse con o sin el marcador de histidina C-terminal.

Ejemplo 3. Descubrimiento de un nuevo gen de toxina Axmi-113 de la cepa ATX12987 de *Bacillus thuringiensis*.

Se identificó la secuencia de genes completa de la cepa que se selecciona mediante el abordaje genómico MiDAS de la manera que figura a continuación:

- Preparación de ADN extracromosómico de la cepa. El ADN extracromosómico contiene una mezcla de algunos o todos de los siguientes: plásmidos de diferentes tamaños; cromosomas fágicos;

fragmentos de ADN genómico no separados mediante el protocolo de purificación; otras moléculas extracromosómicas no caracterizadas.

- Cizallamiento mecánico o enzimático del ADN extracromosómico para generar fragmentos distribuidos por tamaño.
- Secuenciado del ADN fragmentado.
- Identificación de genes de toxinas putativos mediante la homología y/u otros análisis computacionales.
- Cuando se requiera, finalización de secuencia del gen de interés mediante una de las varias PCR o estrategias de clonación (por ejemplo, TAIL-PCR).

En la presente se hace referencia al nuevo gen como *axmi-113* (SEQ ID NO:2) y se hace referencia al aminoácido codificado como AXMI-113 (SEQ ID NO:5).

15 Características del gen y de la proteína

Longitud del gen, pares de bases de ADN: 2385

Longitud de la proteína, residuos de aminoácidos: 795

Peso molecular estimado de la proteína, Da: 89475

Homólogos conocidos y porcentaje de identidad aproximado:

20 Vip3Ah – 99%

Vip3Aa18 – 79,8%

Axmi005 – 79%

25 Se diseñó una secuencia sintética que codifica la proteína AXMI-113 y se denominó *optaxmi-113*. La secuencia de nucleótidos se describe en la SEQ ID NO:8 y codifica la secuencia de aminoácidos descrita en la SEQ ID NO: 5 ó 10 (con la adición de un marcador de histidina C-terminal). El gen *optaxmi-113* descrito en la presente puede utilizarse con o sin el marcador de histidina C-terminal.

30

Ejemplo 4. Descubrimiento de nuevos genes de toxina Axmi-163 y Axmi-184 de la cepa ATX14775 de *Bacillus thuringiensis*.

35 Se identificó para cada una de ellas la secuencia de genes completa de la cepa que se selecciona mediante el abordaje genómico MiDAS de la manera que se describe a continuación:

- Preparación de ADN extracromosómico de la cepa. El ADN extracromosómico contiene una mezcla de algunos o todos de los siguientes: plásmidos de diferentes tamaños; cromosomas fágicos; fragmentos de ADN genómico no separados mediante el protocolo de purificación; otras moléculas extracromosómicas no caracterizadas.
- Cizallamiento mecánico o enzimático del ADN extracromosómico para generar fragmentos distribuidos por tamaño.
- Secuenciado del ADN fragmentado.
- Identificación de genes de toxinas putativos mediante la homología y/u otros análisis computacionales.
- Cuando se requiera, finalización de secuencia del gen de interés mediante una o más PCR o estrategias de clonación (por ejemplo, TAIL-PCR).

El nuevo gen denominado *axmi-163* en la presente, se describe en la SEQ ID NO:11 y el aminoácido codificado denominado AXMI-163 se describe en la SEQ ID NO:13.

Características del gen y de la proteína

Longitud del gen, pares de bases de ADN: 2370
 Longitud de la proteína, residuos de aminoácidos: 790
 Peso molecular estimado de la proteína, Da: 88.700
 Homólogos conocidos y porcentaje de identidad aproximado:

SEQ ID NO:17 de la patente de los Estados Unidos 7,129,212 – 98%
 Axmi005 – 78%

El nuevo gen denominado *axmi-184* en la presente, se describe en la SEQ ID NO:12 y el aminoácido codificado denominado AXMI-184 se describe en la SEQ ID NO:14. Las secuencias de nucleótidos sintéticas que codifican el AXMI-184 se describen en las SEQ ID NO:17 y 18.

Características del gen y de la proteína

Longitud del gen, pares de bases de ADN: 2370
 Longitud de la proteína, residuos de aminoácidos: 790
 Peso molecular estimado de la proteína, Da: 88.300
 Homólogos conocidos y porcentaje de identidad aproximado:

Vip3Af1 – 93%

Axmi005 – 86%

Ejemplo 5. Construcción de secuencias sintéticas

5 En un aspecto de la invención, se generan las secuencias sintéticas *axmi*. Estas secuencias sintéticas tienen una secuencia de ADN alterada con relación a la secuencia principal *axmi* y codifican una proteína que es colineal con la proteína AXMI principal a la cual corresponde, pero carece del “dominio cristalino” C-terminal presente en muchas proteínas delta-endotoxinas.

