



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 850**

51 Int. Cl.:
C07K 14/24 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98918938 .6**
86 Fecha de presentación : **04.05.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0915909**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.1999**

54 Título: **Toxinas proteicas insecticidas de *Xenorhabdus*.**

30 Prioridad: **05.05.1997 US 45641**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **Dow AgroSciences L.L.C.**
9330 Zionsville Road
Indianapolis, Indiana 46268, US
WISCONSIN ALUMNI RESEARCH FOUNDATION

72 Inventor/es: **Ensign, Jerald, C.;**
Bowen, David, J.;
Tenor, Jennifer, L.;
Ciche, Todd, A.;
Petell, James, K.;
Strickland, James, A.;
Orr, Gregory, L.;
Fatig, Raymond, O.;
Bintrim, Scott, B. y
Ffrench-Constant, Richard, T.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 286 850 T3

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

DESCRIPCIÓN

Toxinas proteicas insecticidas de *Xenorhabdus*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a toxinas aisladas a partir de bacterias y al uso de dichas toxinas como insecticidas.

Antecedentes de la invención

10 En el pasado ha habido cierto interés en el uso de agentes biológicos como una opción para el control de plagas. Un tal método explorado era el potencial de control de insectos usando ciertos géneros de nemátodos. Los nemátodos, tales como los de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis*, pueden ser usados como agentes biológicos debido en parte a su simbiosis bacterianas insecticidas transmisibles de los géneros *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, respectivamente. En su entrada en el insecto, los nemátodos liberan sus simbiosis bacterianas en la hemolinfa del insecto donde la bacteria se reproduce y eventualmente causa la muerte del insecto. El nemátodo entonces se desarrolla y se reproduce dentro del cadáver. La progenie de nemátodos que contiene bacterias sale del cadáver del insecto como miembros jóvenes infecciosos que pueden entonces invadir otras larvas repitiéndose así el ciclo que conduce a la propagación del nemátodo. Aunque este ciclo es realizado fácilmente a una escala micro, la adaptación a nivel macro en un procedimiento de laboratorio, necesario para ser eficaz como un insecticida de uso general, es difícil, cara, e ineficaz para producirse, mantenerse, distribuirse y aplicarse.

Además de los logros biológicos en el control de plagas tales como nemátodos, hay en la actualidad nuevos agentes de control pesticidas disponibles en el comercio que son derivados naturales. Estos logros derivados naturales pueden ser tan eficaces como los logros químicos sintéticos. Un tal agente natural es la toxina de la proteína de cristal producida por la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Estas toxinas proteicas han sido formuladas como agentes de control de insectos pulverizables. Una aplicación más reciente de la tecnología de *Bt* ha sido aislar y transformar en plantas los genes que producen las toxinas. Las plantas transgénicas posteriormente producen las toxinas de *Bt* proporcionándose así el control del insecto, (véanse las patentes de EE.UU. N^{os}. 5.380.831; 5.567.600; y 5.567.862 expedida a Mycogen en San Diego, California).

Las plantas *Bt* transgénicas son bastante eficaces y su uso se ha predicho que va a ser alto en algunas cosechas y áreas. Esto ha causado un interés en que las cuestiones de control de resistencia pueden surgir más rápidamente que con las aplicaciones pulverizables tradicionales. Así, sería bastante deseable descubrir otras fuentes bacterianas distintas a *Bt* que produjeran toxinas que pudieran ser usadas en estrategias de plantas transgénicas, o que pudieran ser combinadas con *Bt* para producir plantas transgénicas controladoras de insectos.

Se sabe en la técnica que las bacterias del género *Xenorhabdus* se asocian simbióticamente con el nemátodo *Steinernema*. Lamentablemente, como se cuenta en un número de artículos, las bacterias sólo tenían actividad pesticida cuando se inyectaban en las larvas del insecto y no exhibían actividad biológica cuando se suministraban oralmente (véanse Jarosz J. *et al.* "Involvement of Larvicidal Toxins in Pathogenesis of Insect Parasitism with the Rhabditoid Nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*" *Entomophaga* **36** (3) 1991 361-368; Balcerzak, Malgorzata "Comparative studies on parasitism caused by entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* I. The roles of the nematode-bacterial complex, and of the associated bacteria alone, in pathogenesis" *Acta Parasitologica Polonica*, 1991, **36** (4), 175-181).

Por los motivos expuestos anteriormente ha sido difícil explotar eficazmente las propiedades insecticidas del nemátodo o su simbiote bacteriano. Así, sería bastante deseable descubrir agentes proteicos derivados de la bacteria *Xenorhabdus* que tuvieran actividad oral de modo que los productos producidos a partir de ella pudieran ser formulados como un insecticida pulverizable o que los genes bacterianos que codifican a dichos agentes proteicos pudieran ser aislados y usados en la producción de plantas transgénicas. Hasta la invención de los solicitantes en esta invención no había ninguna especie de *Xenorhabdus* conocida o cepas que produjeran la(s) toxina(s) proteica(s) demostrado con actividad oral.

"Characterization of a High Molecular Weight Insecticidal Protein Complex Produced by the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus Luminescens* (Nematodes, Biological Control)" de David Joseph Bowen, tesis doctoral de 1995 y "Optimum Conditions for Insecticidal Toxin Production by *Photorhabdus Luminescens*" Resúmenes del Encuentro General de la Sociedad Americana de Microbiología (vol 95, mayo de 1995) ambos describen un complejo proteico insecticida de alto peso molecular producido por *Photorhabdus luminescens* que puede ser administrado oralmente a insectos.

60 **Sumario de la invención**

Las toxinas naturales son complejos proteicos que son producidos y secretados cultivando células bacterianas del género *Xenorhabdus*. Los complejos proteicos, con un tamaño molecular natural en el intervalo de aproximadamente 800 a 3000 kDa, pueden ser separados por análisis de gel de SDS-PAGE en numerosas proteínas componentes. Las toxinas exhiben una toxicidad significativa bajo la exposición a un número de insectos. Además, la actividad de la toxina puede ser modificada cambiando las concentraciones del medio. Además, las toxinas tienen ciertas características por ser proteicas porque su actividad es termo-lábil y porque son sensibles a la proteólisis.

La presente invención proporciona un cultivo de microorganismos sustancialmente puro que comprende una cepa de *Xenorhabdus* seleccionada a partir del grupo que consiste en las cepas que tienen el número de depósito NRRL-B-21732, NRRL-B-21733, NRRL-B-21734, NRRL-B-21735, NRRL-B-21736 y NRRL-B-21737.

5 La presente invención también proporciona un método para producir una toxina proteica de *Xenorhabdus* o una composición que comprende una cantidad eficaz de la toxina del cultivo anterior.

Los objetos, las ventajas y propiedades de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente memoria descriptiva.

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un fenograma de cepas de *Xenorhabdus* como se define por rep-PCR utilizando un grupo especificado de cebadores. El eje superior de la figura 1 mide la semejanza en porcentaje de cepas basadas en la coincidencia de los productos rep-PCR (es decir, de 0,0 [ninguna semejanza] a 1,0 [semejanza del 100%]). En el eje derecho, los números y las letras indican las diversas cepas analizadas. Las líneas verticales que separan las líneas horizontales indican el grado de relación (según se lee a partir de la intersección extrapolada de la línea vertical con el eje superior) entre cepas o grupos de cepas en la base de las líneas horizontales (por ejemplo, la cepa DEX1 es aproximadamente un 83% similar a la cepa *X. nem*).

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de una clase única de toxinas proteicas insecticidas producidas por bacterias del género *Xenorhabdus*, teniendo dichas toxinas una actividad funcional oral frente a insectos según se define en este documento. Las especies/cepas de *Xenorhabdus* pueden ser aisladas a partir de una variedad de fuentes. Una tal fuente son los nemátodos entomopatógenicos, más particularmente nemátodos del género *Steinernema* o a partir de cadáveres de insecto infestados por estos nemátodos. Es posible que otras fuentes pudieran abrigar a la bacteria *Xenorhabdus* que produce toxinas insecticidas que tienen actividad funcional. Tales fuentes en el medio ambiente podrían ser terrestres o acuáticas.

