

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

10-158993



PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-158993-00000-0000

Fecha: 2010-12-17 16:00:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR -
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

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

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: C07K 14/325, C12N 15/82

71. SOLICITANTES: ATHENIX CORPORATION

DOMICILIO: 108 T.W. Alexander Drive, P.O. BOX 110347,
Research Triangle Park, NC 27709, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., 17 DIC. 2010

Redo
09-02-2011



PETITOR

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-158993- -00000-0000

Fecha: 2010-12-17 16:00:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

cación

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTES
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

①

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I☐ Capítulo II

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **ATHENIX CORPORATION**Dirección: **108 T.W. Alexander Drive
P.O. BOX 110347
Research Triangle Park, NC 27709
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**Domicilio: **Research Triangle Park, NC
ESTADOS UNIDO DE AMERICA**Lugar de Constitución: **ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA**

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: **MARGARITA CASTELLANOS A.**Dirección: **CALLE 94A No. 7A-09**Teléfono: **7560770** Fax: **7550158**E-mail: **info@castellanosyco.com**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número **39'779.654** TPA **70.819**

④

INVENTOR (ES) (72)

VER ANEXO # 1

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/US2009/049527

Fecha

02/07/2009

Publicación Internacional No.

WO 2010/003065 A2

Fecha

07/01/2010

⑥

Título (54)

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

⑦

Clasificación Internacional (51)

C07K 14/325, C12N 15/82

⑧

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

US

02/07/2008

61/077,812

US

10/03/2009

61/158,953

⑨

Comprobantes de pago Nos.

10-101,423 y 10-101,431

Fecha

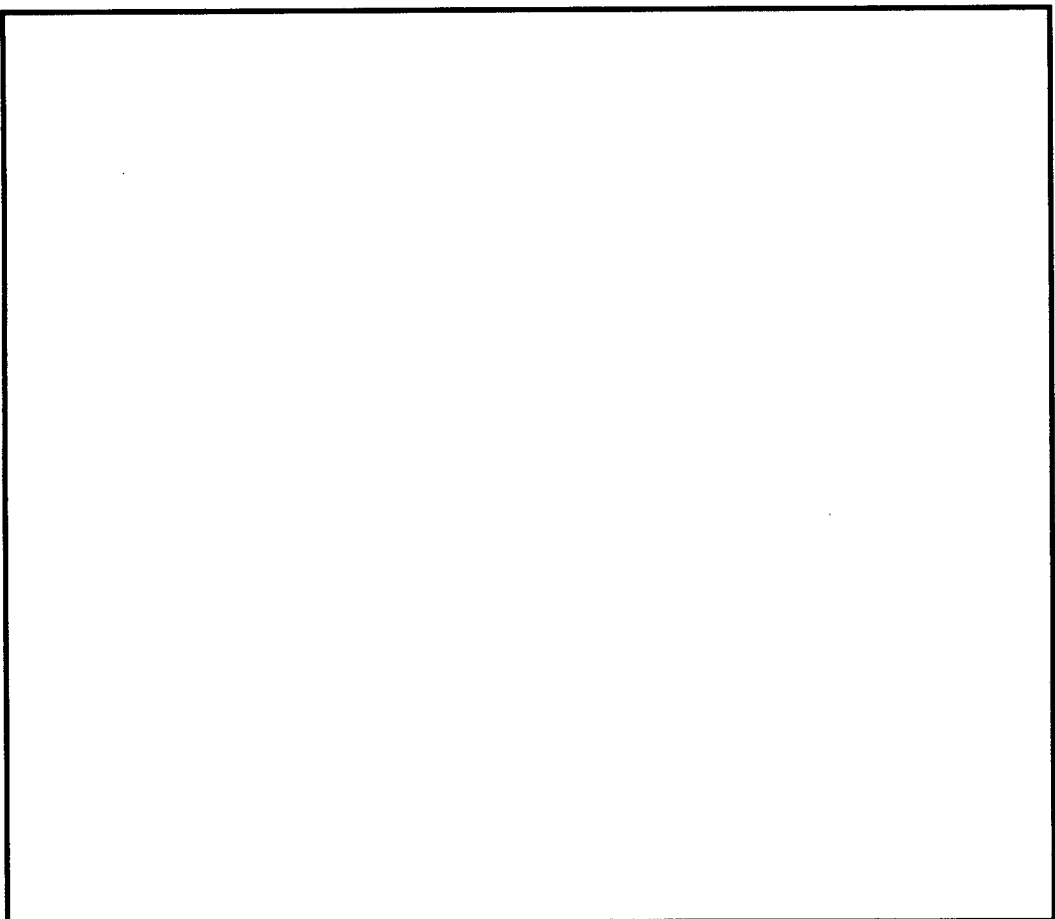
Noviembre 29 de 2010

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 Anexos

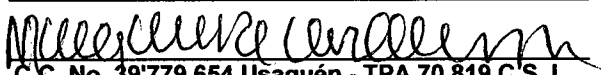
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso, junto con la sustitución del mismo a mi favor
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta Propietario, Extracto para la publicación

11 FIGURA CARACTERISTICA:



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO

FIRMA: 

C.C. No. 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 C.S.J.

17 Dic 2010

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

ANEXO # 1
INVENTORES

1. **KIMBERLY S. SAMPSON**
5505 Frenchman's Creek Dr.
Durham, NC 27713
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
2. **SHRUTI AGARWAL**
4 Penhurst Court
Durham, NC 27713
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
3. **CHRIS CAMPBELL**
108 Charolais Trail
Cary, NC 27513
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
4. **BRIAN MCNULTY**
1112 Tonsler Drive
Raleigh, NC 27604
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
5. **DANIEL J. TOMSO**
114 Vista del Rio Dr.
Bahama, NC 27503
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
6. **NADINE CAROZZI**
8308 Meadow Ridge Court
Raleigh, NC 27615
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
7. **TRACY HARGISS**
318 Oxfordshire Lane
Chapel Hill, NC 27517
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
8. **MICHAEL G. KOZIEL**
1601 Liatris Lane
Raleigh, NC 27613
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
9. **NICHOLAS B. DUCK**
1227 Tartarian Trail
Apex, NC 27502
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
10. **VOLKER HEINRICH**
2709 Willow Pines Place
Raleigh, NC 27614
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 200176029-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 101,431
FECHA : NOVIEMBRE 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-158993-00000-0000

Fecha: 2010-12-17 16:00:07
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 129

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387632453	29/11/2010	9,306,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
5 50005-01-01 SOLICITUDES	*** REINTEGRACION UNITARIA ADICIONAL	234,000.00
	TOTAL :	234,000.00

SON: DOSCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P2093
5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 101,423
FECHA : NOVIEMBRE 29 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-158993-00000-0000

Fecha: 2010-12-17 16:00:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	387632453	29/11/2010	9,305,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	534,000.00
	TOTAL :	\$ 534,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
7 January 2010 (07.01.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/003065 A2

(51) International Patent Classification:
C07K 14/325 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

RICHS, Volker [US/US]; 2709 Willow Pines Place,
Raleigh, NC 27614 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2009/049527

(74) Agents: **ARROYO, Blas, P.** et al.; Alston & Bird LLP,
Bank Of America Plaza, 101 South Tryon Street, Suite
4000, Charlotte, NC 28280-4000 (US).

(22) International Filing Date:
2 July 2009 (02.07.2009)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/077,812 2 July 2008 (02.07.2008) US
61/158,953 10 March 2009 (10.03.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US):
ATHENIX CORPORATION [US/US]; Post Office Box
110347, 108 T.w. Alexander Drive, Research Triangle
Park, NC 27709 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **SAMPSON, Kim-
berly, S.** [US/US]; 5505 Frenchman's Creek Drive,
Durham, NC 27713 (US). **AGARWAL, Shruti** [IN/US];
4 Penhurst Court, Durham, NC 27713 (US). **CAMP-
BELL, Chris** [US/US]; 108 Charolais Trail, Cary, NC
27513 (US). **MCNULTY, Brian** [US/US]; 1112 Tonsler
Drive, Raleigh, NC 27604 (US). **TOMSO, Daniel, J.**
[US/US]; 114 Vista Del Rio Drive, Bahama, NC 27503
(US). **CAROZZI, Nadine** [US/US]; 8308 Meadow Ridge
Court, Raleigh, NC 27615 (US). **HARGISS, Tracy** [US/
US]; 318 Oxfordshire Lane, Chapel Hill, NC 27517 (US).
KOZIEL, Michael, G. [US/US]; 1601 Liatris Lane,
Raleigh, NC 27613 (US). **DUCK, Nicholas, B.** [US/US];
1227 Tartarian Trail, Apex, NC 27502 (US). **HEIN-**

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished
upon receipt of that report (Rule 48.2(g))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 AND AXMI-184: INSECTICIDAL PROTEINS AND METHODS
FOR THEIR USE

(57) Abstract: Compositions and methods for conferring insecticidal activity to host cells are provided. Compositions comprising a coding sequence for a delta-endotoxin polypeptide are provided. The coding sequences can be used in DNA constructs or ex-
pression cassettes for transformation and expression in host cells. Compositions also comprise transformed host cells. In particu-
lar, isolated delta-endotoxin nucleic acid molecules are provided. Additionally, amino acid sequences corresponding to the
polynucleotides are encompassed, and antibodies specifically binding to those amino acid sequences. In particular, the present in-
vention provides for isolated nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences encoding the amino acid sequence shown in
SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, or the nucleotide sequence set forth in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11, or 12, as well as variants and frag-
ments thereof.

WO 2010/003065 A2

AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 AND AXMI-184: INSECTICIDAL
PROTEINS AND METHODS FOR THEIR USE

5

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to the field of molecular biology. Provided are novel genes that encode insecticidal proteins. These proteins and the nucleic acid sequences that encode them are useful in preparing insecticidal formulations and in the production of transgenic insect-resistant plants.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Bacillus thuringiensis is a Gram-positive spore forming soil bacterium characterized by its ability to produce crystalline inclusions that are specifically toxic to certain orders and species of insects, but are harmless to plants and other non-targeted organisms. For this reason, compositions including *Bacillus thuringiensis* strains or their insecticidal proteins can be used as environmentally-acceptable insecticides to control agricultural insect pests or insect vectors for a variety of human or animal diseases.

Crystal (Cry) proteins (delta-endotoxins) from *Bacillus thuringiensis* have potent insecticidal activity against predominantly Lepidopteran, Dipteran, and Coleopteran larvae. These proteins also have shown activity against *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Phthiraptera*, *Mallophaga*, and *Acari* pest orders, as well as other invertebrate orders such as *Nemathelminthes*, *Platyhelminthes*, and *Sarcomastigophora* (Feitelson (1993) The *Bacillus Thuringiensis* family tree. In *Advanced Engineered Pesticides*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.) These proteins were originally classified as CryI to CryV based primarily on their insecticidal activity. The major classes were *Lepidoptera*-specific (I), *Lepidoptera*- and *Diptera*-specific (II), *Coleoptera*-specific (III), *Diptera*-specific (IV), and nematode-specific (V) and (VI). The proteins were further classified into subfamilies; more highly related proteins within each family were assigned divisional letters such

as *CryIA*, *CryIB*, *CryIC*, etc. Even more closely related proteins within each division were given names such as *CryIC1*, *CryIC2*, etc.

A new nomenclature was recently described for the Cry genes based upon amino acid sequence homology rather than insect target specificity (Crickmore *et al.* 5 (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813). In the new classification, each toxin is assigned a unique name incorporating a primary rank (an Arabic number), a secondary rank (an uppercase letter), a tertiary rank (a lowercase letter), and a quaternary rank (another Arabic number). In the new classification, Roman numerals have been exchanged for Arabic numerals in the primary rank. Proteins with less than 10 45% sequence identity have different primary ranks, and the criteria for secondary and tertiary ranks are 78% and 95%, respectively.

The crystal protein does not exhibit insecticidal activity until it has been ingested and solubilized in the insect midgut. The ingested protoxin is hydrolyzed by proteases in the insect digestive tract to an active toxic molecule. (Höfte and 15 Whiteley (1989) *Microbiol. Rev.* 53:242-255). This toxin binds to apical brush border receptors in the midgut of the target larvae and inserts into the apical membrane creating ion channels or pores, resulting in larval death.

Delta-endotoxins generally have five conserved sequence domains, and three conserved structural domains (see, for example, de Maagd *et al.* (2001) *Trends* 20 *Genetics* 17:193-199). The first conserved structural domain consists of seven alpha helices and is involved in membrane insertion and pore formation. Domain II consists of three beta-sheets arranged in a "Greek key" configuration, and domain III consists of two antiparallel beta-sheets in "jelly-roll" formation (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Domains II and III are involved in receptor recognition and binding, 25 and are therefore considered determinants of toxin specificity.

Aside from delta-endotoxins, there are several other known classes of pesticidal protein toxins. The VIP1/VIP2 toxins (see, for example, U.S. Patent 5,770,696) are binary pesticidal toxins that exhibit strong activity on insects by a mechanism believed to involve receptor-mediated endocytosis followed by cellular 30 toxification, similar to the mode of action of other binary ("A/B") toxins. A/B toxins such as VIP, C2, CDT, CST, or the *B. anthracis* edema and lethal toxins initially interact with target cells via a specific, receptor-mediated binding of "B" components as monomers. These monomers then form homoheptamers. The "B" heptamer-receptor complex then acts as a docking platform that subsequently binds and allows

the translocation of an enzymatic "A" component(s) into the cytosol via receptor-mediated endocytosis. Once inside the cell's cytosol, "A" components inhibit normal cell function by, for example, ADP-ribosylation of G-actin, or increasing intracellular levels of cyclic AMP (cAMP). See Barth *et al.* (2004) *Microbiol Mol Biol Rev* 5 68:373--402.

The intensive use of *B. thuringiensis*-based insecticides has already given rise to resistance in field populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Ferré and Van Rie (2002) *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533). The most common mechanism of resistance is the reduction of binding of the toxin to its specific midgut receptor(s). 10 This may also confer cross-resistance to other toxins that share the same receptor (Ferré and Van Rie (2002)).

SUMMARY OF INVENTION

Compositions and methods for conferring insect resistance to bacteria, plants, 15 plant cells, tissues and seeds are provided. Compositions include nucleic acid molecules encoding sequences for delta-endotoxin polypeptides, vectors comprising those nucleic acid molecules, and host cells comprising the vectors. Compositions also include the polypeptide sequences of the endotoxin, and antibodies to those polypeptides. The nucleotide sequences can be used in DNA constructs or expression 20 cassettes for transformation and expression in organisms, including microorganisms and plants. The nucleotide or amino acid sequences may be synthetic sequences that have been designed for expression in an organism including, but not limited to, a microorganism or a plant. Compositions also comprise transformed bacteria, plants, plant cells, tissues, and seeds.

25 In particular, isolated nucleic acid molecules corresponding to delta-endotoxin nucleic acid sequences are provided. Additionally, amino acid sequences corresponding to the polynucleotides are encompassed. In particular, the present invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding the amino acid sequence shown in any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, 30 or 14, or a nucleotide sequence set forth in any of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12, as well as variants and fragments thereof. Nucleotide sequences that are complementary to a nucleotide sequence of the invention, or that hybridize to a sequence of the invention are also encompassed.

The compositions and methods of the invention are useful for the production of organisms with insecticide resistance, specifically bacteria and plants. These organisms and compositions derived from them are desirable for agricultural purposes. The compositions of the invention are also useful for generating altered or improved delta-endotoxin proteins that have insecticidal activity, or for detecting the presence of delta-endotoxin proteins or nucleic acids in products or organisms.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figures 1A and 1B show an alignment of AXMI-113 (SEQ ID NO:5), AXMI-005 (SEQ ID NO:4), and AXMI-115 (SEQ ID NO:6). The left and right arrows mark the boundaries of the C-terminal 1/3rd region of the proteins.