10 En otro aspecto de la invención, las versiones modificadas de genes sintéticos se diseñan de forma tal que el péptido resultante se dirige a un organelo de la planta, como el retículo endoplasmático o el apoplasto. Las secuencias de péptidos que se sabe resultan en el direccionamiento de las proteínas de fusión hacia los organelos de las plantas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, en la

15 técnica se conoce que la región N-terminal del gen de la fosfatasa ácida de *Lupinus albus* (Genebank ID GI:14276838; Miller *et al.* (2001) Plant Physiology 127:594-606) resulta en el direccionamiento de las proteínas heterólogas hacia el retículo endoplasmático. Si la proteína de fusión resultante también contiene una secuencia de retención endoplasmática que comprende el péptido N-terminal-

20 lisina-ácido aspártico-ácido glutámico-leucina (es decir, el motivo “KDEL” (SEQ ID NO:19) en el extremo C, la proteína de fusión se dirigirá al retículo endoplasmático. Si la proteína de fusión carece de una secuencia dirigida al retículo endoplasmático en el extremo C, la proteína se dirigirá al retículo endoplasmático, pero será finalmente secuestrada en el apoplasto.

Ejemplo 6. Expresión en *Bacillus*

25 A modo de ejemplo de la expresión de los genes y proteínas de la invención en las especies *Bacillus*, el gen insecticida descrito en la presente se amplifica mediante PCR y el producto de la PCR se clona en el vector de expresión pAX916 de *Bacillus* u otro vector adecuado mediante métodos muy conocidos en la

30 técnica. La cepa de *Bacillus* resultante que contiene el vector con el gen *axmi* se cultiva en un medio de cultivo tradicional, como el medio CYS (10 g/l Bactocasitona; 3 g/l extracto de levadura; 6 g/l KH₂PO₄; 14 g/l K₂HPO₄; 0,5 mM MgSO₄; 0,05 mM MnCl₂; 0,05 mM FeSO₄), hasta que la esporulación se evidencia mediante examen microscópico. Las muestras se preparan y se prueban para la

35 actividad en ensayos biológicos.

Ejemplo 7. Expresión en *E. coli*

Como ejemplo de un método de expresión de los genes y proteínas de la invención en sistemas basados en *E. coli*, se clona el marco de lectura abierto (ORF) completo de cada gen *axmi* en un vector de expresión de *E. coli* basado en el pRSF1b. Los clones resultantes se confirman mediante análisis de restricción y finalmente mediante secuenciado completo del gen clonado.

Para la expresión en *E. coli*, el BL21*DE3 se transforma con el vector que expresa el gen *axmi*. Las colonias unitarias se inoculan en LB suplementado con kanamicina y se cultivan durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se inocula el medio fresco por duplicado con un 1% del cultivo durante la noche y se cultiva a 37°C hasta la fase logarítmica. Posteriormente, los cultivos se inducen con 1mM isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) durante 3 horas a 37°C o durante la noche a 20°C. Cada granulado celular se suspende en 50mM de una solución amortiguadora de carbonato de sodio, pH 10,5 complementado con 1mM DTT ditiotreitól y se sonica. Las muestras se preparan y se prueban para la actividad en ensayos biológicos.

Ejemplo 8. Expresión de AXMI-115, AXMI-113 y AXMI-005 en *E. coli*

Se generaron los clones de *E. coli* que contenían segmentos de ADN que contenían el marco de lectura abierto completo así como una porción de la región de ADN de origen natural corriente arriba y adyacente a cada gen. Este segmento de ADN se amplificó y se clonó para cada uno de los *axmi-113* (SEQ ID:2), *axmi-115* (SEQ ID NO:3) o *axmi-005* (SEQ ID NO:1) en el vector pAX916, para proporcionar los clones pAX5463, pAX5464 y pAX5465 respectivamente. Los clones resultantes se confirmaron mediante análisis de restricción y mediante secuenciado completo de los fragmentos clonados.

Las células de *E. coli* se transformaron con cada uno de los clones pAX5463, pAX5464 y pAX5465.

Los genes *axmi005*, *axmi113* y *axmi115* que presentaban codones optimizados para la expresión en el maíz y que habían agregado un extremo C etiquetado his6 también se expresaron a partir del vector de expresión de *E. coli* mediante el uso de un promotor T7. Asimismo, se generaron las construcciones que expresaban versiones del extremo N etiquetado his6 o versiones no etiquetadas de *optaxmi005* (pAX5475, pAX5478) y *optaxmi115* (pAX5476, pAX5477).

Las colonias unitarias de *E. coli* de los clones que expresan los *axmi-115*, *axmi-113* y *axmi-005* se cultivaron durante la noche a 37°C en un medio LB. Al día siguiente, se inoculó el medio fresco por duplicado con un 1% del cultivo durante la noche y se cultivó a 37°C hasta la fase logarítmica. Posteriormente, los cultivos se indujeron con IPTG 1mM durante la noche a 20°C. Las células resultantes se recolectaron mediante centrifugación y se suspendieron en una solución amortiguadora de carbonato de sodio 50mM, pH 10,5 se complementaron con 1mM DTT o solución amortiguadora Tris Cl 50mM , pH 8 con 1mM DTT previamente a la sonicación. El análisis SDS-PAGE mostró una expresión de una proteína de ~ 90kD en todas las muestras.

Ejemplo 9. Ensayos biológicos de insectos de las proteínas expresadas en *E. coli*

Los extractos solubles que contienen las AXMI-005, AXMI-113 ó AXMI-115 se probaron en ensayos de insectos con controles adecuados. Las placas con cultivo de tejido de veinticuatro pocillos (Corning) se llenaron con 1 ml de dieta multi-especies (Bio-Serv) y se dejaron solidificar. Una vez que se solidificaron se colocaron 40µl de muestra de proteína en la superficie de la dieta de cada pocillo y se dejó remojar/secar a temperatura ambiente. En función del experimento, tanto las masas de huevos como las larvas recién nacidas se colocaron en cada pocillo. Las placas se sellaron con membranas permeables al gas (Research Products International) y se incubaron a 25 °C y un 90% de humedad relativa. Después de cinco o siete días, las muestras se puntuaron visualmente en comparación con una solución amortiguadora únicamente o un control de extracto no transformado.