30 El género *Xenorhabdus* es taxonómicamente definido como un miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque éste tenga ciertas características atípicas de esta familia. Por ejemplo, las cepas de este género son típicamente negativas a la reducción con nitrato, y negativas con la catalasa. Hace aproximadamente tres años, el *Xenorhabdus* fue subdividido para crear un segundo género; el *Photorhabdus* que está comprendido de una sola especie de *Photorhabdus luminescens* (antes *Xenorhabdus luminescens*) (Boemare *et al.*, 1993 *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 249-255). Esta diferenciación está basada en varias características distinguibles fácilmente identificables por el experto en la técnica. Estas diferencias incluyen las siguientes: estudios de hibridación de ADN-ADN; presencia fenotípica (*Photorhabdus*) o ausencia (*Xenorhabdus*) de actividad de catalasa; presencia (*Photorhabdus*) o ausencia (*Xenorhabdus*) de bioluminiscencia; la familia del huésped nemátodo porque *Xenorhabdus* es encontrado en *Steinernematidae* y *Photorhabdus* es encontrado en *Heterorhabditidae*; así como análisis de ácidos grasos celulares comparativos (Janse *et al.* 1990, *Lett. Appl. Microbiol.* **10**, 131-135; Suzuki *et al.* 1990, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **36**, 393-401). Además, estudios moleculares recientes enfocados a análisis de secuencia (Rainey *et al.* 1995, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 379-381) y de restricción (Brunel *et al.*, 1997, *App. Environ. Micro.*, **63**, 574-580) de genes 16S rRNA también apoyan la separación de estos dos géneros. Este cambio de la nomenclatura está reflejado en esta memoria descriptiva, pero de ninguna manera un futuro cambio de la nomenclatura debe cambiar el alcance de la invención descritos en este documento.

45 Para establecer que las cepas descritas en este documento estaban comprendidas de cepas de *Xenorhabdus*, las cepas fueron caracterizadas basado en las características aprobadas que definen las especies/cepas de *Xenorhabdus* y que se diferencian de otras especies/cepas de *Enterobacteriaceae* y *Photorhabdus*. (Farmer, 1984 "Bergey's Manual of Systemic Bacteriology" vol. 1, págs. 510-511; Akhurst y Boemare 1988, *J. Gen. Microbiol.* **134**, págs. 1835-1845; Boemare *et al.* 1993 *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, págs. 249-255, que se incorporan en este documento como referencia). Las características esperadas para *Xenorhabdus* son las siguientes: tinción de bacilos gram negativo, tamaño del organismo de 0,3-2 x 2-10 μm , pigmentación de la colonia de blanco a amarillo/marrón, presencia de cuerpos de inclusión, ausencia de catalasa, inhabilidad para reducir el nitrato, ausencia de bioluminiscencia, capacidad de respuesta al tinte del medio, hidrólisis de gelatina positiva, crecimiento sobre medio selectivo a *Enterobacteriaceae*, temperatura de crecimiento por debajo de 37°C, supervivencia en condiciones anaerobias y motilidad.

60 Actualmente, el género bacteriano *Xenorhabdus* está comprendido de cuatro especies aprobadas, *Xenorhabdus nematophilus*, *Xenorhabdus poinarii*, *Xenorhabdus bovienii* y *Xenorhabdus beddingii* (Brunel *et al.*, 1997, *App. Environ. Micro.*, **63**, 574-580). Una variedad de cepas relacionadas ha sido descrita en la literatura (por ejemplo, Akhurst y Boemare 1988, *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 1835-1845; Boemare *et al.* 1993 *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, págs. 249-255; Putz *et al.* 1990, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 181-186; Brunel *et al.*, 1997, *App. Environ. Micro.*, **63**, 574-580; Rainey *et al.* 1995, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **45**, 379-381). Numerosas cepas de *Xenorhabdus* han sido caracterizadas en esta invención. Tales cepas y sus características son catalogadas en la Tabla 3 en los Ejemplos. Estas cepas han sido depositadas en la "Agricultural Research Service Patent Culture Collection" (NRRL) en 1815 North University Street Peoria, Illinois. 61604 EE.UU. Como puede observarse en la figura 1, estas cepas son diversas. No es imprevisible que en el futuro puedan haber otras especies de *Xenorhabdus* que tengan unos o todos los atributos de la especie descrita así como algunas características diferentes que en este momento no son definidas como una(s) característica(s) de

ES 2 286 850 T3

Xenorhabdus. Sin embargo, el alcance de la invención en este documento es a cualquier especie de *Xenorhabdus* o cepas que produzcan proteínas como las descritas en este documento que tengan actividad funcional como agentes de control de insectos oralmente activos, independientemente de otros rasgos y características. Además se incluye dentro de la invención las cepas especificadas en este documento y cualquier mutante o sus variantes de fases.

Hay varios términos y expresiones que son usados en este documento que tienen un significado particular y son los siguientes:

Por “actividad funcional” se entiende en este documento que las toxinas proteicas funcionen como agentes de control de insectos oralmente activos, que las proteínas tengan un efecto tóxico, o que sean capaces de interrumpir o disuadir la alimentación del insecto que puede o no causar la muerte del insecto. Cuando un insecto entra en contacto con una cantidad eficaz de la toxina derivada de *Xenorhabdus* suministrada vía la expresión en planta transgénica, la(s) composición(ones) proteica(s) formulada(s), la(s) composición(ones) proteica(s) pulverizable(s), una matriz de cebo u otro sistema de suministro, los resultados son típicamente la muerte del insecto, o los insectos no se alimentan de la fuente que hace a las toxinas disponibles para los insectos.

Por “tamaño natural” se entiende el tamaño no desnaturalizado de la toxina proteica o de la subunidad de la toxina proteica producida por la cepa de *Xenorhabdus* de interés antes de cualquier tratamiento o modificación. Los tamaños naturales de proteínas pueden ser determinados por una variedad de métodos disponibles para cualquier experto en la técnica incluyendo, pero no limitados a la cromatografía de filtración de gel, electroforesis de agarosa y gel de poliacrilamida, espectroscopia de masas, coeficientes de sedimentación y otros similares. El tratamiento o las modificaciones para cambiar el tamaño de la proteína natural pueden ser realizados por proteólisis, mutagénesis, truncamiento génico, desnaturalización de la proteína y otras tales técnicas disponibles para el experto en la técnica de bioquímica de proteínas y de biología molecular.

Las toxinas proteicas discutidas en este documento son los típicamente llamados “insecticidas”. Por insecticidas se entiende en este documento que las toxinas proteicas tienen una “actividad funcional” como se define además en este documento y que son usadas como agentes de control de insectos.

El término “tóxico” o “toxicidad” como se usa en este documento se propone para convenir que las toxinas producidas por *Xenorhabdus* tienen “actividad funcional” según se define en este documento.

La expresión “toxina de *Xenorhabdus*” se propone para incluir cualquier proteína producida por una cepa del microorganismo de *Xenorhabdus* que tiene actividad funcional contra insectos, donde la toxina de *Xenorhabdus* podría ser formulada como una composición pulverizable, expresada por una planta transgénica, formulada como una matriz de cebo, suministrada vía un baculovirus, un sistema basado en el ARN viral de plantas, o suministrada por cualquier otro huésped aplicable o sistema de suministro.