Figure 2 depicts domains within AXMI-005 and AXMI-115 that are swapped to generate new toxins.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention is drawn to compositions and methods for regulating insect resistance in organisms, particularly plants or plant cells. The methods involve transforming organisms with a nucleotide sequence encoding a delta-endotoxin protein of the invention. In particular, the nucleotide sequences of the invention are useful for preparing plants and microorganisms that possess insecticidal activity. Thus, transformed bacteria, plants, plant cells, plant tissues and seeds are provided. Compositions are delta-endotoxin nucleic acids and proteins of *Bacillus thuringiensis*. The sequences find use in the construction of expression vectors for subsequent transformation into organisms of interest, as probes for the isolation of other delta-endotoxin genes, and for the generation of altered insecticidal proteins by methods known in the art, such as domain swapping or DNA shuffling. See, for example, Table 2 and Figure 2. The proteins find use in controlling or killing lepidopteran, coleopteran, and other insect populations, and for producing compositions with insecticidal activity.

By "delta-endotoxin" is intended a toxin from *Bacillus thuringiensis* that has toxic activity against one or more pests, including, but not limited to, members of the *Lepidoptera*, *Diptera*, and *Coleoptera* orders, or a protein that has homology to such a

protein. In some cases, delta-endotoxin proteins have been isolated from other organisms, including *Clostridium bifermentans* and *Paenibacillus popilliae*. Delta-endotoxin proteins include amino acid sequences deduced from the full-length nucleotide sequences disclosed herein, and amino acid sequences that are shorter than the full-length sequences, either due to the use of an alternate downstream start site, or due to processing that produces a shorter protein having insecticidal activity. Processing may occur in the organism the protein is expressed in, or in the pest after ingestion of the protein.

Delta-endotoxins include proteins identified as *cry1* through *cry43*, *cyt1* and *cyt2*, and Cyt-like toxin. There are currently over 250 known species of delta-endotoxins with a wide range of specificities and toxicities. For an expansive list see Crickmore *et al.* (1998), *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:807-813, and for regular updates see Crickmore *et al.* (2003) "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature," at www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.

Provided herein are novel isolated nucleotide sequences that confer insecticidal activity. Also provided are the amino acid sequences of the delta-endotoxin proteins. The protein resulting from translation of this gene allows cells to control or kill insects that ingest it.

Isolated Nucleic Acid Molecules, and Variants and Fragments Thereof

One aspect of the invention pertains to isolated or recombinant nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences encoding delta-endotoxin proteins and polypeptides or biologically active portions thereof, as well as nucleic acid molecules sufficient for use as hybridization probes to identify delta-endotoxin encoding nucleic acids. As used herein, the term "nucleic acid molecule" is intended to include DNA molecules (e.g., recombinant DNA, cDNA or genomic DNA) and RNA molecules (e.g., mRNA) and analogs of the DNA or RNA generated using nucleotide analogs. The nucleic acid molecule can be single-stranded or double-stranded, but preferably is double-stranded DNA.

An "isolated" or "purified" nucleic acid molecule or protein, or biologically active portion thereof, is substantially free of other cellular material, or culture medium when produced by recombinant techniques, or substantially free of chemical precursors or other chemicals when chemically synthesized. Preferably, an "isolated" nucleic acid is free of sequences (preferably protein encoding sequences) that

naturally flank the nucleic acid (i.e., sequences located at the 5' and 3' ends of the nucleic acid) in the genomic DNA of the organism from which the nucleic acid is derived. For purposes of the invention, "isolated" when used to refer to nucleic acid molecules excludes isolated chromosomes. For example, in various embodiments, the isolated delta-endotoxin encoding nucleic acid molecule can contain less than about 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb, or 0.1 kb of nucleotide sequences that naturally flank the nucleic acid molecule in genomic DNA of the cell from which the nucleic acid is derived. A delta-endotoxin protein that is substantially free of cellular material includes preparations of protein having less than about 30%, 20%, 10%, or 5% (by dry weight) of non-delta-endotoxin protein (also referred to herein as a "contaminating protein").

Nucleotide sequences encoding the proteins of the present invention include the sequence set forth in SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12, and variants, fragments, and complements thereof. By "complement" is intended a nucleotide sequence that is sufficiently complementary to a given nucleotide sequence such that it can hybridize to the given nucleotide sequence to thereby form a stable duplex. The corresponding amino acid sequence for the delta-endotoxin protein encoded by this nucleotide sequence are set forth in SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14.

Nucleic acid molecules that are fragments of these delta-endotoxin encoding nucleotide sequences are also encompassed by the present invention. By "fragment" is intended a portion of the nucleotide sequence encoding a delta-endotoxin protein. A fragment of a nucleotide sequence may encode a biologically active portion of a delta-endotoxin protein, or it may be a fragment that can be used as a hybridization probe or PCR primer using methods disclosed below. Nucleic acid molecules that are fragments of a delta-endotoxin nucleotide sequence comprise at least about 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 contiguous nucleotides, or up to the number of nucleotides present in a full-length delta-endotoxin encoding nucleotide sequence disclosed herein depending upon the intended use. By "contiguous" nucleotides is intended nucleotide residues that are immediately adjacent to one another. Fragments of the nucleotide sequences of the present invention will encode protein fragments that retain the biological

activity of the delta-endotoxin protein and, hence, retain insecticidal activity. By “retains activity” is intended that the fragment will have at least about 30%, at least about 50%, at least about 70%, 80%, 90%, 95% or higher of the insecticidal activity of the delta-endotoxin protein. Methods for measuring insecticidal activity are well known in the art. See, for example, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews *et al.* (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; and U.S. Patent No. 5,743,477, all of which are herein incorporated by reference in their entirety.

A fragment of a delta-endotoxin encoding nucleotide sequence that encodes a biologically active portion of a protein of the invention will encode at least about 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 contiguous amino acids, or up to the total number of amino acids present in a full-length delta-endotoxin protein of the invention.

Preferred delta-endotoxin proteins of the present invention are encoded by a nucleotide sequence sufficiently identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12. By “sufficiently identical” is intended an amino acid or nucleotide sequence that has at least about 60% or 65% sequence identity, about 70% or 75% sequence identity, about 80% or 85% sequence identity, about 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or greater sequence identity compared to a reference sequence using one of the alignment programs described herein using standard parameters. One of skill in the art will recognize that these values can be appropriately adjusted to determine corresponding identity of proteins encoded by two nucleotide sequences by taking into account codon degeneracy, amino acid similarity, reading frame positioning, and the like.

To determine the percent identity of two amino acid sequences or of two nucleic acids, the sequences are aligned for optimal comparison purposes. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (i.e., percent identity = number of identical positions/total number of positions (e.g., overlapping positions) x 100). In one embodiment, the two sequences are the same length. In another embodiment, the comparison is across the entirety of the reference sequence (e.g., across the entirety of one of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12, or across the entirety of one of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14). The percent identity between two sequences can be determined using

techniques similar to those described below, with or without allowing gaps. In calculating percent identity, typically exact matches are counted.

The determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm. A nonlimiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of two sequences is the algorithm of Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264, modified as in Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Such an algorithm is incorporated into the BLASTN and BLASTX programs of Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403. BLAST nucleotide searches can be performed with the BLASTN program, score = 100, wordlength = 12, to obtain nucleotide sequences homologous to delta-endotoxin-like nucleic acid molecules of the invention. BLAST protein searches can be performed with the BLASTX program, score = 50, wordlength = 3, to obtain amino acid sequences homologous to delta-endotoxin protein molecules of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST (in BLAST 2.0) can be utilized as described in Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389. Alternatively, PSI-Blast can be used to perform an iterated search that detects distant relationships between molecules. See Altschul *et al.* (1997) *supra*. When utilizing BLAST, Gapped BLAST, and PSI-Blast programs, the default parameters of the respective programs (e.g., BLASTX and BLASTN) can be used. Alignment may also be performed manually by inspection.

Another non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of sequences is the ClustalW algorithm (Higgins *et al.* (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680). ClustalW compares sequences and aligns the entirety of the amino acid or DNA sequence, and thus can provide data about the sequence conservation of the entire amino acid sequence. The ClustalW algorithm is used in several commercially available DNA/amino acid analysis software packages, such as the ALIGNX module of the Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). After alignment of amino acid sequences with ClustalW, the percent amino acid identity can be assessed. A non-limiting example of a software program useful for analysis of ClustalW alignments is GENEDOC™. GENEDOC™ (Karl Nicholas) allows assessment of amino acid (or DNA) similarity and identity between multiple proteins. Another non-limiting example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of sequences is the algorithm of Myers and Miller (1988) *CABIOS* 4:11-17. Such an algorithm is incorporated into the ALIGN program (version 2.0),

which is part of the GCG Wisconsin Genetics Software Package, Version 10 (available from Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, USA). When utilizing the ALIGN program for comparing amino acid sequences, a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12, and a gap penalty of 4 can be used.

5 Unless otherwise stated, GAP Version 10, which uses the algorithm of Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48(3):443-453, will be used to determine sequence identity or similarity using the following parameters: % identity and % similarity for a nucleotide sequence using GAP Weight of 50 and Length Weight of 3, and the nwsgapdna.cmp scoring matrix; % identity or % similarity for an amino acid
10 sequence using GAP weight of 8 and length weight of 2, and the BLOSUM62 scoring program. Equivalent programs may also be used. By “equivalent program” is intended any sequence comparison program that, for any two sequences in question, generates an alignment having identical nucleotide residue matches and an identical percent sequence identity when compared to the corresponding alignment generated
15 by GAP Version 10. The invention also encompasses variant nucleic acid molecules. “Variants” of the delta-endotoxin encoding nucleotide sequences include those sequences that encode the delta-endotoxin proteins disclosed herein but that differ conservatively because of the degeneracy of the genetic code as well as those that are sufficiently identical as discussed above. Naturally occurring allelic variants can be
20 identified with the use of well-known molecular biology techniques, such as polymerase chain reaction (PCR) and hybridization techniques as outlined below. Variant nucleotide sequences also include synthetically derived nucleotide sequences that have been generated, for example, by using site-directed mutagenesis but which still encode the delta-endotoxin proteins disclosed in the present invention as
25 discussed below. Variant proteins encompassed by the present invention are biologically active, that is they continue to possess the desired biological activity of the native protein, that is, retaining insecticidal activity. By “retains activity” is intended that the variant will have at least about 30%, at least about 50%, at least about 70%, or at least about 80% of the insecticidal activity of the native protein.
30 Methods for measuring insecticidal activity are well known in the art. See, for example, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83: 2480-2485; Andrews *et al.* (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; and U.S. Patent No. 5,743,477, all of which are herein incorporated by reference in their entirety.

The skilled artisan will further appreciate that changes can be introduced by mutation of the nucleotide sequences of the invention thereby leading to changes in the amino acid sequence of the encoded delta-endotoxin proteins, without altering the biological activity of the proteins. Thus, variant isolated nucleic acid molecules can
5 be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions, or deletions into the corresponding nucleotide sequence disclosed herein, such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein. Mutations can be introduced by standard techniques, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Such variant nucleotide sequences are
10 also encompassed by the present invention.

For example, conservative amino acid substitutions may be made at one or more predicted, nonessential amino acid residues. A “nonessential” amino acid residue is a residue that can be altered from the wild-type sequence of a delta-endotoxin protein without altering the biological activity, whereas an “essential”
15 amino acid residue is required for biological activity. A “conservative amino acid substitution” is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains (e.g., aspartic
20 acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine).

Delta-endotoxins generally have five conserved sequence domains, and three conserved structural domains (see, for example, de Maagd *et al.* (2001) *Trends Genetics* 17:193-199). The first conserved structural domain consists of seven alpha helices and is involved in membrane insertion and pore formation. Domain II consists of three beta-sheets arranged in a Greek key configuration, and domain III consists of
30 two antiparallel beta-sheets in “jelly-roll” formation (de Maagd *et al.*, 2001, *supra*). Domains II and III are involved in receptor recognition and binding, and are therefore considered determinants of toxin specificity.

Amino acid substitutions may be made in nonconserved regions that retain function. In general, such substitutions would not be made for conserved amino acid

residues, or for amino acid residues residing within a conserved motif, where such residues are essential for protein activity. Examples of residues that are conserved and that may be essential for protein activity include, for example, residues that are identical between all proteins contained in an alignment of the amino acid sequences of the present invention and known delta-endotoxin sequences. Examples of residues that are conserved but that may allow conservative amino acid substitutions and still retain activity include, for example, residues that have only conservative substitutions between all proteins contained in an alignment of the amino acid sequences of the present invention and known delta-endotoxin sequences. However, one of skill in the art would understand that functional variants may have minor conserved or nonconserved alterations in the conserved residues.

Alternatively, variant nucleotide sequences can be made by introducing mutations randomly along all or part of the coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for ability to confer delta-endotoxin activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis, the encoded protein can be expressed recombinantly, and the activity of the protein can be determined using standard assay techniques.

Using methods such as PCR, hybridization, and the like corresponding delta-endotoxin sequences can be identified, such sequences having substantial identity to the sequences of the invention. See, for example, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) and Innis, *et al.* (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, NY).

In a hybridization method, all or part of the delta-endotoxin nucleotide sequence can be used to screen cDNA or genomic libraries. Methods for construction of such cDNA and genomic libraries are generally known in the art and are disclosed in Sambrook and Russell, 2001, *supra*. The so-called hybridization probes may be genomic DNA fragments, cDNA fragments, RNA fragments, or other oligonucleotides, and may be labeled with a detectable group such as ^{32}P , or any other detectable marker, such as other radioisotopes, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor. Probes for hybridization can be made by labeling synthetic oligonucleotides based on the known delta-endotoxin-encoding nucleotide sequence disclosed herein. Degenerate primers designed on the basis of conserved nucleotides or amino acid residues in the nucleotide sequence or encoded amino acid sequence

can additionally be used. The probe typically comprises a region of nucleotide sequence that hybridizes under stringent conditions to at least about 12, at least about 25, at least about 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, or 400 consecutive nucleotides of delta-endotoxin encoding nucleotide sequence of the invention or a
5 fragment or variant thereof. Methods for the preparation of probes for hybridization are generally known in the art and are disclosed in Sambrook and Russell, 2001, *supra* herein incorporated by reference.

For example, an entire delta-endotoxin sequence disclosed herein, or one or more portions thereof, may be used as a probe capable of specifically hybridizing to
10 corresponding delta-endotoxin-like sequences and messenger RNAs. To achieve specific hybridization under a variety of conditions, such probes include sequences that are unique and are preferably at least about 10 nucleotides in length, or at least about 20 nucleotides in length. Such probes may be used to amplify corresponding delta-endotoxin sequences from a chosen organism by PCR. This technique may be
15 used to isolate additional coding sequences from a desired organism or as a diagnostic assay to determine the presence of coding sequences in an organism. Hybridization techniques include hybridization screening of plated DNA libraries (either plaques or colonies; see, for example, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New
20 York).

Hybridization of such sequences may be carried out under stringent conditions. By “stringent conditions” or “stringent hybridization conditions” is intended conditions under which a probe will hybridize to its target sequence to a detectably greater degree than to other sequences (e.g., at least 2-fold over
25 background). Stringent conditions are sequence-dependent and will be different in depending upon circumstances. By controlling the stringency of the hybridization and/or washing conditions, target sequences that are 100% complementary to the probe can be identified (homologous probing). Alternatively, stringency conditions can be adjusted to allow some mismatching in sequences so that lower degrees of
30 similarity are detected (heterologous probing). Generally, a probe is less than about 1000 nucleotides in length, preferably less than 500 nucleotides in length.

Typically, stringent conditions will be those in which the salt concentration is less than about 1.5 M Na ion, typically about 0.01 to 1.0 M Na ion concentration (or other salts) at pH 7.0 to 8.3 and the temperature is at least about 30°C for short probes

(e.g., 10 to 50 nucleotides) and at least about 60°C for long probes (e.g., greater than 50 nucleotides). Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. Exemplary low stringency conditions include hybridization with a buffer solution of 30 to 35% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS (sodium dodecyl sulphate) at 37 °C, and a wash in 1X to 2X SSC (20X SSC = 3.0 M NaCl/0.3 M trisodium citrate) at 50 to 55 °C. Exemplary moderate stringency conditions include hybridization in 40 to 45% formamide, 1.0 M NaCl, 1% SDS at 37 °C, and a wash in 0.5X to 1X SSC at 55 to 60 °C. Exemplary high stringency conditions include hybridization in 50% formamide, 1 M NaCl, 1% SDS at 37 °C, and a wash in 0.1X SSC at 60 to 65 °C. Optionally, wash buffers may comprise about 0.1% to about 1% SDS. Duration of hybridization is generally less than about 24 hours, usually about 4 to about 12 hours.