Se observó una actividad intensa de los extractos de AXMI-005 en *Helicoverpa zea* (HZ), *Heliothis virescens* (HV), palomilla del maíz (FAW), gusano cortador (BCW), barrenador del tallo (SCB) y la oruga aterciopelada del frijol (VBC). La AXMI-005 también mostró actividad en el barrenador del maíz del sudoeste (SWCB).

Se observó una actividad intensa de los extractos de AXMI-115 en *Heliothis virescens*, en la palomilla del maíz, en el gusano cortador negro y en la oruga aterciopelada del frijol. La AXMI-115 también mostró actividad en el taladro europeo del maíz (ECB), en el barrenador del tallo (SCB), en el barrenador del maíz del sudoeste (SWCB) y en la polilla de crucíferas (DBM). La actividad de AXMI-115 en *Helicoverpa zea* (HZ) fue menos pronunciada que para los otros insectos evaluados, pero aún fue significativa.

Se puntuó la actividad de cada uno de los extractos de AXMI-005 y AXMI-115 y se le asignó un número de 1 a 5 basado en la actividad relativa en los ensayos. En la tabla 1 se muestra un resumen de las puntuaciones en un ensayo particular.

5 La AXMI-005 mostró cierta actividad en el SWCB (puntuación de 2) y niveles altos de actividad en Hz, Hv, FAW, BCW y VBC (puntuaciones de 4 a 5). La AXMI-115 mostró niveles altos de actividad en el SWCB (80% de mortalidad) ECB, FAW y VBC (puntuaciones de 4 a 5) y una actividad menor en Hz y Hv. La AXMI-113 también mostró una actividad alta en el SWCB (puntuación de 4 con un

10 20% de mortalidad) y en el SCB. No se detectó actividad en los otros insectos evaluados.

Tabla 1. Actividad insecticida de AXMI-115, AXMI-113 y AXMI-005*

	Axmi115 (pH 10,5)	Axmi115 (pH 8)	Axmi005 (pH10,5)	Axmi005 (pH 8)	Axmi113 (pH 10,5)
Hz	0	0	4	4	0
Infestación por ECB	2	4	0	0	0
Hv	0	0	4	4 /5	0
FAW	4	2	4/5	4/5	0
BCW	0	0	3/4	4	0
VBC	4	3	4	4/5	0
SWCB	4; 80% de mortalidad	3; 50% de mortalidad	2	ND	4; 20% de mortalidad
SCB	ND	3; 25% de mortalidad	ND	4; 100% de mortalidad	3; 50% de mortalidad
DBM	ND	2/3	0	0	0

15 * = representado como el porcentaje de atrofia y mortalidad donde la atrofia se califica de acuerdo con la escala que figura a continuación:

Puntuación	Definición
0	Sin actividad
1	Atrofia ligera, no uniforme
2	Atrofia no uniforme
3	Atrofia uniforme
4	Atrofia uniforme con mortalidad (expresada en porcentaje)
5	Atrofia uniforme con un 100% de mortalidad

Ejemplo 10. Ensayo biológico del Axmi184

Purificación y expresión de genes

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- La región del ADN que codifica el dominio de la toxina del Axmi184 se clonó en un vector de expresión pMAL-C4x de *E. coli* detrás del gen *malE* que codifica la proteína de unión a la maltosa (MBP). Esta fusión en el marco resultó en la expresión de la proteína de fusión MBP-Axmi084 en *E. coli*.
 - Para la expresión en *E. coli* se transformó el BL21*DE3 con plásmidos individuales. La colonia unitaria se inoculó en Luria Bertani (LB) complementado con carbenicilina y glucosa y se cultivó durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se inoculó el medio fresco con un 1% del cultivo durante la noche y se cultivó a 37°C hasta la fase logarítmica. Posteriormente, los cultivos se indujeron con 0,3mM IPTG durante la noche a 20°C. Cada granulado celular se suspendió en 20mM de una solución amortiguadora Tris-Cl a un pH de 7,4 +200mM NaCl+1mM DTT+ inhibidores de la proteasa y se sonicó. El análisis mediante SDS-PAGE confirmó la expresión de proteínas de fusión.
 - La totalidad de los extractos celulares libres se vertieron sobre la columna de amilosa sujeta a la FPLC para la purificación de la afinidad de las proteínas de fusión MBP-AXMI184. La proteína de fusión vinculada se eluyó a partir de la resina con una solución de maltosa 10mM. Las proteínas de fusión después se escindieron con el factor Xa o tripsina para eliminar el marcador MBP amino terminal de la proteína AXMI184. La escisión y solubilidad de las proteínas se determinó mediante SDS-PAGE.
 - Las proteínas escindidas se probaron en ensayos de insectos con controles adecuados. Una lectura de placas de 5 días mostró las siguientes actividades de la AXMI-184 contra la polilla de crucíferas.