Los caldos de fermentación de las cepas seleccionadas mencionadas en la Tabla 3 fueron usados para examinar lo siguiente: amplitud de la producción de toxinas insecticidas por el género *Xenorhabdus*, el espectro insecticida de estas toxinas, y los componentes proteicos de dichas toxinas. Se ha demostrado que las cepas caracterizadas en este documento tienen toxicidad oral contra una variedad de órdenes de insecto. Tales órdenes de insecto incluyen, pero no están limitados a *Coleoptera*, *Lepidoptera*, *Diptera* y *Acarina*.

Como con otras toxinas bacterianas, la tasa de mutación de bacterias en una población puede causar la variación de la secuencia de genes de la toxina. Las toxinas de interés en este documento son las que producen proteínas que tienen una actividad funcional contra una variedad de insectos bajo su exposición, como se describe en este documento. Preferiblemente, las toxinas son activas contra *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera* y *Acarina*. Las invenciones en este documento son requeridas para capturar las toxinas proteicas homólogas frente a las toxinas proteicas producidas por las cepas en esta invención y cualquier derivado de sus cepas, así como cualquier otra toxina proteica producida por *Xenorhabdus* que tenga actividad funcional. Estas proteínas homólogas pueden diferenciarse en la secuencia, pero no se diferencian en la actividad funcional de las toxinas descritas en este documento. Las toxinas homólogas se propone que incluyan complejos proteicos de entre 100 kDa a 3500 kDa y que estén comprendidas de al menos una subunidad, donde una subunidad es un péptido que puede o no ser el mismo que la otra subunidad. Varias subunidades de la proteína han sido identificadas y se muestran en los Ejemplos en este documento. Típicamente las subunidades de la proteína están entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 350 kDa; entre aproximadamente 130 kDa y aproximadamente 300 kDa, de 40 kDa a 80 kDa; y de aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 40 kDa.

Las toxinas descritas en este documento son bastante únicas porque las toxinas tienen actividad funcional, lo que es clave para el desarrollo de una estrategia de control de insectos. En el desarrollo de una estrategia de control de insectos, es posible retrasar o sortear el procedimiento de degradación de la proteína inyectando una proteína directamente en un organismo, evitando su vía digestiva. En tales casos, la proteína administrada al organismo conservará su función hasta que sea desnaturalizada, no específicamente degradada, o eliminada por el sistema inmunológico en organismos superiores. La inyección en los insectos de una toxina insecticida tiene aplicación potencial sólo en el laboratorio.

El descubrimiento de que las toxinas proteicas insecticidas que tienen actividad funcional como se define en este documento exhiban su actividad después de la ingestión oral o el contacto con las toxinas permite desarrollar un plan de control de insectos basado únicamente en la capacidad de incorporar las toxinas proteicas en la dieta del insecto. Tal plan podría causar la producción de cebos de insecto.

Las toxinas de *Xenorhabdus* pueden ser administradas a los insectos en ambas formas purificada y no purificada. Las toxinas también pueden ser suministradas en cantidades de aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 mg/litro de caldo. Esto puede variar según la condición de formulación, las condiciones de la fuente del inóculo, las técnicas para el aislamiento de la toxina, y otros similares. Las toxinas encontradas en este documento pueden ser administradas como un insecticida pulverizable. El caldo de fermentación de *Xenorhabdus* puede ser producido, diluido, o de ser necesario, ser concentrado de aproximadamente 100 a 1000 veces utilizando ultrafiltración u otras técnicas disponibles para el experto en la técnica. Los tratamientos pueden ser aplicados con un pulverizador de jeringuilla, un pulverizador de surco o cualquier tal equipo disponible para el experto en la técnica en el que el caldo es aplicado a las plantas. Después de los tratamientos, los caldos pueden ser analizados aplicando el insecto elegido a dicha planta pulverizada y puede ser anotado el daño de sus hojas. Si fuera necesario, pueden ser añadidos adyuvantes y foto-protectores para aumentar la semi-vida ambiental de la toxina. En un dispositivo de laboratorio, el caldo, las diluciones, o sus concentrados pueden ser aplicados usando métodos disponibles para el experto en la técnica. Después, se puede permitir al material secarse y los insectos que se analizan ser aplicados directamente al tejido de una planta apropiada. Después de una semana, las plantas pueden ser registradas según el daño usando un Guthrie Scale modificado (Kozziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N. B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M. Z., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M. and Evola, S. V. 1993). En esta manera, el caldo u otras fracciones que contengan proteínas pueden conferir la protección contra plagas de insecto específicos cuando se suministra en una formulación pulverizable o cuando el gen o su derivado, que codifica la proteína o parte de ella, son suministrados vía una planta transgénica o microbio.

Las toxinas pueden ser administradas como una proteína de secreción o celular originalmente expresada en un huésped heterólogo procarionta o eucariota. Las bacterias son típicamente los huéspedes en los que las proteínas son expresadas. Los huéspedes eucariotas podrían incluir, pero no están limitadas a plantas, insectos y levadura. De forma alternativa, las toxinas pueden ser producidas en bacterias o plantas transgénicas en el campo o en el insecto por un vector de baculovirus. Típicamente los insectos serán expuestos a las toxinas incorporando una o varias de dichas toxinas en el alimento/dieta del insecto.

La mortalidad completa para los insectos alimentados es preferida, pero no se requiere alcanzar la actividad funcional. Si un insecto evita la toxina o deja de alimentarse, esta anulación será útil en algunas aplicaciones, incluso si los efectos son no mortales o la mortalidad es retrasada o indirecta. Por ejemplo, si son deseadas plantas transgénicas resistentes al insecto, una reluctancia de insectos que se alimentan en las plantas es tan útil como una toxicidad mortal para los insectos ya que el objetivo último es la protección del daño inducido por el insecto a la planta más bien que la muerte del insecto.

Hay muchos otros caminos por los cuales las toxinas pueden ser incorporadas en la dieta de un insecto. Por ejemplo, es posible adulterar la fuente de alimentos larval con la proteína tóxica pulverizando el alimento con una solución de proteína, como se describe en este documento. De forma alternativa, la proteína purificada podría ser manipulada genéticamente en otra bacteria inofensiva, que entonces podría ser cultivada en un cultivo, y ser aplicada a la fuente de alimentos o podría permitirse que residiera en el suelo en un área en la cual la eliminación del insecto fuera deseable. También, la proteína podría ser manipulada genéticamente directamente en una fuente de alimento del insecto. Por ejemplo, la fuente principal de alimentos para muchas larvas de insecto es el material de la planta.

Una consideración asociada con la explotación comercial de plantas transgénicas es el control de la resistencia. Esto es de interés particular con las toxinas de *Bacillus thuringiensis*. Hay numerosas empresas que explotan comercialmente el *Bacillus thuringiensis* y ha habido mucho interés en el desarrollo de resistencia a las toxinas de *Bt*. Una estrategia para el control de la resistencia del insecto sería combinar las toxinas producidas por *Xenorhabdus* con toxinas tales como proteínas insecticidas vegetativas de *Bt* de tinciones de *Bacillus* (Ciba Geigy; documento WO 94/21795) u otras toxinas de insecto. Las combinaciones podrían ser formuladas para una aplicación pulverizable o podrían ser combinaciones moleculares. Las plantas podrían ser transformadas con genes de *Xenorhabdus* que producen las toxinas del insecto y otros genes de la toxina de insecto tales como *Bt*.

La solicitud de patente europea 0400246A1 describe la transformación de una planta con 2 *Bts*. Esto podría ser cualesquiera 2 genes, no solamente genes de *Bt*. Otro modo de producir una planta transgénica que contenga más de un gen resistente al insecto sería producir dos plantas, conteniendo cada planta un gen de resistencia al insecto. Estas plantas entonces podrían ser cruzadas utilizando técnicas de cultivo tradicional de plantas para producir una planta que contuviera más de un gen de resistencia al insecto.