Specificity is typically the function of post-hybridization washes, the critical factors being the ionic strength and temperature of the final wash solution. For DNA-DNA hybrids, the T_m can be approximated from the equation of Meinkoth and Wahl (1984) *Anal. Biochem.* 138:267-284: $T_m = 81.5^\circ\text{C} + 16.6 (\log M) + 0.41 (\%GC) - 0.61 (\% \text{ form}) - 500/L$; where M is the molarity of monovalent cations, %GC is the percentage of guanosine and cytosine nucleotides in the DNA, % form is the percentage of formamide in the hybridization solution, and L is the length of the hybrid in base pairs. The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of a complementary target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. T_m is reduced by about 1°C for each 1% of mismatching; thus, T_m , hybridization, and/or wash conditions can be adjusted to hybridize to sequences of the desired identity. For example, if sequences with $\geq 90\%$ identity are sought, the T_m can be decreased 10°C. Generally, stringent conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence and its complement at a defined ionic strength and pH. However, severely stringent conditions can utilize a hybridization and/or wash at 1, 2, 3, or 4°C lower than the thermal melting point (T_m); moderately stringent conditions can utilize a hybridization and/or wash at 6, 7, 8, 9, or 10°C lower than the thermal melting point (T_m); low stringency conditions can utilize a hybridization and/or wash at 11, 12, 13, 14, 15, or 20°C lower than the thermal melting point (T_m). Using the equation, hybridization and wash compositions, and desired T_m , those of ordinary skill will understand that variations in the stringency of hybridization and/or wash solutions are inherently described. If the desired degree of

mismatching results in a T_m of less than 45°C (aqueous solution) or 32°C (formamide solution), it is preferred to increase the SSC concentration so that a higher temperature can be used. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—*
5 *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Chapter 2 (Elsevier, New York); and Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York). See Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

10

Isolated Proteins and Variants and Fragments Thereof

Delta-endotoxin proteins are also encompassed within the present invention. By “delta-endotoxin protein” is intended a protein having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14. Fragments, biologically active portions, and
15 variants thereof are also provided, and may be used to practice the methods of the present invention.

“Fragments” or “biologically active portions” include polypeptide fragments comprising amino acid sequences sufficiently identical to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14 and that exhibit insecticidal activity. A
20 biologically active portion of a delta-endotoxin protein can be a polypeptide that is, for example, 10, 25, 50, 100 or more amino acids in length. Such biologically active portions can be prepared by recombinant techniques and evaluated for insecticidal activity. Methods for measuring insecticidal activity are well known in the art. See, for example, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews *et*
25 *al.* (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; and U.S. Patent No. 5,743,477, all of which are herein incorporated by reference in their entirety. As used here, a fragment comprises at least 8 contiguous amino acids of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14. The invention encompasses other fragments, however, such as any fragment in the protein greater
30 than about 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, or 1300 amino acids.

By “variants” is intended proteins or polypeptides having an amino acid sequence that is at least about 60%, 65%, about 70%, 75%, about 80%, 85%, about

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14. Variants also include polypeptides encoded by a nucleic acid molecule that hybridizes to the nucleic acid molecule of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12, or a complement thereof, under stringent conditions.

- 5 Variants include polypeptides that differ in amino acid sequence due to mutagenesis. Variant proteins encompassed by the present invention are biologically active, that is they continue to possess the desired biological activity of the native protein, that is, retaining insecticidal activity. Methods for measuring insecticidal activity are well known in the art. See, for example, Czapla and Lang (1990) *J. Econ. Entomol.* 83:2480-2485; Andrews *et al.* (1988) *Biochem. J.* 252:199-206; Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293; and U.S. Patent No. 5,743,477, all of which are herein incorporated by reference in their entirety.

- 15 Bacterial genes, such as the *axmi* genes of this invention, quite often possess multiple methionine initiation codons in proximity to the start of the open reading frame. Often, translation initiation at one or more of these start codons will lead to generation of a functional protein. These start codons can include ATG codons. However, bacteria such as *Bacillus sp.* also recognize the codon GTG as a start codon, and proteins that initiate translation at GTG codons contain a methionine at the first amino acid. Furthermore, it is not often determined *a priori* which of these codons are used naturally in the bacterium. Thus, it is understood that use of one of the alternate methionine codons may also lead to generation of delta-endotoxin proteins that encode insecticidal activity. These delta-endotoxin proteins are encompassed in the present invention and may be used in the methods of the present invention.

- 25 Antibodies to the polypeptides of the present invention, or to variants or fragments thereof, are also encompassed. Methods for producing antibodies are well known in the art (see, for example, Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; U.S. Patent No. 4,196,265).

30 Altered or Improved Variants

It is recognized that DNA sequences of a delta-endotoxin may be altered by various methods, and that these alterations may result in DNA sequences encoding proteins with amino acid sequences different than that encoded by a delta-endotoxin of the present invention. This protein may be altered in various ways including amino

acid substitutions, deletions, truncations, and insertions of one or more amino acids of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, including up to about 2, about 3, about 4, about 5, about 6, about 7, about 8, about 9, about 10, about 15, about 20, about 25, about 30, about 35, about 40, about 45, about 50, about 55, about 60, about 65, about 70, about 75, about 80, about 85, about 90, about 100, about 105, about 110, about 115, about 120, about 125, about 130 or more amino acid substitutions, deletions or insertions.

Methods for such manipulations are generally known in the art. For example, amino acid sequence variants of a delta-endotoxin protein can be prepared by mutations in the DNA. This may also be accomplished by one of several forms of mutagenesis and/or in directed evolution. In some aspects, the changes encoded in the amino acid sequence will not substantially affect the function of the protein. Such variants will possess the desired insecticidal activity. However, it is understood that the ability of a delta-endotoxin to confer insecticidal activity may be improved by the use of such techniques upon the compositions of this invention. For example, one may express a delta-endotoxin in host cells that exhibit high rates of base misincorporation during DNA replication, such as XL-1 Red (Stratagene). After propagation in such strains, one can isolate the delta-endotoxin DNA (for example by preparing plasmid DNA, or by amplifying by PCR and cloning the resulting PCR fragment into a vector), culture the delta-endotoxin mutations in a non-mutagenic strain, and identify mutated delta-endotoxin genes with insecticidal activity, for example by performing an assay to test for insecticidal activity. Generally, the protein is mixed and used in feeding assays. See, for example Marrone *et al.* (1985) *J. of Economic Entomology* 78:290-293. Such assays can include contacting plants with one or more insects and determining the plant's ability to survive and/or cause the death of the insects. Examples of mutations that result in increased toxicity are found in Schnepf *et al.* (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.

Alternatively, alterations may be made to the protein sequence of many proteins at the amino or carboxy terminus without substantially affecting activity. This can include insertions, deletions, or alterations introduced by modern molecular methods, such as PCR, including PCR amplifications that alter or extend the protein coding sequence by virtue of inclusion of amino acid encoding sequences in the oligonucleotides utilized in the PCR amplification. Alternatively, the protein sequences added can include entire protein-coding sequences, such as those used commonly in the art to generate protein fusions. Such fusion proteins are often used to

- (1) increase expression of a protein of interest (2) introduce a binding domain, enzymatic activity, or epitope to facilitate either protein purification, protein detection, or other experimental uses known in the art (3) target secretion or translation of a protein to a subcellular organelle, such as the periplasmic space of
- 5 Gram-negative bacteria, or the endoplasmic reticulum of eukaryotic cells, the latter of which often results in glycosylation of the protein.

Variant nucleotide and amino acid sequences of the present invention also encompass sequences derived from mutagenic and recombinogenic procedures such as DNA shuffling. With such a procedure, one or more different delta-endotoxin

10 protein coding regions can be used to create a new delta-endotoxin protein possessing the desired properties. In this manner, libraries of recombinant polynucleotides are generated from a population of related sequence polynucleotides comprising sequence regions that have substantial sequence identity and can be homologously recombined *in vitro* or *in vivo*. For example, using this approach, sequence motifs encoding a

15 domain of interest may be shuffled between a delta-endotoxin gene of the invention and other known delta-endotoxin genes to obtain a new gene coding for a protein with an improved property of interest, such as an increased insecticidal activity. Strategies for such DNA shuffling are known in the art. See, for example, Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751; Stemmer (1994) *Nature* 370:389-391;

20 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; and U.S. Patent Nos. 5,605,793 and 5,837,458.

Domain swapping or shuffling is another mechanism for generating altered delta-endotoxin proteins. Domains II and III may be swapped between delta-

25 endotoxin proteins, resulting in hybrid or chimeric toxins with improved insecticidal activity or target spectrum. Methods for generating recombinant proteins and testing them for insecticidal activity are well known in the art (see, for example, 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;

30 Schnepf *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930; Rang *et al.* 91999) *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925).

Vectors

A delta-endotoxin sequence of the invention may be provided in an expression cassette for expression in a plant of interest. By "plant expression cassette" is intended a DNA construct that is capable of resulting in the expression of a protein from an open reading frame in a plant cell. Typically these contain a promoter and a coding sequence. Often, such constructs will also contain a 3' untranslated region. Such constructs may contain a "signal sequence" or "leader sequence" to facilitate co-translational or post-translational transport of the peptide to certain intracellular structures such as the chloroplast (or other plastid), endoplasmic reticulum, or Golgi apparatus.

By "signal sequence" is intended a sequence that is known or suspected to result in cotranslational or post-translational peptide transport across the cell membrane. In eukaryotes, this typically involves secretion into the Golgi apparatus, with some resulting glycosylation. By "leader sequence" is intended any sequence that when translated, results in an amino acid sequence sufficient to trigger co-translational transport of the peptide chain to a sub-cellular organelle. Thus, this includes leader sequences targeting transport and/or glycosylation by passage into the endoplasmic reticulum, passage to vacuoles, plastids including chloroplasts, mitochondria, and the like.

By "plant transformation vector" is intended a DNA molecule that is necessary for efficient transformation of a plant cell. Such a molecule may consist of one or more plant expression cassettes, and may be organized into more than one "vector" DNA molecule. For example, binary vectors are plant transformation vectors that utilize two non-contiguous DNA vectors to encode all requisite cis- and trans-acting functions for transformation of plant cells (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). "Vector" refers to a nucleic acid construct designed for transfer between different host cells. "Expression vector" refers to a vector that has the ability to incorporate, integrate and express heterologous DNA sequences or fragments in a foreign cell. The cassette will include 5' and 3' regulatory sequences operably linked to a sequence of the invention. By "operably linked" is intended a functional linkage between a promoter and a second sequence, wherein the promoter sequence initiates and mediates transcription of the DNA sequence corresponding to the second sequence. Generally, operably linked means that the nucleic acid sequences being linked are contiguous and, where necessary to join two

protein coding regions, contiguous and in the same reading frame. The cassette may additionally contain at least one additional gene to be cotransformed into the organism. Alternatively, the additional gene(s) can be provided on multiple expression cassettes.

- 5 “Promoter” refers to a nucleic acid sequence that functions to direct transcription of a downstream coding sequence. The promoter together with other transcriptional and translational regulatory nucleic acid sequences (also termed “control sequences”) are necessary for the expression of a DNA sequence of interest.

Such an expression cassette is provided with a plurality of restriction sites for
10 insertion of the delta-endotoxin sequence to be under the transcriptional regulation of the regulatory regions.

The expression cassette will include in the 5'-3' direction of transcription, a transcriptional and translational initiation region (i.e., a promoter), a DNA sequence of the invention, and a translational and transcriptional termination region (i.e.,
15 termination region) functional in plants. The promoter may be native, or analogous, or foreign or heterologous, to the plant host and/or to the DNA sequence of the invention. Additionally, the promoter may be the natural sequence or alternatively a synthetic sequence. Where the promoter is “native” or “homologous” to the plant host, it is intended that the promoter is found in the native plant into which the
20 promoter is introduced. Where the promoter is “foreign” or “heterologous” to the DNA sequence of the invention, it is intended that the promoter is not the native or naturally occurring promoter for the operably linked DNA sequence of the invention.

The termination region may be native with the transcriptional initiation region, may be native with the operably linked DNA sequence of interest, may be native with
25 the plant host, or may be derived from another source (i.e., foreign or heterologous to the promoter, the DNA sequence of interest, the plant host, or any combination thereof). Convenient termination regions are available from the Ti-plasmid of *A. tumefaciens*, such as the octopine synthase and nopaline synthase termination regions. See also Guerineau *et al.* (1991) *Mol. Gen. Genet.* 262:141-144; Proudfoot (1991)
30 *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; and Joshi *et al.* (1987) *Nucleic Acid Res.* 15:9627-9639.

Where appropriate, the gene(s) may be optimized for increased expression in the transformed host cell. That is, the genes can be synthesized using host cell-preferred codons for improved expression, or may be synthesized using codons at a host-preferred codon usage frequency. Generally, the GC content of the gene will be increased. See, for example, Campbell and Gowri (1990) *Plant Physiol.* 92:1-11 for a discussion of host-preferred codon usage. Methods are available in the art for synthesizing plant-preferred genes. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,380,831, and 5,436,391, and Murray *et al.* (1989) *Nucleic Acids Res.* 17:477-498, herein incorporated by reference.

In one embodiment, the delta-endotoxin is targeted to the chloroplast for expression. In this manner, where the delta-endotoxin is not directly inserted into the chloroplast, the expression cassette will additionally contain a nucleic acid encoding a transit peptide to direct the delta-endotoxin to the chloroplasts. Such transit peptides are known in the art. See, for example, Von Heijne *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol. Rep.* 9:104-126; Clark *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 264:17544-17550; Della-Cioppa *et al.* (1987) *Plant Physiol.* 84:965-968; Romer *et al.* (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:1414-1421; and Shah *et al.* (1986) *Science* 233:478-481.

The delta-endotoxin gene to be targeted to the chloroplast may be optimized for expression in the chloroplast to account for differences in codon usage between the plant nucleus and this organelle. In this manner, the nucleic acids of interest may be synthesized using chloroplast-preferred codons. See, for example, U.S. Patent No. 5,380,831, herein incorporated by reference.

Plant Transformation

Methods of the invention involve introducing a nucleotide construct into a plant. By "introducing" is intended to present to the plant the nucleotide construct in such a manner that the construct gains access to the interior of a cell of the plant. The methods of the invention do not require that a particular method for introducing a nucleotide construct to a plant is used, only that the nucleotide construct gains access to the interior of at least one cell of the plant. Methods for introducing nucleotide constructs into plants are known in the art including, but not limited to, stable transformation methods, transient transformation methods, and virus-mediated methods.

By “plant” is intended whole plants, plant organs (e.g., leaves, stems, roots, etc.), seeds, plant cells, propagules, embryos and progeny of the same. Plant cells can be differentiated or undifferentiated (e.g. callus, suspension culture cells, protoplasts, leaf cells, root cells, phloem cells, pollen).

5 “Transgenic plants” or “transformed plants” or “stably transformed” plants or cells or tissues refers to plants that have incorporated or integrated exogenous nucleic acid sequences or DNA fragments into the plant cell. These nucleic acid sequences include those that are exogenous, or not present in the untransformed plant cell, as well as those that may be endogenous, or present in the untransformed plant cell.

10 “Heterologous” generally refers to the nucleic acid sequences that are not endogenous to the cell or part of the native genome in which they are present, and have been added to the cell by infection, transfection, microinjection, electroporation, microprojection, or the like.

Transformation of plant cells can be accomplished by one of several
15 techniques known in the art. The delta-endotoxin gene of the invention may be modified to obtain or enhance expression in plant cells. Typically a construct that expresses such a protein would contain a promoter to drive transcription of the gene, as well as a 3' untranslated region to allow transcription termination and polyadenylation. The organization of such constructs is well known in the art. In some
20 instances, it may be useful to engineer the gene such that the resulting peptide is secreted, or otherwise targeted within the plant cell. For example, the gene can be engineered to contain a signal peptide to facilitate transfer of the peptide to the endoplasmic reticulum. It may also be preferable to engineer the plant expression cassette to contain an intron, such that mRNA processing of the intron is required for
25 expression.