Ejemplo 11. Intercambio de dominio

Los genes *axmi005*, *axmi113* y *axmi115* que presentaban codones optimizados para la expresión en el maíz se utilizaron en este ejemplo. Los plásmidos que expresan versiones no marcadas de *optaxmi005* (pAX5478), *optaxmi113* (pAX5493) y *optaxmi115* (pAX5477) se utilizaron para diseñar las construcciones de intercambio de ADN como se describe en la presente.

Las AXMI-005, AXMI-113 y AXMI-115 presentan una identidad/similitud de secuencia significativa en su 2/3^{ra} región N-terminal. La 1/3^{ra} región restante en su terminal C (CT) muestra una divergencia de secuencia significativa como se aprecia en la alineación de secuencias de proteínas proporcionada en las figuras 1A y 1B.

La región proteica de la AXMI-113 entre las flechas hacia delante y hacia atrás mostradas en la figura 1 se reemplazó con el fragmento correspondiente de AXMI-005 (para dar pAX5492) o AXMI-115 (pAX5494).

Para la expresión en *E. coli* se transformó el BL21*DE3 con construcciones individuales. Una colonia unitaria se inoculó en LB complementado con kanamicina y se cultivó durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se inoculó el medio fresco por duplicado con un 1% del cultivo durante la noche y se cultivó a 37°C hasta la fase logarítmica. Posteriormente, los cultivos se indujeron con IPTG 1mM durante la noche a 20°C. El granulado celular se suspendió en una solución amortiguadora de carbonato de sodio 50mM, pH 10,5 complementado con 1mM DTT y se sonicó. El análisis mediante SDS-PAGE mostró una expresión soluble extremadamente buena de todas las proteínas.

El filtro se esterilizó, los extractos solubles que expresan OptAxmi005, 113, 115, Optaxmi113+CT de Optaxmi005 y Optaxmi113+CT de Optaxmi115 se probaron en ensayos de insecto con controles adecuados. Como se muestra en el ejemplo 9, la AXMI-113 mostró una actividad alta en el SWCB (25% de mortalidad). Mostró una actividad adicional en el SCB (50% de mortalidad).

Asimismo, como se muestra en el ejemplo 9, la AXMI-005 mostró actividad en el SWCB, Hz, Hv, FAW, BCW y VBC. Mostró una actividad adicional en el SCB (25% de mortalidad). También se encontró que la AXMI-115 presentaba actividad en el SCB.

La fusión de la AXMI-113+CT de la AXMI-005 mostró todas las actividades de los insectos vistas con la AXMI-005. En otras palabras, el reemplazo del fragmento C-terminal de la AXMI-113 con el de la AXMI-005 le confirió las actividades de los insectos que de lo contrario carecían en su forma natural.

Se pueden generar secuencias de proteína de toxinas adicionales mediante el intercambio de dominios de una proteína a la otra. Por ejemplo, uno o más de los dominios de la AXMI-005 mostrados en la figura 2 se introducen en la AXMI-115. Los dominios se introducen mediante el uso de los oligonucleótidos sentido ("s") y los oligonucleótidos antisentido ("a") mostrados en la tabla 2. La porción de la secuencia axmi-005 que se está introduciendo en la secuencia *axmi-115* se muestra en negrita. Las secuencias terminales en cada oligonucleótido son las secuencias *axmi-115* que se utilizan para templar los oligonucleótidos a la plantilla *axmi-115*. El número a continuación del término "sub" en cada nombre de cebador corresponde a las casillas numeradas en la figura 2. Se pueden diseñar oligonucleótidos similares para intercambiar dominios entre secuencias múltiples, por ejemplo, entre las secuencias AXMI-005, AXMI-113, AXMI-115, AXMI-163 y AXMI-184 descritas en la presente.

15 Tabla 2.

Cebador oligonucleótido	Secuencia	SEQ ID NO:
axmi115sub1 s	AAC ACC GGC GGC GTC AAT GGA ACA AGG GCG CTC TTC ACC CA	20
axmi115sub1 a	TGG GTG AAG AGC GCC CTT GTT CCA TTG ACG CCG CCG GTG TT	21
axmi115sub10 s	GCC CGG AGC TCA TCA ATG TCA ACA ACT GGA TCA GAA CTG GCA CCA CCT ACA TCA C	22
axmi115sub10 a	GTG ATG TAG GTG GTG CCA GTT CTG ATC CAG TTG TTG ACA TTG ATG AGC TCC GGG C	23
axmi115sub11 s	ATG ATT GGG AGA GGT TCG GAA GCA CCC ACA TCA GCG GCA ATG AGC TGA GG	24
axmi115sub11 a	CCT CAG CTC ATT GCC GCT GAT GTG GGT GCT TCC GAA CCT CTC CCA ATC AT	25
axmi115sub12 s	CTA CAT CAC CGG CAA TAC CTT GAC GCT CTA CCA AGG AGG AGG AGG CTA CTT CCG C	26
axmi115sub12 a	GCG GAA GTA GCC TCC TCC TCC TTG GTA GAG CGT CAA GGT ATT GCC GGT GAT GTA G	27
axmi115sub14 s	CGA CAG CTA CAG CAC CTA CAG GGT GAA CTT CTC CGT CAC CGG CTG GGC CAA GGT GAT	28
axmi115sub14 a	ATC ACC TTG GCC CAG CCG GTG ACG GAG AAG TTC ACC CTG TAG GTG CTG TAG CTG TCG	29