Además de la producción de una planta modificada, hay otros sistemas de suministro donde puede ser deseable manipular genéticamente el(los) nuevo(s) gen(es) bacteriano(s). A lo largo de las mismas líneas, una toxina proteica, genéticamente manipulada, fácilmente aislada hecha fusionando una molécula atractiva para los insectos como fuente de alimentos y la actividad funcional de la toxina, puede ser manipulada y expresada en la bacteria o en células eucariotas usando técnicas estándar conocidas. Después de la purificación en el laboratorio, un tal agente tóxico con cebo "insertado" podría ser envasado dentro de cajas trampa de insecto estándar.

Otro esquema de suministro es la incorporación del material genético de toxinas en un vector baculovirus. Los baculovirus infectan a huéspedes de insecto particulares, incluyendo aquellos deseablemente dirigidos a las toxinas de *Xenorhabdus*. El baculovirus infeccioso que abriga una construcción de expresión para las toxinas de *Xenorhabdus* podría ser introducido en las áreas de infestación del insecto para así intoxicar o envenenar a los insectos infectados.

La transferencia de las propiedades funcionales requiere secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos para las toxinas de *Xenorhabdus* integradas en un vector de expresión proteico apropiado al huésped en el que el vector residirá. Un modo para obtener una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína con propiedades funcionales es aislar el material genético natural que producen las toxinas de *Xenorhabdus*, usando la información deducida de la secuencia de aminoácidos de la toxina, cuyas partes grandes son expuestas en adelante. Como se describe más abajo, los métodos para purificar las proteínas responsables de la actividad de la toxina también son descritos.

Se sabe que los virus de insecto, o baculovirus, infectan y afectan desfavorablemente a ciertos insectos. La afección de los virus en los insectos es lenta, y los virus no paran inmediatamente la alimentación de los insectos. Así, los virus no parecen óptimos como agentes de control de plagas de insectos. Sin embargo, la combinación de genes de la toxina de *Xenorhabdus* en un vector de baculovirus podría proporcionar un modo eficiente para transmitir las toxinas. Además, ya que los diferentes baculovirus son específicos a los diferentes insectos, puede ser posible usar una toxina particular para controlar selectivamente las plagas de insectos particularmente perjudiciales. Un vector particularmente útil para los genes de toxinas es el virus de la polihedrosis nuclear. Los vectores de transferencia que usan este virus han sido descritos y son en la actualidad los vectores de elección para transferir genes ajenos en insectos. El gen de la toxina del virus recombinante puede ser construido en una forma oralmente transmisible. Los baculovirus normalmente infectan a las víctimas del insecto por medio de la mucosa intestinal visceral. El gen de la toxina insertado detrás de un promotor fuerte de la proteína de la cubierta viral sería expresado y debería matar rápidamente al insecto infectado.

Además de un virus de insecto o baculovirus o sistema de suministro de planta transgénico para las toxinas proteicas de la presente invención, las proteínas pueden ser encapsuladas usando la tecnología de encapsulación de *Bacillus thuringiensis* tales como, pero no limitadas a las patentes de EE.UU. N^{os}. 4.695.455; 4.695.462; 4.861.595 que se incorporan todas en este documento como referencia. Otro sistema de suministro para las toxinas proteicas de la presente invención es la formulación de la proteína en una matriz de cebo, que entonces podría ser usada en estaciones de cebo de insecto por encima o por debajo del suelo. Los ejemplos de tal tecnología incluyen, pero no están limitados a la solicitud de patente PCT WO 93/23998, que se incorpora en este documento como referencia.

Las técnicas de biología estándar y molecular pueden ser usadas para clonar y secuenciar las toxinas descritas en este documento. Información adicional puede ser encontrada en Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989), "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, que se incorpora en este documento como referencia.

Las abreviaturas siguientes son usadas en todas partes de los Ejemplos: Tris = tris(hidroximetil)amino-metano; SDS = dodecil-sulfato de sodio; EDTA = ácido etilendiaminotetracético, IPTG = isopropiltio-B-galactosida, X-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indoil-B-D-galactosida, CTAB = bromuro de cetiltrimetilamonio; kbp = pares de kilobases; dATP, dCTP, dGTP, dTTP, I = 2'-desoxinucleosido 5'-trifosfatos de adenina, citosina, guanina, timina, e inosina, respectivamente; ATP = 5'-trifosfato de adenosina.

Las realizaciones particulares de esta invención son más adelante ejemplificadas en los Ejemplos. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los experimentos específicos detallados son sólo ilustrativos de la invención como se describe más ampliamente en las reivindicaciones que siguen a partir de entonces.

Ejemplo 1

45 Caracterización de cepas de *Xenorhabdus*

Para establecer que la colección descrita en este documento consistió en aislados de *Xenorhabdus*, las cepas fueron evaluadas en términos de las características microbiológicas aprobadas que son las características de las variantes de la fase I de *Xenorhabdus* y que se diferencian de otras *Enterobacteriaceae* y *Photorhabdus spp.* [Farmer, J. J. 1984. "Bergey's Manual of Systemic Bacteriology", vol 1. págs. 510-511. (editores Kreig N. R. y Holt, J. G.). Williams y Wilkins, Baltimore.; Akhurst y Boemare, 1988, *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1835-1845; Forst y Nealson, 1996. *Microbiol. Rev.* **60**, 21-43]. Estos rasgos característicos fueron como sigue: tinción de bacilos gram negativo; tamaño del organismo de 0,3-2 μm de ancho y 2-10 μm en longitud con filamentos ocasionales (15-50 μm) y esferoplastos; pigmentación de la colonia de blanco a amarillo/marrón en agar nutritivo; presencia de cuerpos de inclusión cristalinos; ausencia de catalasa; negativo para oxidasa; inhabilidad para reducir nitrato; ausencia de bioluminiscencia; capacidad de responder al tinte del medio de crecimiento; positivo para la producción de proteasa; temperatura de crecimiento por debajo de 37°C; supervivencia en condiciones anaerobias y positivamente motilidad (Tabla 1). Los métodos fueron comprobados usando la referencia de las cepas de *Escherichia coli*, *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* como controles. Los resultados generales mostrados en la Tabla 3 fueron compatibles con todas las cepas que eran miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y del género *Xenorhabdus*.

Un luminómetro fue usado para establecer la ausencia de bioluminiscencia asociada con cepas de *Xenorhabdus*. Para medir la presencia o la ausencia de unidades emisoras de luz relativas, el caldo de cada cepa (células y medio) fue medido en intervalos de hasta tres tiempos después de la inoculación en un cultivo líquido (24, 48 y/o 72 h) y fue comparado con la luminosidad de fondo (medio no inoculado). Varias cepas de *Photorhabdus* también fueron analizadas como controles positivos respecto a la luminosidad. Antes de la medición de la emisión de luz de caldos seleccionados, la densidad de células fue establecida midiendo la $A_{560\text{nm}}$ en un espectrofotómetro de Sistemas Gilford

ES 2 286 850 T3

(Oberlin, Ohio) usando una célula sorbedora. Las unidades emisoras de luz resultantes entonces fueron normalizadas frente a la densidad de células. Las alícuotas de los caldos fueron colocadas en placas de microtítulo de 96 pocillos (100 μ L cada uno) y se leyeron en un luminómetro Lumicount de Packard (Compañía Packard Instruments, Meriden Conn.). El período de integración para cada muestra fue de 0,1 a 1,0 s. Las muestras fueron agitadas en el luminómetro durante 10 s antes de la toma de lecturas. Un ensayo positivo fue determinado como que tenía una luminescencia de fondo ≥ 3 -veces (1-5 unidades de luz relativas). Además, se confirmó la ausencia de luminosidad de la colonia con algunas cepas con láminas de película fotográficas y se realizó el análisis visual después de la adaptación visual en un cuarto oscuro.