Typically this “plant expression cassette” will be inserted into a “plant transformation vector”. This plant transformation vector may be comprised of one or more DNA vectors needed for achieving plant transformation. For example, it is a common practice in the art to utilize plant transformation vectors that are comprised
30 of more than one contiguous DNA segment. These vectors are often referred to in the art as “binary vectors”. Binary vectors as well as vectors with helper plasmids are most often used for *Agrobacterium*-mediated transformation, where the size and complexity of DNA segments needed to achieve efficient transformation is quite large, and it is advantageous to separate functions onto separate DNA molecules.

Binary vectors typically contain a plasmid vector that contains the cis-acting sequences required for T-DNA transfer (such as left border and right border), a selectable marker that is engineered to be capable of expression in a plant cell, and a “gene of interest” (a gene engineered to be capable of expression in a plant cell for which generation of transgenic plants is desired). Also present on this plasmid vector are sequences required for bacterial replication. The cis-acting sequences are arranged in a fashion to allow efficient transfer into plant cells and expression therein. For example, the selectable marker gene and the delta-endotoxin are located between the left and right borders. Often a second plasmid vector contains the trans-acting factors that mediate T-DNA transfer from *Agrobacterium* to plant cells. This plasmid often contains the virulence functions (Vir genes) that allow infection of plant cells by *Agrobacterium*, and transfer of DNA by cleavage at border sequences and vir-mediated DNA transfer, as is understood in the art (Hellens and Mullineaux (2000) *Trends in Plant Science* 5:446-451). Several types of *Agrobacterium* strains (e.g. LBA4404, GV3101, EHA101, EHA105, etc.) can be used for plant transformation. The second plasmid vector is not necessary for transforming the plants by other methods such as microprojection, microinjection, electroporation, polyethylene glycol, etc.

In general, plant transformation methods involve transferring heterologous DNA into target plant cells (e.g. immature or mature embryos, suspension cultures, undifferentiated callus, protoplasts, etc.), followed by applying a maximum threshold level of appropriate selection (depending on the selectable marker gene) to recover the transformed plant cells from a group of untransformed cell mass. Explants are typically transferred to a fresh supply of the same medium and cultured routinely. Subsequently, the transformed cells are differentiated into shoots after placing on regeneration medium supplemented with a maximum threshold level of selecting agent. The shoots are then transferred to a selective rooting medium for recovering rooted shoot or plantlet. The transgenic plantlet then grows into a mature plant and produces fertile seeds (e.g. Hiei *et al.* (1994) *The Plant Journal* 6:271-282; Ishida *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:745-750). Explants are typically transferred to a fresh supply of the same medium and cultured routinely. A general description of the techniques and methods for generating transgenic plants are found in Ayres and Park (1994) *Critical Reviews in Plant Science* 13:219-239 and Bommineni and Jauhar (1997) *Maydica* 42:107-120. Since the transformed material contains many cells;

both transformed and non-transformed cells are present in any piece of subjected target callus or tissue or group of cells. The ability to kill non-transformed cells and allow transformed cells to proliferate results in transformed plant cultures. Often, the ability to remove non-transformed cells is a limitation to rapid recovery of

5 transformed plant cells and successful generation of transgenic plants.

Transformation protocols as well as protocols for introducing nucleotide sequences into plants may vary depending on the type of plant or plant cell, i.e., monocot or dicot, targeted for transformation. Generation of transgenic plants may be performed by one of several methods, including, but not limited to, microinjection,

10 electroporation, direct gene transfer, introduction of heterologous DNA by *Agrobacterium* into plant cells (*Agrobacterium*-mediated transformation), bombardment of plant cells with heterologous foreign DNA adhered to particles, ballistic particle acceleration, aerosol beam transformation (U.S. Published Application No. 20010026941; U.S. Patent No. 4,945,050; International Publication

15 No. WO 91/00915; U.S. Published Application No. 2002015066), *Lec1* transformation, and various other non-particle direct-mediated methods to transfer DNA.

Methods for transformation of chloroplasts are known in the art. See, for example, Svab *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8526-8530; Svab and

20 Maliga (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:913-917; Svab and Maliga (1993) *EMBO J.* 12:601-606. The method relies on particle gun delivery of DNA containing a selectable marker and targeting of the DNA to the plastid genome through homologous recombination. Additionally, plastid transformation can be accomplished by transactivation of a silent plastid-borne transgene by tissue-preferred

25 expression of a nuclear-encoded and plastid-directed RNA polymerase. Such a system has been reported in McBride *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7301-7305.

Following integration of heterologous foreign DNA into plant cells, one then applies a maximum threshold level of appropriate selection in the medium to kill the

30 untransformed cells and separate and proliferate the putatively transformed cells that survive from this selection treatment by transferring regularly to a fresh medium. By continuous passage and challenge with appropriate selection, one identifies and proliferates the cells that are transformed with the plasmid vector. Molecular and

biochemical methods can then be used to confirm the presence of the integrated heterologous gene of interest into the genome of the transgenic plant.

The cells that have been transformed may be grown into plants in accordance with conventional ways. See, for example, McCormick *et al.* (1986) *Plant Cell Reports* 5:81-84. These plants may then be grown, and either pollinated with the same transformed strain or different strains, and the resulting hybrid having constitutive expression of the desired phenotypic characteristic identified. Two or more generations may be grown to ensure that expression of the desired phenotypic characteristic is stably maintained and inherited and then seeds harvested to ensure expression of the desired phenotypic characteristic has been achieved. In this manner, the present invention provides transformed seed (also referred to as "transgenic seed") having a nucleotide construct of the invention, for example, an expression cassette of the invention, stably incorporated into their genome.

15 Evaluation of Plant Transformation

Following introduction of heterologous foreign DNA into plant cells, the transformation or integration of heterologous gene in the plant genome is confirmed by various methods such as analysis of nucleic acids, proteins and metabolites associated with the integrated gene.

20 PCR analysis is a rapid method to screen transformed cells, tissue or shoots for the presence of incorporated gene at the earlier stage before transplanting into the soil (Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). PCR is carried out using oligonucleotide primers specific to the gene of interest or *Agrobacterium* vector background, etc.

25 Plant transformation may be confirmed by Southern blot analysis of genomic DNA (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). In general, total DNA is extracted from the transformant, digested with appropriate restriction enzymes, resolved in an agarose gel and transferred to a nitrocellulose or nylon membrane. The membrane or "blot" is then probed with, for example, radiolabeled ³²P target DNA fragment to confirm the integration of introduced gene into the plant genome according to standard techniques (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

In Northern blot analysis, RNA is isolated from specific tissues of transformant, fractionated in a formaldehyde agarose gel, and blotted onto a nylon

filter according to standard procedures that are routinely used in the art (Sambrook and Russell, 2001, *supra*). Expression of RNA encoded by the delta-endotoxin is then tested by hybridizing the filter to a radioactive probe derived from a delta-endotoxin, by methods known in the art (Sambrook and Russell, 2001, *supra*).

- 5 Western blot, biochemical assays and the like may be carried out on the transgenic plants to confirm the presence of protein encoded by the delta-endotoxin gene by standard procedures (Sambrook and Russell, 2001, *supra*) using antibodies that bind to one or more epitopes present on the delta-endotoxin protein.

10 Insecticidal Activity in Plants

- In another aspect of the invention, one may generate transgenic plants expressing a delta-endotoxin that has insecticidal activity. Methods described above by way of example may be utilized to generate transgenic plants, but the manner in which the transgenic plant cells are generated is not critical to this invention. Methods
15 known or described in the art such as *Agrobacterium*-mediated transformation, biolistic transformation, and non-particle-mediated methods may be used at the discretion of the experimenter. Plants expressing a delta-endotoxin may be isolated by common methods described in the art, for example by transformation of callus, selection of transformed callus, and regeneration of fertile plants from such transgenic
20 callus. In such process, one may use any gene as a selectable marker so long as its expression in plant cells confers ability to identify or select for transformed cells.

- A number of markers have been developed for use with plant cells, such as resistance to chloramphenicol, the aminoglycoside G418, hygromycin, or the like. Other genes that encode a product involved in chloroplast metabolism may also be
25 used as selectable markers. For example, genes that provide resistance to plant herbicides such as glyphosate, bromoxynil, or imidazolinone may find particular use. Such genes have been reported (Stalker *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (bromoxynil resistance nitrilase gene); and Sathasivan *et al.* (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:2188 (AHAS imidazolinone resistance gene). Additionally, the genes disclosed
30 herein are useful as markers to assess transformation of bacterial or plant cells. Methods for detecting the presence of a transgene in a plant, plant organ (e.g., leaves, stems, roots, etc.), seed, plant cell, propagule, embryo or progeny of the same are well known in the art. In one embodiment, the presence of the transgene is detected by testing for insecticidal activity.

Fertile plants expressing a delta-endotoxin may be tested for insecticidal activity, and the plants showing optimal activity selected for further breeding. Methods are available in the art to assay for insect activity. Generally, the protein is mixed and used in feeding assays. See, for example Marrone *et al.* (1985) *J. of*

5 *Economic Entomology* 78:290-293.

The present invention may be used for transformation of any plant species, including, but not limited to, monocots and dicots. Examples of plants of interest include, but are not limited to, corn (maize), sorghum, wheat, sunflower, tomato, crucifers, peppers, potato, cotton, rice, soybean, sugarbeet, sugarcane, tobacco, barley, 10 and oilseed rape, *Brassica* sp., alfalfa, rye, millet, safflower, peanuts, sweet potato, cassava, coffee, coconut, pineapple, citrus trees, cocoa, tea, banana, avocado, fig, guava, mango, olive, papaya, cashew, macadamia, almond, oats, vegetables, ornamentals, and conifers.

Vegetables include, but are not limited to, tomatoes, lettuce, green beans, lima 15 beans, peas, and members of the genus *Curcumis* such as cucumber, cantaloupe, and musk melon. Ornamentals include, but are not limited to, azalea, hydrangea, hibiscus, roses, tulips, daffodils, petunias, carnation, poinsettia, and chrysanthemum. Preferably, plants of the present invention are crop plants (for example, maize, sorghum, wheat, sunflower, tomato, crucifers, peppers, potato, cotton, rice, soybean, sugarbeet, 20 sugarcane, tobacco, barley, oilseed rape, etc.).

Use in Insect Control

General methods for employing strains comprising a nucleotide sequence of the present invention, or a variant thereof, in insect control or in engineering other 25 organisms as insecticidal agents are known in the art. See, for example U.S. Patent No. 5,039,523 and EP 0480762A2.

The *Bacillus* strains containing a nucleotide sequence of the present invention, or a variant thereof, or the microorganisms that have been genetically altered to contain an insecticidal gene and protein may be used for protecting agricultural crops 30 and products from insects. In one aspect of the invention, whole, i.e., unlysed, cells of a toxin (insecticide)-producing organism are treated with reagents that prolong the activity of the toxin produced in the cell when the cell is applied to the environment of target insect(s).

Alternatively, the insecticide is produced by introducing a delta-endotoxin gene into a cellular host. Expression of the delta-endotoxin gene results, directly or indirectly, in the intracellular production and maintenance of the insecticide. In one aspect of this invention, these cells are then treated under conditions that prolong the activity of the toxin produced in the cell when the cell is applied to the environment of target insect(s). The resulting product retains the toxicity of the toxin. These naturally encapsulated insecticides may then be formulated in accordance with conventional techniques for application to the environment hosting a target insect, e.g., soil, water, and foliage of plants. See, for example EPA 0192319, and the references cited therein. Alternatively, one may formulate the cells expressing a gene of this invention such as to allow application of the resulting material as an insecticide.

Insecticidal compositions

The active ingredients of the present invention are normally applied in the form of compositions and can be applied to the crop area or plant to be treated, simultaneously or in succession, with other compounds. These compounds can be fertilizers, weed killers, cryoprotectants, surfactants, detergents, insecticidal soaps, dormant oils, polymers, and/or time-release or biodegradable carrier formulations that permit long-term dosing of a target area following a single application of the formulation. They can also be selective herbicides, chemical insecticides, virucides, microbicides, amoebicides, pesticides, fungicides, bacteriocides, nematocides, molluscicides or mixtures of several of these preparations, if desired, together with further agriculturally acceptable carriers, surfactants or application-promoting adjuvants customarily employed in the art of formulation. Suitable carriers and adjuvants can be solid or liquid and correspond to the substances ordinarily employed in formulation technology, e.g. natural or regenerated mineral substances, solvents, dispersants, wetting agents, tackifiers, binders or fertilizers. Likewise the formulations may be prepared into edible "baits" or fashioned into pest "traps" to permit feeding or ingestion by a target pest of the insecticidal formulation.

Methods of applying an active ingredient of the present invention or an agrochemical composition of the present invention that contains at least one of the insecticidal proteins produced by the bacterial strains of the present invention include leaf application, seed coating and soil application. The number of applications and

the rate of application depend on the intensity of infestation by the corresponding insect.

The composition may be formulated as a powder, dust, pellet, granule, spray, emulsion, colloid, solution, or such like, and may be prepared by such conventional means as desiccation, lyophilization, homogenation, extraction, filtration, centrifugation, sedimentation, or concentration of a culture of cells comprising the polypeptide. In all such compositions that contain at least one such insecticidal polypeptide, the polypeptide may be present in a concentration of from about 1% to about 99% by weight.

Lepidopteran, coleopteran, or other insects may be killed or reduced in numbers in a given area by the methods of the invention, or may be prophylactically applied to an environmental area to prevent infestation by a susceptible insect. Preferably the insect ingests, or is contacted with, an insecticidally-effective amount of the polypeptide. By "insecticidally-effective amount" is intended an amount of the insecticide that is able to bring about death to at least one insect, or to noticeably reduce insect growth, feeding, or normal physiological development. This amount will vary depending on such factors as, for example, the specific target insects to be controlled, the specific environment, location, plant, crop, or agricultural site to be treated, the environmental conditions, and the method, rate, concentration, stability, and quantity of application of the insecticidally-effective polypeptide composition. The formulations may also vary with respect to climatic conditions, environmental considerations, and/or frequency of application and/or severity of insect infestation.

The insecticide compositions described may be made by formulating either the bacterial cell, crystal and/or spore suspension, or isolated protein component with the desired agriculturally-acceptable carrier. The compositions may be formulated prior to administration in an appropriate means such as lyophilized, freeze-dried, desiccated, or in an aqueous carrier, medium or suitable diluent, such as saline or other buffer. The formulated compositions may be in the form of a dust or granular material, or a suspension in oil (vegetable or mineral), or water or oil/water emulsions, or as a wettable powder, or in combination with any other carrier material suitable for agricultural application. Suitable agricultural carriers can be solid or liquid and are well known in the art. The term "agriculturally-acceptable carrier" covers all adjuvants, inert components, dispersants, surfactants, tackifiers, binders, etc. that are ordinarily used in insecticide formulation technology; these are well

known to those skilled in insecticide formulation. The formulations may be mixed with one or more solid or liquid adjuvants and prepared by various means, e.g., by homogeneously mixing, blending and/or grinding the insecticidal composition with suitable adjuvants using conventional formulation techniques. Suitable formulations and application methods are described in U.S. Patent No. 6,468,523, herein incorporated by reference.

“Pest” includes but is not limited to, insects, fungi, bacteria, nematodes, mites, ticks, and the like. Insect pests include insects selected from the orders *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Lepidoptera*, *Mallophaga*, *Homoptera*, *Hemiptera*, *Orthoptera*, *Thysanoptera*, *Dermaptera*, *Isoptera*, *Anoplura*, *Siphonaptera*, *Trichoptera*, etc., particularly *Coleoptera*, *Lepidoptera*, and *Diptera*.