axmi115sub15 s	GCT TCA GCG GCC TCG ACG CCA ATG TGA GGA TCA GAA ACA GCC GCG GC	30
axmi115sub15 a	GCC GCG GCT GTT TCT GAT CCT CAC ATT GGC GTC GAG GCC GCT GAA GC	31
axmi115sub16 s	GTG AAG AAC AGC CGC GAG GTG CTC TTC GAG AAG AGA TAC ATG AAT GGA AGC AGC TAT GA	32
axmi115sub16 a	TCA TAG CTG CTT CCA TTC ATG TAT CTC TTC TCG AAG AGC ACC TCG CGG CTG TTC TTC AC	33
axmi115sub17 s	TTC GAG AAG GTG AAG AAC AGC GGC GCC AAG GAT GTT TCA GAG AGC TTC ACC ACC	34
axmi115sub17 a	GGT GGT GAA GCT CTC TGA AAC ATC CTT GGC GCC GCT GTT CTT CAC CTT CTC GAA	35
axmi115sub19 s	GCT TCT TCA TCG AGC TCA GCC AAG GCA ACA ACC TCT ATA GCA GCA CCT TCC AC	36
axmi115sub19 a	GTG GAA GGT GCT GCT ATA GAG GTT GTT GCC TTG GCT GAG CTC GAT GAA GAA GC	37
axmi115sub2 s	GAA GCA AGG CGC TCT ATG TTC ACA AGG ATG GAG GCT TCA GCC AGT TCA TCG	38
axmi115sub2 a	CGA TGA ACT GGC TGA AGC CTC CAT CCT TGT GAA CAT AGA GCG CCT TGC TTC	39
axmi115sub20 s	CCG CCG AGA GGA CAG GAG GGC CGC TGG TGA AGT TCA GAG ACA TCA GCA TC	40
axmi115sub20 a	GAT GCT GAT GTC TCT GAA CTT CAC CAG CGG CCC TCC TGT CCT CTC GGC GG	41
axmi115sub21 s	AGC ACC TTC CAC AGC TTC AAT GAT GTG AGC ATC AAG TAA GGC GCG CCG	42
axmi115sub21 a	CGG CGC GCC TTA CTT GAT GCT CAC ATC ATT GAA GCT GTG GAA GGT GCT	43
axmi115sub3 s	CGA CAA GCT AAA GCC CAA GAC AGA ATA TGT CAT CCA GTA CAC CGT CAA G	44
axmi115sub3 a	CTT GAC GGT GTA CTG GAT GAC ATA TTC TGT CTT GGG CTT TAG CTT GTC G	45
axmi115sub5 s	CCT ACG AGG ACA CCA ATA ACA ACA ACC TGG AGG ACT ACC AAA CAA TTG CTG TGA AG	46
axmi115sub5 a	CTT CAC AGC AAT TGT TTG GTA GTC CTC CAG GTT GTT GTT ATT GGT GTC CTC GTA GG	47
axmi115sub6 s	GAG GAG TTC CAA ACA ATT ACC AAG AGG TTC ACC ACC GGC ACA GAT TTG AGC CAG ACC	48

axmi115sub6 a	GGT CTG GCT CAA ATC TGT GCC GGT GGT GAA CCT CTT GGT AAT TGT TTG GAA CTC CTC	49
axmi115sub7 s	CAC CTC AGA AAC AGA TTT GAA GGG CGT CTA CCT CAT CTT GAA GAG CCA AAA TGG ATA T	50
axmi115sub7 a	ATA TCC ATT TTG GCT CTT CAA GAT GAG GTA GAC GCC CTT CAA ATC TGT TTC TGA GGT G	51
axmi115sub9 s	TCC TGG AGG CCA AGC CAT CAG AGA AGC TGC TCA GCC CGG AGC TCA	52
axmi115sub9 a	TGA GCT CCG GGC TGA GCA GCT TCT CTG ATG GCT TGG CCT CCA GGA	53
axmi115sub13 s	ATC ATT CAA GAG GAG GCA ACC TCA AGC AGA ACC TCC AGC TTG ACA GCT TCA GCA CCT ACG ACC TCA G	54
axmi115sub13 a	CTG AGG TCG TAG GTG CTG AAG CTG TCA AGC TGG AGG TTC TGC TTG AGG TTG CCT CCT CTT GAA TGA T	55
axmi115sub18 s	GCT ATG AGG ACA TCT CAG AGA TCT TCA CCA CCA AGC TGG GCA AGG ACA ACT TC TAC A TCG AGC TCA CCG C	56
axmi115sub18 a	GCG GTG AGC TCG AT GTA G AAG TTG TCC TTG CCC AGC TTG GTG GTG AAG ATC TCT GAG ATG TCC TCA TAG C	57
axmi115sub4 s	CAA GGG CAA GCC GTC AAT CCA CCT CAA GAA TGA GAA CAC CGG CTA CAT CCA CTAC GA GGA CAC CAA TGG	58
axmi115sub4 a	CCA TTG GTG TCC TCG TAG TGG ATG TAG CCG GTG TTC TCA TTC TTG AGG TGG ATT GAC GGC TTG CCC TTG	59
axmi115sub8 s	CAA GAG CCA AAA TGG AGA TGA AGC ATG GGG AGA CAA CTT CAC CAT CCT GGA GAT CTC GCT CTT CGA GAC ACC AGA A	60
axmi115sub8 a	TTC TGG TGT CTC GAA GAG CGA GAT CTC CAG GAT GGT GAA GTT GTC TCC CCA TGC TTC ATC TCC ATT TTG GCT CTT G	61