Las características de tinción gram de cada cepa fueron establecidas con un kit de tinción gram comercial (BBL, Cockeysville, Md.) junto con portas control de tinción gram (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). La evaluación microscópica entonces fue realizada usando lentes 100X (con 10X ocular y 2X ampliación de cuerpo) de objetivo de inmersión en aceite de un microscopio de Zeiss (Carl Zeiss, Alemania). El examen microscópico de las cepas individuales respecto al tamaño del organismo, la descripción celular y los cuerpos de inclusión (las últimas dos observaciones después del crecimiento logarítmico) fueron realizados usando portas de montaje húmedos (10X ocular, 2X cuerpo y 40X ampliación del objetivo) y microscopía de contraste de fase con un micrometro (Akhurst, R. J. y Boemare, N. E. 1990. "Entomopathogenic Nematodes in Biological Control" (editores Gaugler, R. y Kaya, H.). págs. 75-90. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.; Baghdigian S., Boyer-Giglio M. H., Thaler, J. O., Bonnot G., Boemare N. 1993. *Biol. Cell* **79**, 177-185). La pigmentación de la colonia fue observada después de la inoculación en agar nutritivo Bacto, (Laboratorios Difco, Detroit, MI) preparado según las instrucciones de la etiqueta. La incubación ocurrió a 28°C y las descripciones fueron registradas después de 5-7 días.

Para analizar la presencia de actividad de catalasa, 1 mL de caldo de cultivo o una colonia del organismo de ensayo en un pequeño tampón de agar nutritivo fue colocado en un tubo de ensayo de vidrio. Un mL de una solución de peróxido de hidrógeno doméstica fue añadida con cuidado debajo de la pared del tubo. Una reacción positiva fue registrada cuando burbujas de gas (presumiblemente oxígeno) aparecieron inmediatamente o a los 5 s. Los controles negativos de agar nutritivo no inoculado o caldo de cultivo y solución de peróxido de hidrógeno también fueron examinados.

La reacción de oxidasa de cada cepa fue determinada frotando colonias de 24 h en portaobjetos de DrySlide Oxidase (Difco, Inc.; Detroit, Mich.). Las cepas positivas de oxidasa producen un color púrpura oscuro, indicativo de citocromo oxidasa C, a los 20 segundos de que el organismo fue frotado contra el portaobjetos. El fracaso al producir un color púrpura oscuro indicaba que el organismo daba negativo para la oxidasa.

Para analizar la reducción de nitrato, cada cultivo fue inoculado en 10 mL de caldo de nitrato de Bacto (Laboratorios Difco, Detroit, Mich.). Después de 24 h de incubación a 28°C, la producción de nitrito fue analizada por la adición de dos gotas de reactivo de ácido sulfanílico y dos gotas de reactivo alfa-naftilamina (Manual de Difco, 10ª edición, Laboratorios Difco, Detroit, MI, 1984). La generación de un color distinto rosado o rojo indicaba la formación de nitrito del nitrato mientras que la carencia de formación de color indicaba que la cepa era negativa respecto a la reducción con nitrato. En el caso último, fue añadido cinc finamente pulverizado para confirmar además la presencia de nitrato no reducido establecido por la formación de nitrito y un color rojo resultante.

La capacidad de cada cepa de respuesta al tinte a partir del medio de crecimiento fue analizada con agar de Bacto MacConkey que contenía tinte rojo neutro; conteniendo el agar Bacto Tergitol-7 el tinte azul de bromotimol y conteniendo el agar Bacto EMB los tintes azul de metileno y eosina-Y (agares formulados por los Laboratorios Difco, Detroit, MI, todos preparados de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta). Después de la inoculación en estos medios, la respuesta del tinte fue registrada en incubación a 28°C durante 5 días. El crecimiento en medios Bacto MacConkey y Bacto Tergitol-7 es característico para los miembros de la familia de *Enterobacteriaceae*. La motilidad de cada cepa fue analizada usando una solución de medio de prueba de motilidad de Bacto (Laboratorios Difco, Detroit, MI) preparado según las instrucciones de la etiqueta. Una inoculación por punción fue realizada con cada cepa y la motilidad positiva fue evaluada después de la incubación a 28°C por observación macroscópica de un área difusa de crecimiento que se extiende desde la línea de inoculación.

La producción de proteasa fue analizada observando la hidrólisis de gelatina usando placas de gelatina de Bacto (Laboratorios Difco, Detroit, MI) hechas según las instrucciones de la etiqueta. Los cultivos fueron inoculados y las placas fueron incubadas a 22°C durante 3-5 días antes de la evaluación de la hidrólisis de gelatina. Para evaluar el crecimiento a temperaturas diferentes, las placas agar [2% de proteosa peptona N°. 3 con dos por ciento de Bacto-agar (Difco, Detroit, MI) en agua desionizada] fueron rayadas a partir de una fuente común de inóculo. Las placas fueron incubadas a 20, 28 y 37°C durante 5 días. Las temperaturas de la incubadora fueron comprobadas con un termopar electrónico y fueron medidas para asegurar los ajustes válidos de las temperaturas.

Los requerimientos de oxígeno para las cepas de *Xenorhabdus* fueron analizados de la manera siguiente. Fue hecha una inoculación por punción en medio de caldo de fluido de tioglicolato (Difco, Detroit, MI). Los tubos fueron incubados a temperatura ambiente durante una semana y los cultivos entonces fueron examinados respecto al tipo y al grado de crecimiento. El indicador resazurina fue usado para indicar la presencia de oxigenación media o la zona de aerobiosis (Manual Difco, 10ª edición, Laboratorios Difco, Detroit, MI). En el caso de resultados confusos, la concentración de agar final del medio del caldo de tioglicolato fluido fue aumentada al 0,75% y las características del crecimiento fueron comprobadas de nuevo.

La diversidad de las cepas de *Xenorhabdus* fue medida por análisis PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por medio de la obtención de huellas genómicas usando el ADN genómico de cada cepa. Esta técnica está basada en las familias de las secuencias de ADN repetido presentes en todos los genomas de diversas especies bacterianas (revisado por Versalovic, J., Schneider, M., DE Bruijn, F. J. y Lupski, J. R. 1994. *Methods Mol. Cell. Biol.*, **5**, 25-40).
 5 Tres de estos, secuencia palindrómica extragenética repetidora (REP), consenso intergénico repetidor enterobacteriano (ERIC) y el elemento BOX, según se cree, juegan un papel importante en la organización del genoma bacteriano. La organización genómica, según se cree, está formada por la selección y puede ser usada la dispersión diferencial de estos elementos dentro del genoma de cepas bacterianas estrechamente relacionadas para discriminar entre cepas (por ejemplo. Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. y DE Bruijn, F. J. 1994. *Appl. Environ. Micro.* **60**, 2286-2295).
 10 La Rep-PCR utiliza cebadores de oligonucleotido complementarios para estas secuencias repetidoras para amplificar los fragmentos de ADN variablemente clasificados que estén entre ellos. Los productos resultantes son separados por electroforesis para establecer la "huella digital" del ADN para cada cepa.