The order *Coleoptera* includes the suborders *Adephaga* and *Polyphaga*. Suborder *Adephaga* includes the superfamilies *Caraboidea* and *Gyrinoidea*, while suborder *Polyphaga* includes the superfamilies *Hydrophiloidea*, *Staphylinoidea*, *Cantharoidea*, *Cleroidea*, *Elateroidea*, *Dascilloidea*, *Dryopoidea*, *Byrrhoidea*, *Cucujoidea*, *Meloidea*, *Mordelloidea*, *Tenebrionoidea*, *Bostrichoidea*, *Scarabaeoidea*, *Cerambycoidea*, *Chrysomeloidea*, and *Curculionoidea*. Superfamily *Caraboidea* includes the families *Cicindelidae*, *Carabidae*, and *Dytiscidae*. Superfamily *Gyrinoidea* includes the family *Gyrinidae*. Superfamily *Hydrophiloidea* includes the family *Hydrophilidae*. Superfamily *Staphylinoidea* includes the families *Silphidae* and *Staphylinidae*. Superfamily *Cantharoidea* includes the families *Cantharidae* and *Lampyridae*. Superfamily *Cleroidea* includes the families *Cleridae* and *Dermestidae*. Superfamily *Elateroidea* includes the families *Elateridae* and *Buprestidae*. Superfamily *Cucujoidea* includes the family *Coccinellidae*. Superfamily *Meloidea* includes the family *Meloidae*. Superfamily *Tenebrionoidea* includes the family *Tenebrionidae*. Superfamily *Scarabaeoidea* includes the families *Passalidae* and *Scarabaeidae*. Superfamily *Cerambycoidea* includes the family *Cerambycidae*. Superfamily *Chrysomeloidea* includes the family *Chrysomelidae*. Superfamily *Curculionoidea* includes the families *Curculionidae* and *Scolytidae*.

The order *Diptera* includes the Suborders *Nematocera*, *Brachycera*, and *Cyclorrhapha*. Suborder *Nematocera* includes the families *Tipulidae*, *Psychodidae*, *Culicidae*, *Ceratopogonidae*, *Chironomidae*, *Simuliidae*, *Bibionidae*, and *Cecidomyiidae*. Suborder *Brachycera* includes the families *Stratiomyidae*, *Tabanidae*, *Therevidae*, *Asilidae*, *Mydidae*, *Bombyliidae*, and *Dolichopodidae*.

Suborder *Cyclorrhapha* includes the Divisions *Aschiza* and *Aschiza*. Division *Aschiza* includes the families *Phoridae*, *Syrphidae*, and *Conopidae*. Division *Aschiza* includes the Sections *Acalyptatae* and *Calyptatae*. Section *Acalyptatae* includes the families *Otitidae*, *Tephritidae*, *Agromyzidae*, and *Drosophilidae*. Section

5 *Calyptatae* includes the families *Hippoboscidae*, *Oestridae*, *Tachinidae*, *Anthomyiidae*, *Muscidae*, *Calliphoridae*, and *Sarcophagidae*.

The order *Lepidoptera* includes the families *Papilionidae*, *Pieridae*, *Lycaenidae*, *Nymphalidae*, *Danaidae*, *Satyridae*, *Hesperiidae*, *Sphingidae*, *Saturniidae*, *Geometridae*, *Arctiidae*, *Noctuidae*, *Lymantriidae*, *Sesiidae*, *Crambidae*,

10 and *Tineidae*.

Nematodes include parasitic nematodes such as root-knot, cyst, and lesion nematodes, including *Heterodera* spp., *Meloidogyne* spp., and *Globodera* spp.; particularly members of the cyst nematodes, including, but not limited to, *Heterodera glycines* (soybean cyst nematode); *Heterodera schachtii* (beet cyst nematode);

15 *Heterodera avenae* (cereal cyst nematode); and *Globodera rostochiensis* and *Globodera pailida* (potato cyst nematodes). Lesion nematodes include *Pratylenchus* spp.

Insect pests of the invention for the major crops include: Maize: *Ostrinia nubilalis*, European corn borer; *Agrotis ipsilon*, black cutworm; *Helicoverpa zea*, corn earworm; *Spodoptera frugiperda*, fall armyworm; *Diatraea grandiosella*,

20 southwestern corn borer; *Elasmopalpus lignosellus*, lesser cornstalk borer; *Diatraea saccharalis*, sugarcane borer; *Diabrotica virgifera*, western corn rootworm; *Diabrotica longicornis barberi*, northern corn rootworm; *Diabrotica undecimpunctata howardi*, southern corn rootworm; *Melanotus* spp., wireworms; *Cyclocephala borealis*,

25 northern masked chafer (white grub); *Cyclocephala immaculata*, southern masked chafer (white grub); *Popillia japonica*, Japanese beetle; *Chaetocnema pulicaria*, corn flea beetle; *Sphenophorus maidis*, maize billbug; *Rhopalosiphum maidis*, corn leaf aphid; *Anuraphis maidiradicis*, corn root aphid; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinch bug; *Melanoplus femurrubrum*, redlegged grasshopper;

30 *Melanoplus sanguinipes*, migratory grasshopper; *Hylemya platura*, seedcorn maggot; *Agromyza parvicornis*, corn blot leafminer; *Anaphothrips obscurus*, grass thrips; *Solenopsis milesta*, thief ant; *Tetranychus urticae*, twospotted spider mite; Sorghum: *Chilo partellus*, sorghum borer; *Spodoptera frugiperda*, fall armyworm; *Helicoverpa zea*, corn earworm; *Elasmopalpus lignosellus*, lesser cornstalk borer; *Feltia*

- subterranea*, granulate cutworm; *Phyllophaga crinita*, white grub; *Eleodes*,
Conoderus, and *Aeolus* spp., wireworms; *Oulema melanopus*, cereal leaf beetle;
Chaetocnema pulicaria, corn flea beetle; *Sphenophorus maidis*, maize billbug;
Rhopalosiphum maidis; corn leaf aphid; *Sipha flava*, yellow sugarcane aphid; *Blissus*
5 *leucopterus leucopterus*, chinch bug; *Contarinia sorghicola*, sorghum midge;
Tetranychus cinnabarinus, carmine spider mite; *Tetranychus urticae*, twospotted
spider mite; Wheat: *Pseudaletia unipunctata*, army worm; *Spodoptera frugiperda*,
fall armyworm; *Elasmopalpus lignosellus*, lesser cornstalk borer; *Agrotis orthogonia*,
western cutworm; *Elasmopalpus lignosellus*, lesser cornstalk borer; *Oulema*
10 *melanopus*, cereal leaf beetle; *Hypera punctata*, clover leaf weevil; *Diabrotica*
undecimpunctata howardi, southern corn rootworm; Russian wheat aphid; *Schizaphis*
graminum, greenbug; *Macrosiphum avenae*, English grain aphid; *Melanoplus*
femurrubrum, redlegged grasshopper; *Melanoplus differentialis*, differential
grasshopper; *Melanoplus sanguinipes*, migratory grasshopper; *Mayetiola destructor*,
15 Hessian fly; *Sitodiplosis mosellana*, wheat midge; *Meromyza americana*, wheat stem
maggot; *Hylemya coarctata*, wheat bulb fly; *Frankliniella fusca*, tobacco thrips;
Cephus cinctus, wheat stem sawfly; *Aceria tulipae*, wheat curl mite; Sunflower:
Suleima helianthana, sunflower bud moth; *Homoeosoma electellum*, sunflower moth;
zygogramma exclamationis, sunflower beetle; *Bothyrus gibbosus*, carrot beetle;
20 *Neolasioptera murtfeldtiana*, sunflower seed midge; Cotton: *Heliothis virescens*,
cotton budworm; *Helicoverpa zea*, cotton bollworm; *Spodoptera exigua*, beet
armyworm; *Pectinophora gossypiella*, pink bollworm; *Anthonomus grandis*, boll
weevil; *Aphis gossypii*, cotton aphid; *Pseudatomoscelis seriatus*, cotton fleahopper;
Trialeurodes abutilonea, bandedwinged whitefly; *Lygus lineolaris*, tarnished plant
25 bug; *Melanoplus femurrubrum*, redlegged grasshopper; *Melanoplus differentialis*,
differential grasshopper; *Thrips tabaci*, onion thrips; *Frankliniella fusca*, tobacco
thrips; *Tetranychus cinnabarinus*, carmine spider mite; *Tetranychus urticae*,
twospotted spider mite; Rice: *Diatraea saccharalis*, sugarcane borer; *Spodoptera*
frugiperda, fall armyworm; *Helicoverpa zea*, corn earworm; *Colaspis brunnea*, grape
30 colaspis; *Lissorhoptrus oryzophilus*, rice water weevil; *Sitophilus oryzae*, rice weevil;
Nephotettix nigropictus, rice leafhopper; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinch bug;
Acrosternum hilare, green stink bug; Soybean: *Pseudoplusia includens*, soybean
looper; *Anticarsia gemmatilis*, velvetbean caterpillar; *Plathypena scabra*, green
cloverworm; *Ostrinia nubilalis*, European corn borer; *Agrotis ipsilon*, black cutworm;

Spodoptera exigua, beet armyworm; *Heliothis virescens*, cotton budworm;
Helicoverpa zea, cotton bollworm; *Epilachna varivestis*, Mexican bean beetle; *Myzus*
persicae, green peach aphid; *Empoasca fabae*, potato leafhopper; *Acrosternum hilare*,
green stink bug; *Melanoplus femurrubrum*, redlegged grasshopper; *Melanoplus*
5 *differentialis*, differential grasshopper; *Hylemya platura*, seedcorn maggot;
Sericothrips variabilis, soybean thrips; *Thrips tabaci*, onion thrips; *Tetranychus*
turkestani, strawberry spider mite; *Tetranychus urticae*, twospotted spider mite;
Barley: *Ostrinia nubilalis*, European corn borer; *Agrotis ipsilon*, black cutworm;
Schizaphis graminum, greenbug; *Blissus leucopterus leucopterus*, chinch bug;
10 *Acrosternum hilare*, green stink bug; *Euschistus servus*, brown stink bug; *Delia*
platura, seedcorn maggot; *Mayetiola destructor*, Hessian fly; *Petrobia latens*, brown
wheat mite; Oil Seed Rape: *Brevicoryne brassicae*, cabbage aphid; *Phyllotreta*
cruciferae, Flea beetle; *Mamestra configurata*, Bertha armyworm; *Plutella xylostella*,
Diamond-back moth; *Delia* ssp., Root maggots.

15

Methods for increasing plant yield

Methods for increasing plant yield are provided. The methods comprise
introducing into a plant or plant cell a polynucleotide comprising an insecticidal
sequence disclosed herein. As defined herein, the “yield” of the plant refers to the
20 quality and/or quantity of biomass produced by the plant. By “biomass” is intended
any measured plant product. An increase in biomass production is any improvement
in the yield of the measured plant product. Increasing plant yield has several
commercial applications. For example, increasing plant leaf biomass may increase
the yield of leafy vegetables for human or animal consumption. Additionally,
25 increasing leaf biomass can be used to increase production of plant-derived
pharmaceutical or industrial products. An increase in yield can comprise any
statistically significant increase including, but not limited to, at least a 1% increase, at
least a 3% increase, at least a 5% increase, at least a 10% increase, at least a 20%
increase, at least a 30%, at least a 50%, at least a 70%, at least a 100% or a greater
30 increase in yield compared to a plant not expressing the insecticidal sequence.

In specific methods, plant yield is increased as a result of improved insect
resistance of a plant expressing an insecticidal protein disclosed herein. Expression of
the insecticidal protein results in a reduced ability of an insect to infest or feed on the
plant, thus improving plant yield.

The following examples are offered by way of illustration and not by way of limitation.

EXPERIMENTAL

5

Example 1. Discovery of a novel toxin gene Axmi115 from the *Bacillus thuringiensis* strain ATX12983.

The complete gene sequence was identified from the selected strain via the MiDAS genomics approach as follows:

10

- Preparation of extrachromosomal DNA from the strain.
Extrachromosomal DNA contains a mixture of some or all of the following: plasmids of various size; phage chromosomes; genomic DNA fragments not separated by the purification protocol; other uncharacterized extrachromosomal molecules.
- Mechanical or enzymatic shearing of the extrachromosomal DNA to generate size-distributed fragments.
- Sequencing of the fragmented DNA
- Identification of putative toxin genes via homology and/or other computational analyses.
- When required, sequence finishing of the gene of interest by one of several PCR or cloning strategies (e.g. TAIL-PCR).

15

20

The novel gene is referred to herein as *axmi-115* (SEQ ID NO:3), and the encoded amino acid referred to as AXMI-115 (SEQ ID NO:6). Synthetic nucleotide sequences encoding AXMI-115 is set forth in SEQ ID NO:15 and 16.

25

Gene and Protein Characteristics

Gene length, DNA base pairs: 2409

Protein length, amino acid residues: 803

30

Estimated protein molecular weight, Da: 90877

Known homologs and approximate percent identity:

Vip3Afl - 70.7%

Axmi005 - 70.4%

Axmi026 - 70.4%

Vip3Aa7 - 70.1

5 Example 2. Novel insecticidal protein AXMI-005 from the *Bacillus thuringiensis* strain ATX13002

 The AXMI-005 insecticidal gene was identified from the strain ATX13002 using the MiDAS approach as described in U.S. Patent Publication No. 20040014091, which is herein incorporated by reference in its entirety, using the following steps:
Steps taken in the current strategy to gene discovery:

10 Step 1: Culture from the strain was grown in large quantities. The plasmid DNA was then separated from the chromosomal DNA by a cesium chloride gradient spun in an ultracentrifuge. The purified plasmid DNA was then nebulized to a 5-10kb size range appropriate for coverage of an average sized coding region. The fragment ends were polished then ligated overnight into a vector cut with a restriction enzyme
15 producing blunt ends.

 Step 3: Once the shotgun library quality was checked and confirmed, colonies were grown, prepped and sequenced in a 96-well format. The library plates were end sequenced off of the vector backbone for initial screening.

 Step 5: All of the reads were compiled into an assembly project and aligned together
20 to form contigs. These contigs, along with any individual read that may not have been added to a contig, were analyzed using BLAST, using a batch format, against an internal database made up of all classes of known delta-endotoxin genes. Any contigs or individual reads that pulled up any homology to a known gene were analyzed further by selecting a single clone from the library that covered the entire
25 hypothesized coding region.

 Step 6: The individual clone covering the area of interest was then walked over read by read by designing primers to extend the sequence. This was done until both end reads of the clone were joined and the coverage was at least 2X. The completed contig of the single clone was then analyzed using BLAST (both blastn and blastx)
30 against a public database of all known insecticidal genes. Hits from both searches were then pulled from an internal database of all the genes (clipped to coding sequence only) and aligned with the completed library clone sequence to determine the percentage of divergence from the known gene.

4)

A novel gene, referred to herein as *axmi-005* (SEQ ID NO:1), and the encoded amino acid referred to as AXMI-005 (SEQ ID NO:4) was identified by this approach. Searching of public sequence databases, including the GENBANK® databases, showed that AXMI-005 is a unique protein, that has highest homology (94.9%) to the vip3Aa insecticidal protein (GenePept ID L48841).

A synthetic sequence encoding the AXMI-005 protein was designed and termed *optaxmi-005*. The nucleotide sequence is set forth in SEQ ID NO:7, and encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:9 (with the addition of a C-terminal histidine tag). The *optaxmi-005* gene disclosed herein can be used with or without the C-terminal histidine tag.

Example 3. Discovery of a novel toxin gene Axmi-113 from the *Bacillus thuringiensis* strain ATX12987.

The complete gene sequence was identified from the selected strain via the MiDAS genomics approach as follows:

- Preparation of extrachromosomal DNA from the strain.
Extrachromosomal DNA contains a mixture of some or all of the following: plasmids of various size; phage chromosomes; genomic DNA fragments not separated by the purification protocol; other uncharacterized extrachromosomal molecules.
- Mechanical or enzymatic shearing of the extrachromosomal DNA to generate size-distributed fragments.
- Sequencing of the fragmented DNA
- Identification of putative toxin genes via homology and/or other computational analyses.
- When required, sequence finishing of the gene of interest by one of several PCR or cloning strategies (e.g. TAIL-PCR).

The novel gene is referred to herein as *axmi-113* (SEQ ID NO:2), and the encoded amino acid referred to as AXMI-113 (SEQ ID NO:5).

Gene and Protein Characteristics

Gene length, DNA base pairs: 2385

Protein length, amino acid residues: 795

Estimated protein molecular weight, Da: 89475

Known homologs and approximate percent identity:

- Vip3Ah - 99%
- 5 Vip3Aa18 - 79.8%
- Axmi005 - 79%

A synthetic sequence encoding the AXMI-113 protein was designed and termed *optaxmi-113*. The nucleotide sequence is set forth in SEQ ID NO:8, and encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:4 or 14 (with the addition of a C-terminal histidine tag). The *optaxmi-113* gene disclosed herein can be used with or without the C-terminal histidine tag.