Ejemplo 12. Ensayos adicionales para la actividad pesticida

La capacidad de una proteína insecticida para actuar como pesticida sobre una plaga normalmente se evalúa de diversas maneras. Una forma muy 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 que se van a probar o las muestras de control. A menudo esto se lleva a cabo

mediante la colocación del material que se desea probar, o de una disolución adecuada de dicho material, en un material que la plaga ingerirá, como una dieta artificial. El material que se va a probar puede encontrarse en forma líquida, sólida o de suspensión. El material que se va a probar puede colocarse sobre la superficie y después se puede dejar secar o incorporar en la dieta. De manera alternativa, el material que se quiere probar puede mezclarse con una dieta artificial líquida y después colocarse en la cámara de ensayo. La cámara de ensayo puede ser, por ejemplo, una taza o un pocillo de una placa de microtitulación.

Los ensayos para las plagas chupadoras (por ejemplo, áfidos) pueden implicar separar el material de prueba del insecto mediante una partición, en la medida de lo posible una porción que la pieza bucal chupadora del insecto chupador pueda perforar, para permitir la ingestión del material de prueba. Con frecuencia el material de prueba se mezcla con un estimulante de la alimentación, como sacarosa, para promover la ingestión del compuesto de prueba.

Otros tipos de ensayo pueden incluir la microinyección del material de prueba en la boca o intestino de la plaga, así como el desarrollo de plantas transgénicas, seguido de la capacidad de la plaga para alimentarse de la planta transgénica. Las pruebas de las plantas pueden implicar el aislamiento de las partes de la planta que se consumen normalmente, pequeñas cajas sujetadas a las hojas, o el aislamiento de las plantas en su totalidad en cajas que contienen insectos.

Otros métodos y abordajes para probar las plagas son conocidos en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Robertson, J. L. & H. K. Preisler. 1992. *Ensayos biológicos pesticidas con artrópodos*. CRC, Boca Raton, FL. De manera alternativa, normalmente se describen ensayos en los periódicos "Arthropod Management Tests" y "Journal of Economic Entomology" o se discuten con los miembros de la Sociedad Entomológica de América (ESA).

Ejemplo 13. Vectorización de los genes insecticidas de la invención para la expresión de plantas

Cada una de las regiones de codificación de los genes de la invención se conecta de forma independiente con secuencias promotoras y de terminación adecuadas para la expresión en plantas. Dichas secuencias son muy 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 UBQ3 o

promotor CaMV 35S de *Arabidopsis* para la expresión en dicotiledóneas, y los finalizadores nos o PinII. Las técnicas para producir y confirmar construcciones promotor – gen – finalizador también son conocidas en la técnica.

5 Ejemplo 14. Transformación de los genes de la invención en células de planta mediante la transformación mediada por *Agrobacterium*

Las espigas se recogen a los 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las espigas y aquellos embriones con un tamaño de 0,8-1,5 mm se utilizan para la transformación. Los embriones se colocan en placas con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado y se incuban
10 durante la noche a 25°C en la oscuridad. Sin embargo, no es realmente necesario incubarlos los embriones durante la noche. Los embriones se ponen en contacto con una cepa de *Agrobacterium* que contiene los vectores adecuados para la transferencia mediada por el plásmido Ti durante 5-10 minutos y después se
15 colocan en placas en un medio de co-cultivación durante 3 días (25°C en la oscuridad). Después de la co-cultivación, los explantes se transfieren a un medio durante el período de recuperación durante cinco días (a 25°C en la oscuridad). Los explantes se incuban en el medio de selección hasta ocho semanas, en función de la naturaleza y características de la selección particular empleada.
20 Transcurrido este período de selección, los callos resultantes se transfieren a un medio de maduración de embriones hasta que se observa la formación de embriones maduros somáticos. Los embriones maduros somáticos resultantes se colocan después bajo una luz tenue y se inicia el proceso de regeneración como se conoce en la técnica. Los brotes resultantes se dejan enraizar en un medio de
25 enraizamiento y las plantas resultantes se transfieren a una maceta de vivero y se propagan como plantas transgénicas.

Ejemplo 15. Transformación de las células del maíz con los genes insecticidas de la invención

30 Las espigas del maíz se recogen a los 8-12 días después de la polinización. Los embriones se aíslan de las espigas y los embriones con un tamaño de 0,8-1,5 mm se utilizan para la transformación. Los embriones se colocan en placas con el escutelo hacia arriba en un medio de incubación adecuado, como el medio DN62A5S (3,98 g/L sales N6; 1 mL/L (de 1000x reserva) vitaminas N6; 800 mg/L
35 L-Asparagina; 100 mg/L Mio-inositol; 1,4 g/L L-prolina; 100 mg/L casaminoácidos;

50 g/L sacarosa; 1 mL/L (de 1 mg/mL reserva) 2,4-D) y se incuban durante la noche a 25°C en la oscuridad.

Los explantes resultantes se transfieren a cuadrados de malla (30-40 por placa), se transfieren a un medio osmótico durante 30-45 minutos y después se transfieren a una placa de transferencia (ver, por ejemplo, la publicación del PCT No. WO/0138514 y la patente de los Estados Unidos No. 5,240,842).