Para aislar el ADN genómico de las cepas, fueron resuspendidos peletes de células en tampón TE (Tris-HCl 10 ó 50 mM, EDTA 1 ó 50 mM, pH 8,0) a un volumen final de 10 mL y entonces fueron añadidos 12 mL de NaCl 5 M. Esta mezcla fue centrifugada 20 minutos a 15.000 X g. El pelete resultante fue resuspendido en 5,7 mL de TE y fueron añadidos 300 µL de SDS del 10% y 60 µL de 20 mg/mL de proteinasa K (Productos Gibco BRL, Grand Island, Nueva York). Esta mezcla fue incubada a 37°C durante 1 h, fueron añadidos aproximadamente 10 mg de lisozima, y la mezcla entonces fue incubada durante 30 a 45 minutos adicionales. Un mL de NaCl 5 M y 800 µL de solución CTAB/NaCl (10% p/v de CTAB, NaCl 0,7 M) entonces fue añadida y la mezcla fue incubada de 10 a 20 minutos a 65°C, y en algunos casos, fue agitada con cuidado, luego fue incubada y agitada durante 20 minutos adicionales para ayudar a aclarar el material celular. Un volumen igual de solución de cloroformo/alcohol de isoamilo (24:1, v/v) fue añadido, fue mezclado con cuidado, y después fue centrifugado. Dos extracciones fueron realizadas con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol de isoamilo (PCI; 50:49:1). El ADN genómico fue precipitado con 0,6 volumen de isopropanol. El ADN precipitado fue eliminado con un lazo estéril de plástico o barra de vidrio, fue lavado dos veces con etanol del 70%, fue secado y disuelto en 2 mL de STE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 10 mM, EDTA 1 mM). El ADN entonces fue cuantificado a A_{260nm}. En un segundo método, 0,01 volúmenes de RNAasa A (50 µg/mL final) fueron añadidos e incubados a 37°C durante 2 h. La muestra entonces fue extraída con un volumen igual de PCI. Las muestras entonces fueron precipitadas con 2 volúmenes de etanol del 100% y fueron recogidas como se describe anteriormente. Las muestras fueron entonces secadas al aire y fueron resuspendidas en 250-1000 µL de TE.
 15
 20
 25
 30

TABLA 1

Características taxonómicas de las cepas de Xenorhabdus

35

40

45

50

55

60

65

Cepa	A*	B	C	D	E	F	G	H	I	J ^s	K	L	M	N	O	P	Q	R
S. carp	- [†]	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
X. Wi	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
X. nem	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
X. NH3	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
X. riobravis	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
DEX1	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
DEX6	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM037	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM039	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM070	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM078	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM079	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM080	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM081	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM082	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM083	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM084	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM102	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM103	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM104	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-

ES 2 286 850 T3

ILM129	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM133	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM135	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM138	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM142	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
ILM143	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
GLX26	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
GLX40	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
GLX166	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
SEX20	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
SEX76	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
SEX180	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	C	+	+	+	+	+	+	-	-
GL133B	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
DEX2	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
DEX3	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	Y	+	+	+	+	+	+	-	-
DEX4	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
DEX5	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	-	-
DEX7	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	ND	-
DEX8	-	+	-	rd S	+	-	-	+	+	W	+	+	+	+	+	+	ND	-

*A = Tinción gram, B = Cuerpos de inclusión cristalinos, C = Bioluminiscencia, D = Forma de las células, E = Motilidad, F = Reducción de nitrato, G = Presencia de catalasa, H = Hidrólisis de gelatina, I = Respuesta al tinte, J = Pigmentación en agar nutritivo, K = Crecimiento en agar EMB, L = Crecimiento en agar MacConkey, M = Crecimiento en agar Tergitol-7, N = Anaerobio facultativo, O = Crecimiento a 20°C, P = Crecimiento a 28°C, Q = Crecimiento a 37°C, R = oxidasa.

† ++ = positivo para característica, - = negativo para característica; rd = bacilos, S = clasificado dentro de los descriptores de género, ND = no determinado

§ W = blanco, C = crema, Y = amarillo.

Para realizar el análisis rep-PCR del ADN genómico de *Xenorhabdus*, los siguientes cebadores fueron usados: REP1R-I; 5'-IIICGICGICATCIGGC-3' y REP2-I; 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'. La PCR fue realizada usando la siguiente reacción de 25 µL: 7,75 µL H₂O, 2,5 µL 10 x tampón LA (PanVera Corp., Madison, Wis.), 16 µL de mezcla DNTP (2,5 mM cada uno), 1 µL de cada cebador a 50 pM/µL, 1 µL de DMSO, 1,5 µL de ADN genómico (concentraciones en el intervalo de 0,075-0,480 µg/µL) y 0,25 µL de TaKaRa EX Taq (PanVera Corp., Madison, Wis.). La amplificación por PCR fue realizada en un Ciclador Térmico de ADN de Perkin Elmer (Norwalk, Conn.) utilizando las condiciones siguientes: 95°C durante 7 minutos entonces [94°C durante 1 minuto, 44°C durante 1 minuto, 65°C durante 8 minutos] para 35 ciclos; seguido de 65°C durante 15 minutos. Después de la ciclación, fueron añadidos 25 µL de reacción a 5 µL de 6X tampón de carga de gel (0,25% azul de bromofenol, 40% p/v de sacarosa en H₂O). Un gel de agarosa del 1% 15x20 cm entonces fue corrido en tampón TBE (Tris-borato 0,09 M, EDTA 0,002 M) utilizando 8 µL de cada reacción. El gel fue corrido durante aproximadamente 16 h a 45 V. Los gels entonces fueron teñidos en 20 µg/mL de bromuro de etidio durante 1 h y fueron desteñidos en tampón TBE durante aproximadamente 3 h. Después fueron tomadas bajo una iluminación UV las fotografías Polaroid® de los gels.

La presencia o la ausencia de bandas en tamaños específicos para cada cepa fueron anotadas a partir de las fotografías usando el software de exploración RFLP Plus (Scanalytics, Billerica, MA) y fue introducido como una matriz de semejanza en el programa del software de taxonomía numérica, NTSYS-pc (Software Exeter, Setauket, Nueva York). Los controles de la cepa de *E. coli* HE101 y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* analizados en las mismas condiciones produjeron huellas digitales de PCR correspondientes a las publicaciones (Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, J. R. 1991. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6823-6831; Vera Cruz, C. M., Halda-Alija, L., Louws, F., Skinner, D. Z., George, M. L., Nelson, R. J., DE Bruijn, F. J., Rice, C. y Leach, J. E. 1995. *Int. Rice Res. Notes*, **20**, 23-24.; Vera Cruz, C. M., Ardales, E. Y., Skinner, D. Z., Talag, J., Nelson, R. J., Louws, F. J., Leung, H., Mew, T. W. y Leach, J. E. 1996. *Phytopathology* **86**, 1352-1359). Los datos de cepas de *Xenorhabdus* entonces fueron analizados con una serie de programas en NTSYS-PC; SIMQUAL (Semejanza para datos cualitativos) para generar una matriz de coeficientes de similitud (usando el coeficiente de Jaccard) y agrupaciones SAHN (Secuencial, Aglomerativo, Jerárquico y Anidado) utilizando el método UPGMA (Método del grupo par no ponderado con promedios aritméticos) cuyos grupos relacionaron cepas y pueden ser expresados como un fenograma (figura 1). Los programas CPH (valores cofenéticos) y MXCOMP (comparación de la matriz) fueron usados para generar una matriz de valor cofenético y comparar la correlación entre esto y la matriz original sobre la cual la agrupación estaba basada. Una estadística de Mantel normalizada (r) resultante fue generada que era una medida de la bonanza del ajuste para un análisis de grupo (r=0,8-0,9 representando un ajuste

ES 2 286 850 T3

muy bueno). En nuestro caso $r=0,9$, indicó un ajuste excelente. Por lo tanto, las cepas descritas en este documento fueron determinadas que estaban comprendidas de un grupo diverso de cepas fácilmente distinguibles representantes del género *Xenorhabdus*.

5 Las cepas descritas en este documento fueron depositadas antes de la presentación de la solicitud en las siguientes autoridades de depósitos internacionales: Agricultural Research Service Patent Culture Collection (NRRL), National Center for Agricultural Utilization Research, ARS-USDA, 1815 Universidad del Norte St., Peoria, IL 61604. Las cepas siguientes, con designaciones NRRL fueron depositadas el 29 de abril de 1997: S. Carp (NRRL-B-21732); *X. Wi* (NRRL-B-21733); *X. nem* (NRRL-B-21734); X. NH3 (NRRL-B-21735); *X. riobravis* (NRRL-B-21736); GL 133B (NRRL-B-21737); DEX1 (NRRL-B-21738); DEX2 (NRRL-B-21739); DEX3 (NRRL-B-21740); DEX4 (NRRL-B-21741); DEX 5 (NRRL-B-21742); y DEX 6 (NRRL-B-21743). Las cepas restantes descritas en este documento fueron depositadas en el NRRL el 30 de abril de 1998. En total, fueron depositadas treinta y nueve (39) cepas.