Example 4. Discovery of novel toxin genes Axmi-163 and Axmi-184 from the
Bacillus thuringiensis strain ATX14775.

The complete gene sequence for each was identified from the selected strain via the MiDAS genomics approach as follows:

- Preparation of extrachromosomal DNA from the strain.
 Extrachromosomal DNA contains a mixture of some or all of the following: plasmids of various size; phage chromosomes; genomic DNA fragments not separated by the purification protocol; other uncharacterized extrachromosomal molecules.
- Mechanical or enzymatic shearing of the extrachromosomal DNA to generate size-distributed fragments.
- 25 • Sequencing of the fragmented DNA
- Identification of putative toxin genes via homology and/or other computational analyses.
- When required, sequence finishing of the gene of interest by one of several PCR or cloning strategies (e.g. TAIL-PCR).

The novel gene referred to herein as *axmi-163* is set forth in SEQ ID NO:6, and the encoded amino acid referred to as AXMI-163 is set forth in SEQ ID NO:13.

Gene and Protein Characteristics

Gene length, DNA base pairs: 2370

Protein length, amino acid residues: 790

Estimated protein molecular weight, Da: 88,700

5 Known homologs and approximate percent identity:

SEQ ID NO:17 from U.S. Patent 7,129,212 – 98%

Axmi005 - 78%

10 The novel gene referred to herein as *axmi-184* is set forth in SEQ ID NO:12, and the encoded amino acid referred to as AXMI-184 is set forth in SEQ ID NO:14. Synthetic nucleotide sequences encoding AXMI-184 are set forth in SEQ ID NO:17 and 18.

Gene and Protein Characteristics

15 Gene length, DNA base pairs: 2370

Protein length, amino acid residues: 790

Estimated protein molecular weight, Da: 88,300

Known homologs and approximate percent identity:

Vip3Afl -93%

20 Axmi005 - 86%

Example 5. Construction of synthetic sequences

In one aspect of the invention, synthetic *axmi* sequences are generated. These synthetic sequences have an altered DNA sequence relative to the parent *axmi* sequence, and encode a protein that is collinear with the parent AXMI protein to which it corresponds, but lacks the C-terminal “crystal domain” present in many delta-endotoxin proteins.

25 In another aspect of the invention, modified versions of synthetic genes are designed such that the resulting peptide is targeted to a plant organelle, such as the endoplasmic reticulum or the apoplast. Peptide sequences known to result in targeting of fusion proteins to plant organelles are known in the art. For example, the N-terminal region of the acid phosphatase gene from the White Lupin *Lupinus albus* (Genebank ID GI:14276838; Miller *et al.* (2001) Plant Physiology 127: 594-606) is known in the art to result in endoplasmic reticulum targeting of heterologous proteins.

If the resulting fusion protein also contains an endoplasmic retention sequence comprising the peptide N-terminus-lysine-aspartic acid-glutamic acid-leucine (i.e. the "KDEL" motif (SEQ ID NO:19) at the C-terminus, the fusion protein will be targeted to the endoplasmic reticulum. If the fusion protein lacks an endoplasmic reticulum targeting sequence at the C-terminus, the protein will be targeted to the endoplasmic reticulum, but will ultimately be sequestered in the apoplast.

Example 6. Expression in *Bacillus*

As an example of the expression of the genes and proteins of the invention in *Bacillus* species, the insecticidal gene disclosed herein is amplified by PCR, and the PCR product is cloned into the *Bacillus* expression vector pAX916, or another suitable vector, by methods well known in the art. The resulting *Bacillus* strain, containing the vector with *axmi* gene is cultured on a conventional growth media, such as CYS media (10 g/l Bacto-casitone; 3 g/l yeast extract; 6 g/l KH_2PO_4 ; 14 g/l K_2HPO_4 ; 0.5 mM MgSO_4 ; 0.05 mM MnCl_2 ; 0.05 mM FeSO_4), until sporulation is evident by microscopic examination. Samples are prepared and tested for activity in bioassays.

Example 7. Expression in *E. coli*

As an example of a method of expression of the genes and proteins of the invention in *E. coli* based systems, the complete ORF of each *axmi* gene is cloned into an *E. coli* expression vector based on pRSF1b. The resulting clones are confirmed by restriction analysis and finally, by complete sequencing of the cloned gene.

For expression in *E. coli*, BL21*DE3 is transformed with the vector expressing the *axmi* gene. Single colonies are inoculated in LB supplemented with kanamycin and grown overnight at 37°C. The following day, fresh medium is inoculated in duplicate with 1% of overnight culture and grown at 37°C to logarithmic phase. Subsequently, cultures are induced with 1mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 3 hours at 37°C or overnight at 20°C. Each cell pellet is suspended in 50mM sodium carbonate buffer, pH 10.5 supplemented with 1mM DTT dithiothreitol and sonicated. Samples are prepared and tested for activity in bioassays.

Example 8. Expression of AXMI-115, AXMI-113, and AXMI-005 in *E. coli*

E. coli clones were generated that contained DNA segments containing the complete open reading frame as well as a portion of the DNA region naturally occurring upstream and adjacent to each gene. This DNA segment for each of *axmi-113* (SEQ ID:5), *axmi-115* (SEQ ID NO:6) or *axmi-005* (SEQ ID NO:4) was amplified and cloned into the vector pAX916, to yield the clones pAX5463, pAX5464 and pAX5465 respectively. The resulting clones were confirmed by restriction analysis and by complete sequencing of the cloned fragments.

E. coli cells were transformed with each of the clones pAX5463, pAX5464 and pAX5465.

axmi005, *axmi113* and *axmi115* genes that had their codons optimized for expression in corn, and had a C-terminal his6-tag added, were also expressed from *E. coli* expression vector utilizing T7 promoter. In addition, constructs were also generated that expressed N-terminal his6-tagged or untagged versions of *optaxmi005* (pAX5475, pAX5478) and *optaxmi115* (pAX5476, pAX5477).

Single *E. coli* colonies of the *axmi-115*, *axmi-113*, and *axmi-005* expressing clones were then grown overnight at 37°C in LB medium. The following day, fresh medium was inoculated in duplicate with 1% of overnight culture and grown at 37°C to logarithmic phase. Subsequently, cultures were induced with 1mM IPTG overnight at 20°C. The resulting cells were collected by centrifugation, and suspended in either 50mM sodium carbonate buffer, pH 10.5 supplemented with 1mM DTT or 50mM Tris Cl buffer, pH 8 with 1mM DTT prior to sonication. SDS-PAGE analysis showed expression of a ~ 90kD protein in all samples.

Example 9. Insect Bioassays of *E. coli* expressed proteins

Soluble extracts containing AXMI-005, AXMI-113, or AXMI-115 were tested in insect assays with appropriate controls. Twenty four well tissue culture plates (Corning) were filled with 1 ml of multi-species diet (Bio-Serv) and allowed to solidify. Once solidified, 40 µl of protein sample was placed on the diet surface of each well and allowed to soak in/dry at room temperature. Depending upon the experiment, either egg masses or neonate larvae were placed in each well. Plates were sealed with gas-permeable membranes (Research Products International) and incubated at 25 °C and 90% relative humidity. After five or seven days, samples were scored visually compared to a buffer only or non-transformed extract control.

Strong activity of AXMI-005 extracts was observed on *Helicoverpa zea* (HZ), *Heliothis virescens* (HV), Fall Armyworm (FAW), Black cutworm (BCW), Sugarcane borer (SCB), and Velvet Bean caterpillar (VBC). AXMI-005 also showed activity on Southwestern Corn Borer (SWCB).

5 Strong activity of AXMI-115 extracts was observed on *Heliothis virescens*, Fall Armyworm, Black cutworm, and Velvet Bean caterpillar. AXMI-115 also exhibited activity on the European Corn Borer (ECB), SCB, SWCB, and Diamondback moth (DBM). Activity of AXMI-115 on *Helicoverpa zea* (HZ) was less pronounced than for the other insects tested, but was still significant.

10 Activity of each of the AXMI-005 and AXMI-115 extracts was scored, and assigned a number from 1 to 5 based on relative activity in the assays. A summary of the scores in a particular assay is shown in Table 1.

AXMI-005 showed some activity on SWCB (score of 2) and high levels of activity on Hz, Hv, FAW, BCW and VBC (scores of 4 to 5). AXMI-115 showed high levels of activity on SWCB (80% mortality), ECB, FAW and VBC (scores of 4 to 5) and lesser activity on Hz and Hv. AXMI-113 also showed high activity on SWCB (score of 4 with 20% mortality) and on SCB. No activity was seen on the other insects tested.

20 Table 1. Insecticidal activity of AXMI-115, AXMI-113, and 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
ECB live infest	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% mortality	3; 50% mortality	2	ND	4; 20% mortality
SCB	ND	3; 25% mortality	ND	4; 100% mortality	3; 50% mortality

DBM	ND	2/3	0	0	0
-----	----	-----	---	---	---

* = represented as stunt and mortality percent where stunting is scored according to the following scale:

Score	Definition
0	No Activity
1	Slight, non-uniform stunt
2	Non-uniform stunt
3	Uniform stunt
4	Uniform stunt with mortality (expressed as a percentage)
5	Uniform stunt with 100% mortality

5

Example 10. Bioassay of Axmi184

Gene Expression and Purification

- The DNA region encoding the toxin domain of Axmi184 was cloned into an *E. coli* expression vector pMAL-C4x behind the *malE* gene coding for Maltose binding protein (MBP). This in-frame fusion resulted in MBP-Axmi084 fusion protein expression in *E. coli*.
- For expression in *E. coli*, BL21*DE3 was transformed with individual plasmids. Single colony was inoculated in LB supplemented with carbenicillin and glucose, and grown overnight at 37°C. The following day, fresh medium was inoculated with 1% of overnight culture and grown at 37°C to logarithmic phase. Subsequently, cultures were induced with 0.3mM IPTG for overnight at 20°C. Each cell pellet was suspended in 20mM Tris-Cl buffer, pH 7.4 +200mM NaCl+1mM DTT+ protease inhibitors and sonicated. Analysis by SDS-PAGE confirmed expression of fusion proteins.
- Total cell free extracts were run over amylose column attached to FPLC for affinity purification of MBP-AXMI184 fusion proteins. Bound fusion protein was eluted from the resin with 10mM maltose solution. Purified fusion proteins were then cleaved with either Factor Xa or trypsin to remove the amino terminal MBP tag from the AXMI184 protein. Cleavage and solubility of the proteins was determined by SDS-PAGE.
- Cleaved proteins were tested in insect assays with appropriate controls. A 5- day read of the plates showed following activities of AXMI-184 against Diamondback moth.

Example 11. Domain swapping

axmi005, *axmi113* and *axmi115* genes that had their codons optimized for expression in corn were used in this example. Plasmids expressing untagged versions of *optaxmi005* (pAX5478), *optaxmi113* (pAX5493) and *optaxmi115* (pAX5477) were used to design DNA swap constructs as describe here.

AXMI-005, AXMI-113 and AXMI-115 have significant sequence identity/similarity in their N-terminal 2/3rd region. The remaining 1/3rd region in their C-termini (CT) shows substantial sequence divergence as seen in the protein sequence alignment provided as Figures 1A and 1B.

The protein region of AXMI-113 between the forward and reverse arrows shown in Figure 1 was replaced with the corresponding fragment of either AXMI-005 (to give pAX5492) or AXMI-115 (pAX5494).

For expression in *E. coli*, BL21*DE3 was transformed with individual constructs. A single colony was inoculated in LB supplemented with kanamycin and grown overnight at 37°C. The following day, fresh medium was inoculated in duplicate with 1% of overnight culture and grown at 37°C to logarithmic phase. Subsequently, cultures were induced with 1mM IPTG overnight at 20°C. Cell pellet was suspended in 50mM sodium carbonate buffer, pH 10.5 supplemented with 1mM DTT, and sonicated. Analysis by SDS-PAGE showed extremely good soluble expression of all proteins.

Filter sterilized, soluble extracts expressing OptAxmi005, 113, 115, Optaxmi113+CT of Optaxmi005 and Optaxmi113+CT of Optaxmi115 were tested in insect assays with appropriate controls. As shown in Example 9, AXMI-113 showed high activity on SWCB (25% mortality). It showed an additional activity on SCB (50% mortality).

Also as shown in Example 9, AXMI-005 showed activity on SWCB, Hz, Hv, FAW, BCW and VBC. It showed an additional activity on SCB (25% mortality). AXMI-115 was also found to have some activity on SCB.

The fusion of AXMI-113+CT of AXMI-005 showed all of the insect activities seen with AXMI-005. In other words, replacement of the C-terminal fragment of AXMI-113 with that of AXMI-005 bestowed upon it the insect activities that were otherwise missing in its naturally occurring form.

Additional toxin protein sequences can be generated by swapping domains from one protein into another. For example, one or more of the AXMI-005 domains shown in Figure 2 are introduced into AXMI-115. The domains are introduced using the sense (“s”) and antisense (“a”) oligonucleotides shown in Table 2. The portion of the axmi-005 sequence that is being introduced into the *axmi-115* sequence is shown in bold print. The flanking sequences in each oligonucleotide are *axmi-115* sequences that are used for annealing the oligonucleotides to the *axmi-115* template. The number following the term “sub” in each primer name corresponds to the numbered boxes in Figure 2. Similar oligonucleotides can be designed to swap domains between multiple sequences, for example, between the AXMI-005, AXMI-113, AXMI-115, AXMI-163 and AXMI-184 sequences described herein.

Table 2.

Oligonucleotide primer	Sequence	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

49
50

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

axmil15sub6 s	GAG GAG TTC CAA ACA ATT ACC AAG AGG TTC ACC ACC GGC ACA GAT TTG AGC CAG ACC	48
axmil15sub6 a	GGT CTG GCT CAA ATC TGT GCC GGT GGT GAA CCT CTT GGT AAT TGT TTG GAA CTC CTC	49
axmil15sub7 s	CAC CTC AGA AAC AGA TTT GAA GGG CGT CTA CCT CAT CTT GAA GAG CCA AAA TGG ATA T	50
axmil15sub7 a	ATA TCC ATT TTG GCT CTT CAA GAT GAG GTA GAC GCC CTT CAA ATC TGT TTC TGA GGT G	51
axmil15sub9 s	TCC TGG AGG CCA AGC CAT CAG AGA AGC TGC TCA GCC CGG AGC TCA	52
axmil15sub9 a	TGA GCT CCG GGC TGA GCA GCT TCT CTG ATG GCT TGG CCT CCA GGA	53
axmil15sub13 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
axmil15sub13 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
axmil15sub18 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
axmil15sub18 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
axmil15sub4 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
axmil15sub4 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
axmil15sub8 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
axmil15sub8 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

Example 12. Additional Assays for Pesticidal Activity

The ability of an insecticidal protein to act as a pesticide upon a pest is often assessed in a number of ways. One way well known in the art is to perform a feeding assay. In such a feeding assay, one exposes the pest to a sample containing either
5 compounds to be tested, or control samples. Often this is performed by placing the material to be tested, or a suitable dilution of such material, onto a material that the pest will ingest, such as an artificial diet. The material to be tested may be in a liquid, solid, or slurry form. The material to be tested may be placed upon the surface and then allowed to dry or incorporate into the diet. Alternatively, the material to be
10 tested may be mixed with a molten artificial diet, then dispensed into the assay chamber. The assay chamber may be, for example, a cup, a dish, or a well of a microtiter plate.

Assays for sucking pests (for example aphids) may involve separating the test material from the insect by a partition, ideally a portion that can be pierced by the
15 sucking mouth parts of the sucking insect, to allow ingestion of the test material. Often the test material is mixed with a feeding stimulant, such as sucrose, to promote ingestion of the test compound.

Other types of assays can include microinjection of the test material into the mouth, or gut of the pest, as well as development of transgenic plants, followed by
20 test of the ability of the pest to feed upon the transgenic plant. Plant testing may involve isolation of the plant parts normally consumed, for example, small cages attached to a leaf, or isolation of entire plants in cages containing insects.