Las construcciones de ADN diseñadas para expresar los genes de la invención en células de la planta se aceleran hacia el tejido de la planta mediante el uso de un acelerador de rayos de aerosol, básicamente en las condiciones descritas en la publicación PCT No. WO/0138514. Después de la transferencia, los embriones se incuban durante 30 min. en un medio osmótico y se colocan después en un medio de incubación durante la noche a 25°C en la oscuridad. Para prevenir el daño excesivo de los explantes transferidos, estos se incuban durante al menos 24 horas previamente a la transferencia a un medio de recuperación. Los embriones después se esparcen en el medio del período de recuperación durante 5 días a 25°C en la oscuridad y después se transfieren a un medio de selección. Los explantes se incuban en el medio de selección durante hasta ocho semanas, en función de la naturaleza y características de la selección particular empleada. Transcurrido este período de selección, los callos resultantes se transfieren a un medio de maduración de embriones hasta que se observa la formación de embriones maduros somáticos. Los embriones maduros somáticos resultantes después se colocan bajo una luz tenue y se inicia el proceso de regeneración mediante métodos conocidos en la técnica. Los brotes resultantes se dejan enraizar en un medio de enraizamiento y las plantas resultantes se transfieren a macetas de vivero y se propagan como plantas transgénicas.

Materiales

Medio DN62A5S

Componentes	Por litro	Fuente
Mezcla basal de sal N6 de Chu (Prod. No. C 416)	3,98 g/L	Phytotechnology Labs
Solución de vitaminas N6 de Chu (Prod. No. C 149)	1 mL/L (de 1000x reserva)	Phytotechnology Labs
L-Aspargina	800 mg/L	Phytotechnology Labs
Mio-inositol	100 mg/L	Sigma
L-Prolina	1,4 g/L	Phytotechnology Labs
Casaminoácidos	100 mg/L	Fisher Scientific
Sacarosa	50 g/L	Phytotechnology Labs
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 mL/L (of 1 mg/mL reserva)	Sigma

Ajustar el pH de la solución a un pH de 5,8 con KOH 1N/KCl 1N, agregar Gelrite (Sigma) a 3g/L, y autoclave. Después de enfriar a 50°C, agregar 2 ml/l de una solución concentrada de nitrato de plata 5 mg/ml (Phytotechnology Labs). Esta fórmula produce aproximadamente 20 placas.

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva indican el nivel de destreza de los entendidos en la técnica a la cual se refiere la presente invención. Todas las publicaciones y solicitudes de patente se incorporan en la presente a modo de referencia con el mismo alcance que si se hubiese indicado específicamente e individualmente que cada una de las publicaciones o solicitudes de patente individuales se incorporara a modo de referencia.

A pesar de que la invención que antecede ha sido descrita en detalle a modo de ejemplo a los efectos de facilitar la comprensión, resultará evidente que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en:
 - a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 11 ó 12, o un complemento de esta;
 - b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;
 - c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14;
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, en donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
 - e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14, en donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14; y
 - f) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con el complemento de la secuencia de nucleótidos de b) bajo condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas comprende la hibridación en 50% de formamida, 1M NaCl, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.1X SSC de 60 a 65 °C.
2. La molécula aislada o recombinante de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de nucleótidos está conectada operablemente a un promotor capaz de dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos en una célula vegetal.
3. La molécula aislada o recombinante de ácido nucleico de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia sintética que se diseñó para que se exprese en una planta.

4. La molécula aislada o recombinante de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona de cualquiera de las SEQ ID NO: 15 ó 16
5. Un casete de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en:
- a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 11 ó 12, o un complemento de esta;
 - b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;
 - c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14;
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, en donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
 - e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14, en donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14; y
 - f) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con el complemento de la secuencia de nucleótidos de b) bajo condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas comprende la hibridación en 50% de formamida, 1M NaCl, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.1X SSC de 60 a 65 °C.
6. El casete de expresión de la reivindicación 5, que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.
7. Una célula huésped bacteriana que contiene un casete de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en:

X

- a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 11 ó 12, o un complemento de esta;
- b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;
- c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14;
- d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, en donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
- e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14, en donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14; y
- f) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con el complemento de la secuencia de nucleótidos de b) bajo condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas comprende la hibridación en 50% de formamida, 1M NaCl, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.1X SSC de 60 a 65 °C.

8. Un polipéptido aislado con actividad insecticida, que se selecciona del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14;
- b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, en donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
- c) un polipéptido que se codifica mediante la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 11 ó 12;
- d) un polipéptido que se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dicho polipéptido presenta actividad insecticida;

e) un polipéptido que es una variante de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14, en donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14, en donde dicho polipéptido presenta actividad insecticida; y

f) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con el complemento de la secuencia de nucleótidos de b) bajo condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas comprende la hibridación en 50% de formamida, 1M NaCl, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.1X SSC de 60 a 65 °C

9. El polipéptido de la reivindicación 8, que comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas.

10. Un método para controlar o matar una población de plagas lepidópteras o coleópteras que comprende poner en contacto dicha población con una cantidad insecticidamente eficaz del polipéptido de la reivindicación 8, en donde dicha cantidad insecticidamente eficaz es una cantidad capaz de exterminar una plaga lepidóptera o coleóptera o una cantidad capaz de reducir notablemente el crecimiento, alimentación o desarrollo normal fisiológico de plagas lepidópteras o coleópteras.

11. Un método para producir un polipéptido con actividad insecticida, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7 en condiciones en las cuales se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.