Ejemplo 2

15 *Utilidad funcional de la(s) toxina(s) producida(s) por diversas cepas de Xenorhabdus*

Los cultivos “madre” de las diversas cepas de *Xenorhabdus* fueron producidos inoculando 175 mL de medio líquido de proteosa peptona N°. 3 (PP3) del 2% (Laboratorios Difco, Detroit, MI) con una colonia variante de fase I en un matraz de 500 mL con tres deflectores con un cuello Delong cubierto de un cierre Kaput. Después de la inoculación, los matraces fueron incubados entre 24-72 h a 28°C en un agitador rotatorio a 150 revoluciones por minuto. Los cultivos entonces fueron transferidos a una botella estéril que contenía una barra de agitación magnética estéril y luego fue recubierto con aceite mineral estéril para limitar la exposición al aire. Los cultivos madre fueron guardados en la oscuridad a temperatura ambiente. Estos cultivos entonces fueron usados como fuentes de inóculo para la fermentación de cada cepa. Las colonias de la variante de fase I también fueron almacenadas congeladas a -70°C para uso como una fuente de inóculo. Fueron seleccionadas colonias individuales de la fase I a partir de placas PP3 que contenían azul de bromotimol (0,0025%) y fueron colocadas en 3,0 mL de PP3 y fueron cultivadas de noche en un agitador rotatorio (150 revoluciones por minuto) a 28°C. Entonces fue añadido glicerol (diluido en PP3) para alcanzar una concentración final del 20% y los cultivos fueron congelados en alícuotas a -70°C. Para la inoculación del cultivo, una parte de la alícuota congelada fue retirada asépticamente y fue mantenida en PP3 que contenía azul de bromotimol para la nueva selección de colonias de fase I.

Los matraces de “semilla” de pre-producción o cultivos fueron producidos inoculando 2 mL de un cultivo madre recubierto de aceite o transfiriendo una colonia de la variante de fase I en 175 mL de medio estéril en un matraz de 500 mL con tres deflectores cubierto de un cierre Kaput. Típicamente, después de 16 h de incubación a 28°C en un agitador rotatorio a 150 revoluciones por minuto, los cultivos de semilla fueron transferidos en matraces de producción. Los matraces de producción por lo general fueron inoculados añadiendo ~1% del cultivo de semilla activamente creciente a PP3 estéril o a caldo de soja tripsínico (TSB, Laboratorios Difco, Detroit MI). Para producciones a pequeña escala, los matraces fueron inoculados directamente con una colonia de variante de fase I. La producción de caldos ocurrió en matraces de 500 mL con tres deflectores cubiertos con un cierre Kaput. Los matraces de producción fueron agitados a 28°C en un agitador rotatorio a 150 revoluciones por minuto. Las fermentaciones de producción fueron terminadas después de 24-72 h.

Después de la incubación apropiada, los caldos fueron distribuidos en botellas de polietileno de 1,0 L estériles, se hicieron girar a 2600 x g durante 1 h a 10°C y fueron decantados de las células y de los restos del pelete. Los caldos fueron después esterilizados con un filtro o fue logrado un aclarado del caldo posterior con un dispositivo de microfiltración de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA) utilizando un filtro de membrana de poliéter sulfona (PES) de canal abierto de 0,5 μ M. Los caldos resultantes entonces fueron concentrados (hasta 10 veces) utilizando una membrana de tamaño de poro de 10.000 o 100.000 PM, un dispositivo de ultrafiltración M12 (Amicon, Beverly MA) o concentradores centrífugos (Millipore, Bedford, MA y Pall Filtron, Northborough, MA) con un tamaño de poro de 10.000 o 100.000 PM. En el caso de concentradores centrífugos, se hicieron girar los caldos a 2000 x g durante aproximadamente 2 h. El filtrado de la membrana fue añadido al correspondiente concentrado para alcanzar la concentración deseada de los componentes mayores que el tamaño de poro usado. Después de estos procedimientos, los caldos fueron usados para el análisis bioquímico o la evaluación biológica. La inactivación con calor de las muestras de caldo tratadas fue alcanzada calentando muestras de 1 mL a 100°C en un bloque de calor relleno con arena durante 10-20 minutos.

El(los) caldo(s) y el(los) complejo(s) de toxina de diferentes cepas de *Xenorhabdus* fueron útiles para reducir las poblaciones de insectos y fueron usados en un método para inhibir una población de insectos que comprendió aplicar a un lugar del insecto una cantidad inactivante de insecto eficaz del activo descrito. Se muestra una demostración de la amplitud de la actividad funcional observada de los caldos de un grupo seleccionado de cepas de *Xenorhabdus* fermentadas como se describe anteriormente en la Tabla 2. Es posible que las actividades mejoradas o funcionales adicionales puedan ser detectadas con estas cepas por el aumento de la concentración del caldo o empleando métodos de fermentación diferentes como se describe en este documento. Compatible con la actividad que se asocia con una proteína, la actividad funcional mostró termo-labilidad y/o estuvo presente en el concentrado de peso molecular alto (mayor que 10 kDa y predominantemente mayor que 100 kDa) después de la concentración del caldo.

El(los) caldo(s) de cultivo de diversas cepas de *Xenorhabdus* mostró(aron) una actividad funcional diferencial

ES 2 286 850 T3

(mortalidad y/o inhibición del crecimiento) frente a un número de insectos. Más específicamente, fue observada actividad frente a larvas del gusano de la raíz del maíz y larvas del gorgojo que son miembros de insectos del orden *Coleoptera*. Otros miembros de *Coleoptera* incluyen gusanos de alambre, escarabajuelos de los nabos, pulgillas, escarabajos saltador y el escarabajo de la patata. Los caldos y el(los) complejo(s) de toxina purificado(s) fueron también
5 activos contra la oruga del tabaco, el gusano del cuerno del tabaco, gusano del grano y el perforador de grano europeo que son miembros del orden *Lepidoptera*. Otros miembros típicos de este orden son la lagarta del girasol, gusano cortador negro, agusanado de las manzanas, polilla de la ropa, polilla india de la harina, cigarreros, oruga de la col, oruga de bolsón, defoliador de los pinos y la palomilla. También fue observada actividad contra las larvas de mosquito que son miembros del orden *Diptera*. Otros miembros del orden *Diptera* son, cecidomia del guisante, mosca de la
10 zanahoria, mosca de la col, mosca del nabo, mosca de los bulbos, títula y mosca común y varias especies de mosquito. La actividad con el(los) caldo(s) también fue observada contra el ácaro rojo que es un miembro del orden *Acarina* que incluye las arañas rojas de América Central, ácaros amarillos, ácaro de los cítricos, arañuela roja pelosa, ácaro enroñador del peral y deca de los tomates.

15 La actividad contra las larvas del gusano de la raíz del maíz fue analizada como sigue. Caldo(s) de cultivo de *Xenorhabdus* (10 x concentrado, esterilizado con filtro), PP3 o TSB (10 x concentrado), el(los) complejo(s) de toxina purificado(s) o tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, fueron aplicados directamente a la superficie (aproximadamente 1,5 cm²) de dieta artificial (Rose, R. I. y McCabe, J. M 1973. *J. Econ. Entomol.* **66**, 398-400) en alícuotas de 40 μ L. El complejo de toxina fue diluido en tampón de fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0. Se permitió a las placas de la dieta
20 secarse al aire en una campana de flujo estéril y los pocillos fueron infestados de solo *Diabrotica undecimpunctata howardi* (gusano de la raíz del maíz del sur, SCR) recién nacidos incubados a partir de los huevos esterilizados de la superficie. Las placas fueron selladas, colocadas en una cámara de crecimiento humedecida y mantenidas a 27°C durante el período apropiado (3-5 días). La mortalidad y las determinaciones de peso larvales entonces fueron registradas. Generalmente, 8-16 insectos por tratamiento fueron usados en todos los estudios. La mortalidad control era
25 generalmente menor del 5%.