Other methods and approaches to assay pests are known in the art, and can be found, for example in Robertson, J. L. & H. K. Preisler. 1992. *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC, Boca Raton, FL. Alternatively, assays are commonly
25 described in the journals "Arthropod Management Tests" and "Journal of Economic Entomology" or by discussion with members of the Entomological Society of America (ESA).

30 Example 13. Vectoring of the Insecticidal genes of the invention for Plant Expression

Each of the coding regions of the genes of the invention is connected independently with appropriate promoter and terminator sequences for expression in plants. Such sequences are well known in the art and may include the rice actin promoter or maize ubiquitin promoter for expression in monocots, the *Arabidopsis*

UBQ3 promoter or CaMV 35S promoter for expression in dicots, and the nos or PinII terminators. Techniques for producing and confirming promoter – gene – terminator constructs also are well known in the art.

5 Example 14. Transformation of the genes of the invention into Plant Cells by
 Agrobacterium-Mediated Transformation

 Ears are collected 8-12 days after pollination. Embryos are isolated from the ears, and those embryos 0.8-1.5 mm in size are used for transformation. Embryos are plated scutellum side-up on a suitable incubation media, and incubated overnight at
 10 25°C in the dark. However, it is not necessary *per se* to incubate the embryos overnight. Embryos are contacted with an *Agrobacterium* strain containing the appropriate vectors for Ti plasmid mediated transfer for 5-10 min, and then plated onto co-cultivation media for 3 days (25°C in the dark). After co-cultivation, explants are transferred to recovery period media for five days (at 25°C in the dark). Explants
 15 are incubated in selection media for up to eight weeks, depending on the nature and characteristics of the particular selection utilized. After the selection period, the resulting callus is transferred to embryo maturation media, until the formation of mature somatic embryos is observed. The resulting mature somatic embryos are then placed under low light, and the process of regeneration is initiated as known in the art.
 20 The resulting shoots are allowed to root on rooting media, and the resulting plants are transferred to nursery pots and propagated as transgenic plants.

Example 15. Transformation of Maize Cells with the insecticidal genes of the
 invention

25 Maize ears are collected 8-12 days after pollination. Embryos are isolated from the ears, and those embryos 0.8-1.5 mm in size are used for transformation. Embryos are plated scutellum side-up on a suitable incubation media, such as DN62A5S media (3.98 g/L N6 Salts; 1 mL/L (of 1000x Stock) N6 Vitamins; 800 mg/L L-Asparagine; 100 mg/L Myo-inositol; 1.4 g/L L-Proline; 100 mg/L Casaminoacids; 50 g/L
 30 sucrose; 1 mL/L (of 1 mg/mL Stock) 2,4-D), and incubated overnight at 25°C in the dark.

 The resulting explants are transferred to mesh squares (30-40 per plate), transferred onto osmotic media for 30-45 minutes, then transferred to a beaming plate (see, for example, PCT Publication No. WO/0138514 and U.S. Patent No. 5,240,842).

DNA constructs designed to express the genes of the invention in plant cells are accelerated into plant tissue using an aerosol beam accelerator, using conditions essentially as described in PCT Publication No. WO/0138514. After beaming, embryos are incubated for 30 min on osmotic media, then placed onto incubation media overnight at 25°C in the dark. To avoid unduly damaging beamed explants, they are incubated for at least 24 hours prior to transfer to recovery media. Embryos are then spread onto recovery period media, for 5 days, 25°C in the dark, then transferred to a selection media. Explants are incubated in selection media for up to eight weeks, depending on the nature and characteristics of the particular selection utilized. After the selection period, the resulting callus is transferred to embryo maturation media, until the formation of mature somatic embryos is observed. The resulting mature somatic embryos are then placed under low light, and the process of regeneration is initiated by methods known in the art. The resulting shoots are allowed to root on rooting media, and the resulting plants are transferred to nursery pots and propagated as transgenic plants.

Materials

DN62A5S Media

Components	per liter	Source
Chu'S N6 Basal Salt Mixture (Prod. No. C 416)	3.98 g/L	Phytotechnology Labs
Chu's N6 Vitamin Solution (Prod. No. C 149)	1 mL/L (of 1000x Stock)	Phytotechnology Labs
L-Asparagine	800 mg/L	Phytotechnology Labs
Myo-inositol	100 mg/L	Sigma
L-Proline	1.4 g/L	Phytotechnology Labs
Casaminoacids	100 mg/L	Fisher Scientific
Sucrose	50 g/L	Phytotechnology Labs
2,4-D (Prod. No. D-7299)	1 mL/L (of 1 mg/mL Stock)	Sigma

Adjust the pH of the solution to pH to 5.8 with 1N KOH/1N KCl, add Gelrite (Sigma) to 3g/L, and autoclave. After cooling to 50°C, add 2 ml/l of a 5 mg/ml stock solution of Silver Nitrate (Phytotechnology Labs). This recipe yields about 20 plates.

All publications and patent applications mentioned in the specification are indicative of the level of skill of those skilled in the art to which this invention pertains. All publications and patent applications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication or patent application was

5 specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

Although the foregoing invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity of understanding, it will be obvious that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

THAT WHICH IS CLAIMED:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - 5 a) the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12, or a complement thereof;
 - b) a nucleotide sequence having at least 96% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 12, wherein said nucleotide sequence encodes a protein having insecticidal activity, or a complement thereof;
 - 10 c) a nucleotide sequence having at least 90% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, wherein said nucleotide sequence encodes a protein having insecticidal activity, or a complement thereof;
 - d) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14;
 - 15 e) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 96% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or 14, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity;
 - f) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an
20 amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:6, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity; and
 - g) a nucleotide sequence encoding an insecticidal polypeptide that is a variant of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, wherein said variant is the result of one
25 or more domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14 being exchanged with the corresponding domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14.
2. The isolated nucleic acid molecule of claim 1, wherein said nucleotide sequence is a synthetic sequence that has been designed for expression in a plant.
30
3. The nucleic acid molecule of claim 2, wherein said synthetic sequence is selected from any of SEQ ID NO:15, 16, 17, or 18.

4. An expression cassette comprising the nucleic acid molecule of claim 1.
5. The expression cassette of claim 4, further comprising a nucleic acid molecule encoding a heterologous polypeptide.
6. A plant or a bacterial host cell that contains the expression cassette of claim 4.
7. An isolated polypeptide with insecticidal activity, selected from the group consisting of:
- a) a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14;
 - b) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 96% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or 14, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity;
 - c) a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:6, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity;
 - d) a polypeptide that is encoded by the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12;
 - e) a polypeptide that is encoded by a nucleotide sequence that is at least 96% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 12, wherein said polypeptide has insecticidal activity;
 - f) a polypeptide that is encoded by a nucleotide sequence that is at least 90% identical to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, wherein said polypeptide has insecticidal activity; and
 - g) a polypeptide that is a variant of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, wherein said variant is the result of one or more domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14 being exchanged with the corresponding domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, wherein said polypeptide has insecticidal activity.
8. The polypeptide of claim 7 further comprising heterologous amino acid sequences.

9. An antibody that selectively binds to the polypeptide of claim 7.
10. A composition comprising the polypeptide of claim 7.
- 5 11. The composition of claim 10, wherein said composition is selected from the group consisting of a powder, dust, pellet, granule, spray, emulsion, colloid, and solution, and wherein optionally said composition is prepared by desiccation, lyophilization, homogenization, extraction, filtration, centrifugation, sedimentation, or
10 concentration of a culture of *Bacillus thuringiensis* cells.
12. A method for controlling or killing a lepidopteran or coleopteran pest population comprising contacting said population with an insecticidally-effective amount of the polypeptide of claim 7.
- 15 13. A method for producing a polypeptide with insecticidal activity, comprising culturing the host cell of claim 6 under conditions in which the nucleic acid molecule encoding the polypeptide is expressed.
- 20 14. A plant having stably incorporated into its genome a DNA construct comprising a nucleotide sequence that encodes a protein having insecticidal activity, wherein said nucleotide sequence is selected from the group consisting of:
 - a) the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or
12;
 - 25 b) a nucleotide sequence having at least 96% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 12, wherein said nucleotide sequence encodes a protein having insecticidal activity;
 - c) a nucleotide sequence having at least 90% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, wherein said nucleotide sequence encodes
30 a protein having insecticidal activity;
 - d) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14;
 - e) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 96% sequence identity to the amino acid

sequence of SEQ ID NO:4 or 14, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity;

- 5 f) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:6, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity; and

- g) a nucleotide sequence encoding an insecticidal polypeptide that is a variant of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, wherein said variant is the result of one or more domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14 being exchanged with the
10 corresponding domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14;
wherein said nucleotide sequence is operably linked to a promoter that drives expression of a coding sequence in a plant cell.

- 15 15. The plant of claim 14, wherein said plant is a plant cell.

16. A transgenic seed of the plant of claim 14, wherein said seed comprises a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

- a) the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or
12;
20 b) a nucleotide sequence having at least 96% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 12, wherein said nucleotide sequence encodes a protein having insecticidal activity;
c) a nucleotide sequence having at least 90% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, wherein said nucleotide sequence encodes
25 a protein having insecticidal activity;
d) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14;
e) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 96% sequence identity to the amino acid
30 sequence of SEQ ID NO:4 or 14, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity;
f) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the amino acid

sequence of SEQ ID NO:6, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity; and

- g) a nucleotide sequence encoding an insecticidal polypeptide that is a variant of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, wherein said variant is the result of one or more domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14 being exchanged with the corresponding domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14..

17. A method for protecting a plant from an insect pest, comprising introducing into said plant or cell thereof at least one expression vector comprising a nucleotide sequence that encodes a insecticidal polypeptide, wherein said nucleotide sequence is selected from the group consisting of:

- a) the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO:1, 2, 3, 11, or 12;
- b) a nucleotide sequence having at least 96% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 12, wherein said nucleotide sequence encodes a protein having insecticidal activity;
- c) a nucleotide sequence having at least 90% sequence identity to the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, wherein said nucleotide sequence encodes a protein having insecticidal activity;
- d) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14;
- e) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 96% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:4 or 14, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity; and,
- f) a nucleotide sequence that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 90% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:6, wherein said amino acid sequence has insecticidal activity;
- g) a nucleotide sequence encoding an insecticidal polypeptide that is a variant of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14, wherein said variant is the result of one or more domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14 being exchanged with the corresponding domain(s) of SEQ ID NO:4, 5, 6, 13, or 14.

18. The isolated nucleic acid sequence of claim 1, the polypeptide of claim 7, the plant of claim 14, the plant cell of claim 15, the seed of claim 16, or the method of claim 17, wherein said one or more domains is selected from the domains outlined in Figure 2.

5

19. The plant of claim 14, the plant cell of claim 17, the plant seed of claim 18, or the method of claim 19, wherein said plant is selected from the group consisting of maize, sorghum, wheat, cabbage, sunflower, tomato, crucifers, peppers, potato, cotton, rice, soybean, sugarbeet, sugarcane, tobacco, barley, and oilseed rape.

10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

**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.

10

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.

15

20

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

25

30

35

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").

- Las secuencias de nucleótidos que codifican a las proteínas de la presente
- 25 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.

- 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
- 35 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 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 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 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 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 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 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 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 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,
15 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 monovalentes, %GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el
30 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*

20 *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, 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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
35 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.

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 epítopos 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

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

Las plagas de insectos de la invención para los cultivos principales

20 incluyen: 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

30 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 platyura*, gusano de la

35 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.*,
5 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*,
25 escarabajo del girasol; *Bothyrus gibbosus*, escarabajo de la zanahoria; *Neolasioptera murfeldtiana*, 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 algodouero; *Aphis gossypii*, pulgón del
30 algodouero; *Pseudatomoscelis seriatus*, pulga saltona del algodouero; *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; *Franklinkiella 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 turkestanii*, 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 20 oleaginosa: *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 o animal. Asimismo, el aumento en la biomasa de las hojas de la planta puede 35 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
20 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:

25 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
30 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.

35 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.

Etapa 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.
- 5 • 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
- 10 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%

Se diseñó una secuencia sintética que codifica la proteína AXMI-113 y se

25 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: 4 o 14 (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*.

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

35 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).

- 15 El nuevo gen denominado *axmi-163* en la presente, se describe en la SEQ ID NO:6 y el aminoácido codificado denominado AXMI-163 se describe en la SEQ ID NO:13.

Características del gen y de la proteína

- 20 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%
 25 Axmi005 – 78%

- 30 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

- 35 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* (Genbank 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.

25 Ejemplo 6. Expresión en *Bacillus*

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:5), *axmi-115* (SEQ ID NO:6) o *axmi-005* (SEQ ID NO: 4) 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 durante la noche a 25°C en la oscuridad. Sin embargo, no es realmente necesario incubarlos 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 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. 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 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 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).
5 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
10 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
15 pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona del grupo que consiste en:
 - 5 a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 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 96% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 ó 12, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta
10 actividad insecticida, o un complemento de esta;
 - c) 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, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;
 - 15 d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14;
 - e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 14,
20 donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
 - f) 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, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida; y
 - 25 g) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14.
- 30 2. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia sintética que se diseñó para que se exprese en una planta.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, donde dicha secuencia sintética se selecciona de cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 16, 17 ó 18.
- 35 4. Un casete de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

5. El casete de expresión de la reivindicación 4 que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.
6. Una planta o una célula huésped bacteriana que contiene el casete de expresión de la reivindicación 4.
- 5 7. 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: 4, 5, 6, 13 ó 14;
- b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una
10 identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 14, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
- c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una
15 identidad de secuencia de al menos un 90% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
- d) un polipéptido que se codifica mediante la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12;
- e) un polipéptido que se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que
20 es al menos un 96% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 ó 12, donde dicho polipéptido presenta actividad insecticida;
- f) 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, donde dicho polipéptido presenta actividad insecticida; y
- 25 g) un polipéptido que es una variante de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicho polipéptido presenta actividad insecticida.
- 30 8. El polipéptido de la reivindicación 7 comprende además secuencias de aminoácidos heterólogas.
9. Un anticuerpo que se une de forma selectiva al polipéptido de la reivindicación 7.
10. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 7.
- 35 11. La composición de la reivindicación 10, donde dicha composición se selecciona del grupo que consiste en un polvo, gragea, gránulo, aerosol, emulsión,

coloide y solución y donde dicha composición se prepara opcionalmente mediante desecación, liofilización, homogeneización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación o concentración de un cultivo de las células de *Bacillus thuringiensis*.

- 5 12. 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 7.
13. Un método para producir un polipéptido con actividad insecticida, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 6 en condiciones en las
10 cuales se expresa la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido.
14. Una planta que ha incorporado de forma estable en su genoma una construcción de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que presenta actividad insecticida, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12;
- b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 ó 12, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta
20 actividad insecticida;
- c) 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, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida;
- 25 d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14;
- e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 14, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
30 f) 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, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida; y
- 35 g) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicha variante es el

resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14;

5 donde dicha secuencia de nucleótidos se conecta operablemente con un promotor que dirige la expresión de una secuencia de codificación en una célula de la planta.

15. La planta de la reivindicación 14, donde dicha planta es una célula de la planta.

10 16. Una semilla transgénica de la planta de la reivindicación 14, donde dicha semilla 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: 1, 2, 3, 11 ó 12;
- b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 ó 12, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida;
- c) 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, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida;
- d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14;
- e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 14, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
- f) 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, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida; y
- g) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14.

17. 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, donde dicha secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en:
- a) la secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12;
 - b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 ó 12, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida;
 - c) 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, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida;
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14;
 - e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 14, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida; y,
 - f) 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, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
 - g) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14.
18. La secuencia aislada de ácidos nucleicos de la reivindicación 1, el polipéptido de la reivindicación 7, la planta de la reivindicación 14, la célula de la planta de la reivindicación 15, la semilla de la reivindicación 16 o el método de la reivindicación 17, donde dicho(s) uno o más dominios se seleccionan de los dominios señalados en la figura 2.