12. Un método para proteger una planta de una plaga de insectos, que comprende introducir en dicha planta o célula de esta al menos un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida, en donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:

a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 3, 11 ó 12, o un complemento de esta;

b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, en donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;

c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14;

- d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, en donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
- e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14, en donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 5, 6, 13 ó 14; y
- f) una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con el complemento de la secuencia de nucleótidos de b) bajo condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas comprende la hibridación en 50% de formamida, 1M NaCl, 1% de SDS a 37 °C y un lavado en 0.1X SSC de 60 a 55 °C

13. La secuencia aislada o recombinante de ácidos nucleicos de la reivindicación 1, el polipéptido de la reivindicación 8, o el método de la reivindicación 12, en donde dicho(s) uno o más dominios se seleccionan de los siguientes dominios:

	(1)	10	20	30	40	50	60	70	80
axmi005	(1)	NNNNNTKLHARALPSFIDYFNGICYGATGKIDNNHIFKTDTGNTLDBETLKNQOLNKEIRDLDOVNGSLDGLIACGMLNTELSKEI							
axmi115	(1)	NNNNNTKLHARALPSFIDYFNGICYGATGKIDNNHIFKTDTGNTLDBETLKNQOLNKEIRDLDOVNGSLDGLIACGMLNTELSKEI							
									Section 2
	(30)	80	100	110	120	130	140	150	160
axmi005	(30)	IRIAHEGNOVINDVNHLDALNTLHIVLPKITSLSQVNHQVYALSQIEYLSKLOEISGELDIENVHVLINSTLIEITPVCRIKY							
axmi115	(30)	IRIAHEGNOVINDVNHLDALNTLHIVLPKITSLSQVNHQVYALSQIEYLSKLOEISGELDIENVHVLINSTLIEITPVCRIKY							
									Section 3
	(170)	470	190	200	210	220	230	240	250
axmi005	(170)	VNERFEELTFATITLTKVKK-----DETFADILDELTELAKSSITENDVGGFFVINTFNDVHVGKHLFGSSALKTASELIANENYK							
axmi115	(170)	VNERFDELTFATITLTKVKK-----DETFADILDELTELAKSSITENDVGGFFVINTFNDVHVGKHLFGSSALKTASELIANENYK							
									Section 4
	(260)	280	290	300	310	320	330	340	350
axmi005	(260)	TGSGEYGVNVTNPLIVITLQAKAFLLTTCRKLGLADIDYTSINNEHLWKEEFVNHILPTLSFTFENHVAKYVGSSEDAMHIVK							
axmi115	(260)	TGSGEYGVNVTNPLIVITLQAKAFLLTTCRKLGLADIDYTSINNEHLWKEEFVNHILPTLSFTFENHVAKYVGSSEDAMHIVK							
									Section 5
	(357)	370	380	390	400	410	420	430	440
axmi005	(357)	KPGHALVGFENSDSITLHYVEARLKNVYQYDKDSLSSENVGDNHLLCIDQSEGIYYNNHVPFNEYVITKIDFTSKKTLRYEVA							
axmi115	(357)	KPGHALVGFENSDSITLHYVEARLKNVYQYDKDSLSSENVGDNHLLCIDQSEGIYYNNHVPFNEYVITKIDFTSKKTLRYEVA							
	(446)	460	470	480	490	500	510	520	534
axmi005	(446)	HSYSSSTQETDLNKKVYK--SEAETRTUSA-KGGVYHPLGVISETFLTPINGFGLADENSRLTLTKESYVHELLAETPLSHNETK							
axmi115	(446)	HSYSSSTQETDLNKKVYK--SEAETRTUSA-KGGVYHPLGVISETFLTPINGFGLADENSRLTLTKESYVHELLAETPLSHNETK							
									Section 7
	(535)	540	550	560	570	580	590	600	610
axmi005	(535)	LIVPSSGFTSMFENGHLECYNLEFYARHMAVYDHTGIVNGTRALVYHKGCGEFOFISGDLKRTESVDOYVGEHSHLHMENTG							
axmi115	(535)	LIVPSSGFTSMFENGHLECYNLEFYARHMAVYDHTGIVNGTRALVYHKGCGEFOFISGDLKRTESVDOYVGEHSHLHMENTG							
									Section 8
	(624)	630	640	650	660	670	680	690	700
axmi005	(624)	YHHEZTHNKLSDYDTIRKFTTQDRIKGVYLELSQVDFARQDNYTIEISPSKLLQPELHNNHVIPTSTHISWTLTYOGGS							
axmi115	(624)	YHHEZTHNKLSDYDTIRKFTTQDRIKGVYLELSQVDFARQDNYTIEISPSKLLQPELHNNHVIPTSTHISWTLTYOGGS							
									Section 9
	(713)	720	730	740	750	760	770	780	790
axmi005	(713)	INLKNLQDQSTFTFMYVSVG-DARYNIRYK-EVLFENPVYSG--AKDQSLIFTHLQSNFYELISQGNHLYGGLVYFNHVSIF							
axmi115	(713)	INLKNLQDQSTFTFMYVSVG-DARYNIRYK-EVLFENPVYSG--AKDQSLIFTHLQSNFYELISQGNHLYGGLVYFNHVSIF							
									Section 10
	(802)	810	820	830	840	850	860	870	880
axmi005	(802)	---							
axmi115	(802)	EVIE							