19. La planta de la reivindicación 14, la célula de la planta de la reivindicación 17, la semilla de la planta de la reivindicación 18 o el método de la reivindicación 19, donde dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, sorgo, trigo, repollo, girasol, tomate, crucíferas, pimientos, papa, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada y colza de semilla oleaginosa.

RESUMEN

Se proporcionan composiciones y métodos para conferir actividad insecticida a células huésped. Se proporcionan las composiciones que comprenden una secuencia de codificación para un polipéptido de delta-endotoxina. Las secuencias de codificación pueden utilizarse en las construcciones de ADN o casetes de expresión para la transformación y expresión en células huésped. Las composiciones también comprenden células huésped transformadas. En particular, se proporcionan las moléculas aisladas de ácido nucleico de delta-endotoxina. Asimismo, se encuentran comprendidas las secuencias de aminoácidos que corresponden a los polinucleótidos y los anticuerpos que se unen específicamente a dichas secuencias de aminoácidos. En particular, la presente invención proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos que se muestra en las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, o la secuencia de nucleótidos que se describe en las SEQ ID NO:1, 2, 3, 11 ó 12, así como sus variantes y fragmentos.

Optaxmi113	MNMNNTKLSTRALPSFIDYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQOLLNE	60
Optaxmi005	MNMNNTKLNARALPSFIDYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQOLLNE	60
Optaxmi115	MNMNNTKLNARALPSFIDYFNGIYGFATGIKDIMNMIFKTDTGGDLTLDEILKNQOLLNE *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****	60
Optaxmi113	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQONQVLNDVNNKLDIAINTMLHIYLPK	120
Optaxmi005	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQONQVLNDVNNKLDIAINTMLHIYLPK	120
Optaxmi115	ISGKLDGVNGSLNDLIAQGNLNTLSKEILKIANEQONQVLNDVNNKLDIAINTMLNIYLPK *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****	120
Optaxmi113	ITSMLSVMKQNYALSQIEYLSKQLQEISDKLDIINNVNVLINSTLTETPAYQRIKYVN	180
Optaxmi005	ITSMLSVMKQNYALSQIEYLSKQLQEISDKLDIINNVNVLINSTLTETPAYQRIKYVN	180
Optaxmi115	ITSMLSVMKQNYALSQIEYLSRQLQEISDKLDVINLVNVLINSTLTETPSYQRIKYVN *****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****	180
Optaxmi113	EKPEELTFATETNLKVKK-----DGSPADILDELTELTELAKSVTKNDVDGPFYLYNTPH	235
Optaxmi005	EKPEELTFATETTLKVKK-----DSSPADILDELTELTELAKSVTKNDVDGPFYLYNTPH	235
Optaxmi115	EKFDKLTFAESTLRAKQGFNEDSFDNNTLENLTDLAELAKSITKNDVDSFEYLYNTPH ***;*****;*.*. * . : *;*. *;*****;*****;*****;***	240
Optaxmi113	DVMVGNNLFGRSALKTASELITKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTTLTTCRKL	295
Optaxmi005	DVMVGNNLFGRSALKTASELIAKENVKTSGSEVGNVYNFLIVLTALQAKAFLTTLTTCRKL	295
Optaxmi115	DVIIGNNLFGRSALKTASELITKDBIKTSGSEICKVYSFLIVLTSLQAKAFLTTLTTCRKL **;*****;*. *;*****;*. *;*****;*****;*****;*****;*****	300
Optaxmi113	LGLADIDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNILPTLSNTFSNPNYIKTKGSDDEAEVLIQABPGH	355
Optaxmi005	LGLADIDYTSIMNEHLNKEKEEFRVNILPTLSNTFSNPNYAKVKGSDDEAKMIVEAKPGH	355
Optaxmi115	LGLSDIDYTSIMNEHLNKEEFRDNILPALSNNKFSNPSYAKTIGSDNYAKVILESEBPGY ***;*****;*. *;*** *;***;***;***; * . ***; *;*****;***	360
Optaxmi113	ALVGFEMINDPSPALKVYQAKLTITNYQVDKQSLSETVYGDMDKILCPDKSQMYYLHNIT	415
Optaxmi005	ALVGFEMSNDSTVVKVYKAKLKQNYQVDKQSLSEVIYGDMDKLLCPDQSEQIYYTNNIV	415
Optaxmi115	ALVGFELINDPFPVLKAYKAKLKQNYQVDKQSLSEIVYLDIDKLFPCPENSEQKYTKNLT *****; **. *. *;***. *****;**** * *;*****;***;*. *;***;***	420
Optaxmi113	FPNEYVITEIIFTKKKNSLRYEVIANYEFSSGDIDLNKKLVKS--SEAEYSLSVSND-	472
Optaxmi005	FPNEYVITKIDFTKKKMTLRYEVTANSYDSSTGEIDLNKKKVES--SEAEYRTLSAKDD-	472
Optaxmi115	FPGGYVITKITFEKKLNLIYEATANFYDPSTGIDLNKKQVESTFPQTDYITMDIGDDD **; ****; * * * . * * . * *; *;***** *; *; *; *; *; *; *; *	480
Optaxmi113	AIYMPLGVISETFLTPIKGFLTVDSSRLVTLTCKSYLREILLATLSNKA TKLIVPPN	532
Optaxmi005	GVYMPLGVISETFLTPINGFLQADENSRLITLTKSYLREILLATLSNKA TKLIVPPS	532
Optaxmi115	GIYMPLGVISETFLTPINSPGLEVDAKSKTLTLKCKSYLREYLLS DLKNKETGLIAPPN ..*****;*** * .; :;***** ** :;*. * *;***.	540
Optaxmi113	GPISNLVENGDIADNIEPNKGNKNAYVDHTGGVNGTKALYTQDDGEFSQFIGDKLKSK	592
Optaxmi005	GPISNIVENGNEGENLEPHIANNKNAYVDHTGGVNGTRALYVHKDGGFSQFIGDKLKPK	592
Optaxmi115	VFISNVVKNWDIEBDSLEPHVANNKNAYVDNTGGIERSKALPTQDDGEFSQFIGDKLKPN *****; * * : * :;***. *****;*****; :;*****; * * *****;..	600
Optaxmi113	TEYIIQYTVKGNTSIYLLKOKKNENVYEDKNNNLEAFQTITKRFTTELDSSDVYLVFKCK	652
Optaxmi005	TRYVIQYTVKGKPSIHLKNENTGYIHYEDTNNNLEDYQTITKRFTTGDLKGVYLILKSQ	652
Optaxmi115	TDYIIQYTVKGKPAIYLLKNKSTGYITYEDTNGNSEEFQTIIVKFTSETDLSQTHLVFKSQ *;*;*****;..;*. *;... : ***. * *;****; :;*. * . :;***;..	660

FIG. 1A
1/3

Optaxmi113	NGYKAKGDNFLITEIRPKE-VVSPELIKVENWIGMGGSNHVNPDSL LLLFTGGRSILKQNL	711
Optaxmi005	NGDEAWGDNFTILEISPSEKLLSPELINVNNWIRTG-STHISCNTLTLYQGGGGNLKQNL	711
Optaxmi115	NGYEAWGDNFIILEAKLFETPESPELIKFN DWERFG-TTYITGNELRIDHSRGGYFRQSL	719
	** :***** * * * * *****;::* * :::: : * : . . :!*.*	
Optaxmi113	QLDSYSTYRVRFSLMVIGKAKVIIRNSS-EVLF EKSYVNDSEGVLEGVSETFTTKSIQDN	770
Optaxmi005	QLDSFSTYRVNPS--VTGDANVRIRNSR-EVLF EKRYMSG---AKDVSEIFTTKLGKDN	764
Optaxmi115	NIDSYSTYDLSPS-FSGLWAKVIVKNSRGVVLFEKVKNNGSS--YEDISESFTTASNKDG	776
	::**:* * : ** * * : ** ***** .. ::* * * * :*.	
Optaxmi113	FYVELSNEGTFGSKDVAIFYNF SIR----	795
Optaxmi005	FYIELSQGNLYGGPLVKPNDVSIK----	789
Optaxmi115	FFIELTAER--TSSTFHSFRDISIKEKIE	803
	*::** : . . * :.*: ←	

FIG. 1B
2/3

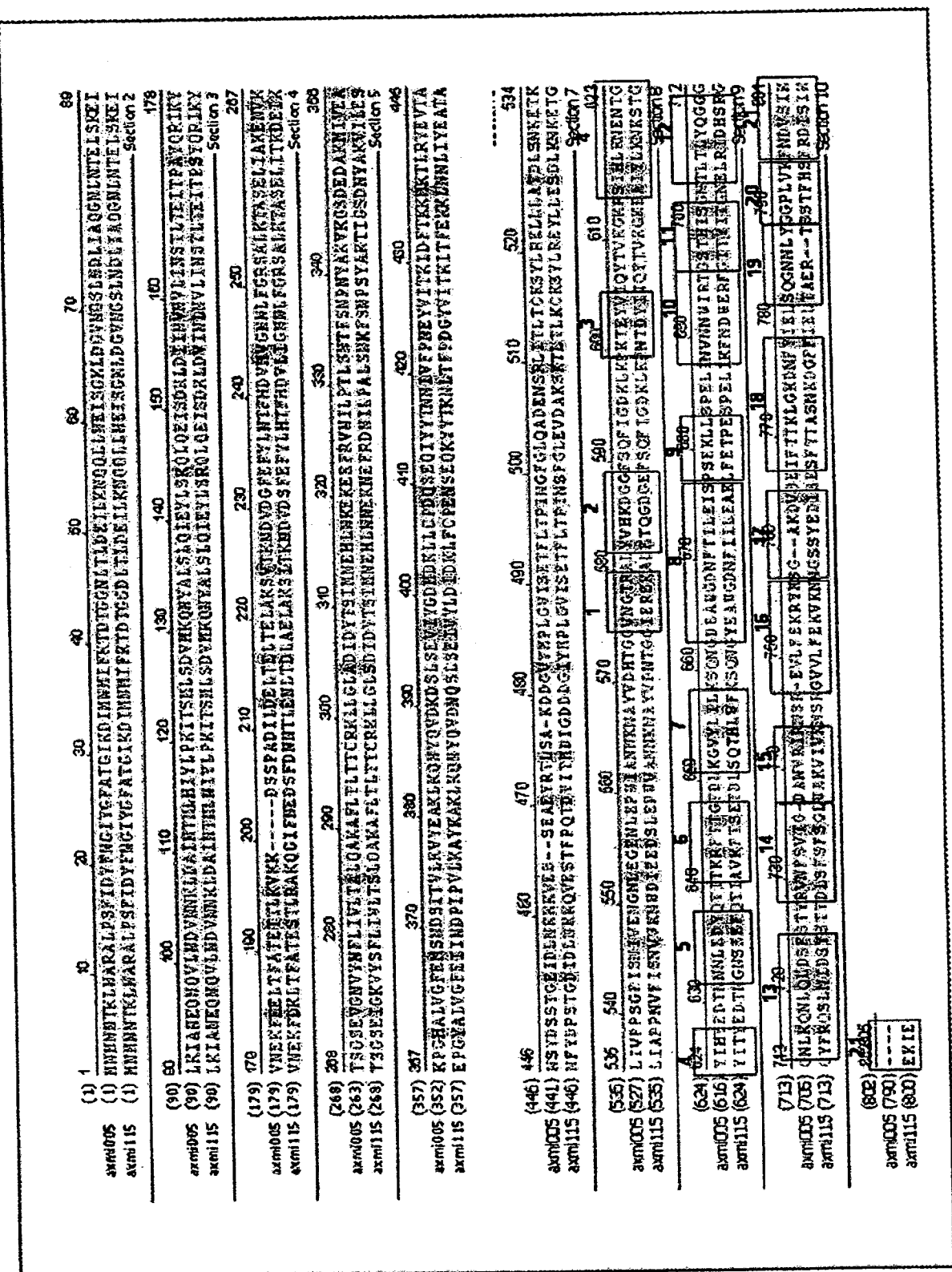


Fig 2
3/3



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **ATHENIX CORPORATION**

(72) Inventor(es) **KIMBERLY S. SAMPSON, SHRUTI AGARWAL, CHRIS CAMPBELL, BRIAN MCNULTY, KIMBERLY S. SAMPSON, DANIEL J. TOMSO, NADINE CAROZZI, TRACY HARGISS, MICHAEL G. KOZIEL, NICHOLAS B. DUCK, VOLKER HEINRICHS**

(74) Apoderado: **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		61/077.812		02/07/2008		US
		61/158.953		10/03/2009		US

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **02/07/2009**

No. de solicitud **PCT/US2009/049527**

(87) Publicación internacional

Fecha: **07/01/2010**

N° publicación: **WO 2010/003065 A2**

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

(21) N° de solicitud:		(51) Int. Cl.:	
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) ATHENIX CORPORATION	
(30) Prioridad	(31) N° Prioridad	32) Fecha	(33) País
	61/077.812	02/07/2008	US
	61/158.953	10/03/2009	US
		(72) Inventor(es) KIMBERLY S. SAMPSON SHRUTI AGARWAL CHRIS CAMPBELL Y OTROS	
		(74) Apoderado: MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO	
(85)	Fecha limite inicio fase nacional:		
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		
	Fecha de presentación de la solicitud: 02/07/2009		
	N° de solicitud PCT/US2009/049527		
(87)	Publicación internacional		
	Fecha: 07/01/2010		
	N° publicación: WO 2010/003065 A2		
(54) Título: AXMI-115, AXMI-113, AXMI-005, AXMI-163 Y AXMI-184: PROTEÍNAS INSECTICIDAS Y MÉTODOS PARA SU USO			

Reivindicación(es):

1. Una molécula de ácido nucleico aislada 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: 1, 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 96% con relación a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 ó 12, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;
 - c) 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, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica una proteína que presenta actividad insecticida, o un complemento de esta;
 - d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14;
 - e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 14, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida;
 - f) 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, donde dicha secuencia de aminoácidos presenta actividad insecticida; y
 - g) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido insecticida que es una variante de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14.
2. La molécula aislada de ácido nucleico de la reivindicación 1, donde dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia sintética que se diseñó para que se exprese en una planta.
3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 2, donde dicha secuencia sintética se selecciona de cualquiera de las SEQ ID NO: 15, 16, 17 ó 18.

4. Un casete de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.

5. El casete de expresión de la reivindicación 4 que comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.

6. Una planta o una célula huésped bacteriana que contiene el casete de expresión de la reivindicación 4.

7. 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: 4, 5, 6, 13 ó 14;

b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al

aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 96% con relación a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 ó 14, donde dicha secuencia de aminoácidos

presenta actividad insecticida;

c) 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, donde dicha secuencia de aminoácidos

d) un polipéptido que se codifica mediante la secuencia de

nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 11 ó 12;
e) un polipéptido que se codifica mediante una secuencia de

nucleótidos que es al menos un 96% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 ó 12, donde dicho

f) un polipéptido que se codifica mediante una

la secuencia de nucleótidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, donde dicho

a) un polipéptido que es una variante de las SEQ ID

NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicha variante es el resultado de uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que

uno o más dominio(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14 que se intercambian con el/los dominio(s) correspondiente(s) de las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13 ó 14, donde dicho polipéptido

8. El polipéptido de la reivindicación 7 comprende

0. Un anticuerpo que se une de forma selectiva al

10. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 7.

10. Una composición que comprende el polipeptido de la reivindicación 7. ...



No. 10-158993- -00000-0000

Fecha: 2010-12-17 16:00:07 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

	LISTA DE CHEQUEO ADMISION A TRAMITE - NUEVAS CREACIONES
PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art. 33 Decisión 486/00	
☐	Indicación que se solicita una patente
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐ Incompleta ☐	
PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art. 33 Decisión 486/00 Circular Única	
☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ Incompleta ☐	
DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)	
☐	Indicación que se solicita diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	
ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)	
☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐ Incompleta ☐	



Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Apoderado(a) y/o Representante de
ATHENIX CORPORATION

REFERENCIA	Radicación No.	10 158993
	Solicitud internacional	PCT/US2009/049527
	Fecha inicio fase nacional	02/02/2011
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

003886

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continúa en la página siguiente...



Continuación radicado No: 10 158993

132

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

JOSE LUIS SALAZAR LOPEZ
Director de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha
adpa11

04 MAR. 2011