La actividad contra el gorgojo (*Anthonomus grandis*) fue analizada como sigue. Caldos de *Xenorhabdus* concentrados (10 x) o medio de control (PP3) fueron aplicados en alícuotas de 60 μ L a la superficie de 0,35 g de dieta artificial (dieta lepidóptera de Stoneville Yellow) y se dejó secar. Una sola larva del gorgojo fue colocada 12-24 h sobre la dieta,
30 los pocillos fueron sellados y mantenidos a 25°C, humedad relativa del 50% (HR) durante 5 días. La mortalidad y los pesos larvales entonces fueron evaluados. La mortalidad de control estaba en el intervalo de 0-25%.

La actividad contra las larvas de mosquito fue analizada como sigue. El ensayo fue llevado a cabo en una placa de microtítulo de 96 pocillos. Cada pocillo contenía 200 μ L de solución acuosa (caldo(s) de cultivo de *Xenorhabdus* 10 x concentrado, medio de control (2% de PP3) y aproximadamente 20 larvas de 1 día (*Aedes aegypti*). Había 6 pocillos
35 por tratamiento. Los resultados fueron leídos a las 24 h después de la infestación. Ninguna mortalidad de control fue observada.

La actividad contra larvas lepidópteras fue analizada como sigue. Caldo(s) de cultivo de *Xenorhabdus* concentrado (1 x), medio de control (PP3 o TSB), el(los) complejo(s) de toxina purificado(s) o tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 fueron aplicados directamente a la superficie (~1,5 cm²) de dieta lepidóptera artificial estándar (dieta de Stoneville Yellow) en alícuotas de 40 μ L. Se permitió a las placas de la dieta secarse al aire en una campana de flujo estéril y cada pocillo fue infestado de una sola larva recién nacida. Los huevos del perforador de grano europeo (*Ostrinia nubilalis*),
40 gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), gusano del grano (*Helicoverpa zea*) y del gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*) fueron obtenidos a partir de fuentes comerciales y fueron incubados en interior mientras que las larvas de la oruga del tabaco (*Heliothis virescens*) y de la lagarta del girasol (*Spodoptera exigua*) fueron suministradas internamente. Después de la infestación con larvas, las placas de dieta fueron selladas, colocadas en una cámara de crecimiento humedecida y fueron mantenidas en la oscuridad a 27°C durante el período apropiado. La mortalidad y las determinaciones en peso fueron anotadas en el día 5. Generalmente, fueron usados 16 insectos por tratamiento en
50 todos los estudios. La mortalidad control generalmente estaba en el intervalo del 0-12,5%.

La actividad contra el ácaro rojo (*Tetranychus urticae*) fue determinada como sigue. Plantas de calabaza jóvenes fueron recortadas en un solo cotiledón y fueron pulverizadas hasta escurrirse con caldo(s) concentrado(s) 10 x o medio de control (PP3). Después de secar, las plantas fueron infestadas con una población mezclada de ácaros de araña y
55 fueron mantenidas a temperatura ambiente y a humedad durante 72 h. Fueron contados entonces los ácaros vivos para determinar los niveles de control.

Ejemplo 3

60 *Actividad funcional de proteínas de toxina altamente purificadas de la cepa X. Riobravis de Xenorhabdus*

La proteína de toxina funcional fue purificada a partir del caldo de fermentación de la cepa *X. riobravis* de *Xenorhabdus* como se describe en este documento. Esta toxina fue analizada frente a las larvas de cinco especies de insecto recién nacidas, gusano de la raíz del maíz del sur, barrenador europeo del maíz, gusano del cuerno del tabaco, gusano
65 del grano y oruga del tabaco siguiendo los métodos descritos en el Ejemplo 2. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Todas las especies mostraron efectos inhibitorios del crecimiento y/o mortales después de cinco días cuando se presentaron con la toxina en una dosis de 440 ng de toxina/cm² de dieta.

ES 2 286 850 T3

TABLA 3

Efecto de la toxina de X. riobravus altamente purificada en varias especies de insecto

Tratamiento	gusano de la raíz del maíz	barrenador europeo del maíz	gusano del cuerno del tabaco	gusano del grano	oruga del tabaco
<i>X. riobravus</i>	19/46 *	75/61	75/75	25/95	13/98

* - Los valores son el % de mortalidad/% de la inhibición del crecimiento corregido por efectos de control.

TABLA 2

Actividad funcional observada de caldos de diferentes cepas de Xenorhabdus

Cepa de <i>Xenorhabdus</i>	Especies de insecto sensible*
S. carp	1**, 2, 3, 4, 5, 6, 7
<i>X. riobravus</i>	1, 2, 3, 5, 6, 7
<i>X. NH3</i>	1, 2, 3, 6
<i>X. Wi</i>	1, 2, 3, 5, 6, 7
<i>X. nem</i>	3, 5, 6
DEX1	1, 2, 3, 6
DEX6	1, 2, 3, 4, 5, 6
ILM037	1, 4
ILM039	4
ILM070	4, 8
ILM078	3, 4
ILM079	3
ILM080	3
ILM081	3
ILM082	3
ILM083	3
ILM084	3
ILM102	1, 2, 4
ILM103	1, 3, 4, 8
ILM104	3, 4, 8
ILM116	1, 4
ILM129	1, 4
ILM133	1, 4
ILM135	1, 2, 4
ILM138	4
ILM142	1, 2, 3, 4, 8
ILM143	4
GLX26	8
GLX40	3, 8
GLX166	4
SEX20	1, 4, 8
SEX76	1, 4
SEX180	4
GL 133B	4
DEX2	6, 7
DEX3	3, 6
DEX4	6, 7
DEX5	3, 6
DEX7	3
DEX8	3

* = \geq mortalidad del 25% y/o inhibición del crecimiento frente al control

** = 1; oruga del tabaco, 2; perforador de grano europeo, 3; gusano del cuerno del tabaco, 4; gusano de la raíz del maíz del sur, 5; gorgojo, 6; mosquito, 7; ácaro rojo, 8; gusano del grano.

ES 2 286 850 T3

Ejemplo 4

Efecto de diferentes medios de cultivo en la actividad funcional de caldos de fermentación de cepas seleccionadas de *Xenorhabdus*

Diversos medios de cultivo diferentes fueron usados para optimizar después las condiciones para la detección de la actividad funcional en los caldos de fermentación de varias cepas de *Xenorhabdus*. GL133B, *X. riobravus*, *X. Wi*, DEX8 y DEX1 fueron cultivados en PP3, TSB y PP3 más el 1,25% de NaCl (PP3S) como se describe en este documento. Los caldos entonces fueron preparados como se describe en este documento y fueron analizados frente al gusano del cuerno del tabaco recién nacidos para determinar cualquier cambio en la actividad insecticida. En ambos casos experimentales (condición A que es PP3 frente a TSB; y la condición B que es PP3 frente a PP3S), la actividad funcional de las fermentaciones en PP3S y/o TSB fueron mejoradas según se compara con fermentaciones simultáneas de PP3 (Tabla 6). En ciertos casos, la actividad no fue cubierta lo que no era evidente con las fermentaciones de PP3. La actividad funcional producida en la condición A y la condición B se mostró que era termo-lábil y fue retenida por membranas de alto peso molecular (> 100.000 kDa). La adición de NaCl al caldo después de que el crecimiento bacteriano fuera completo no aumentó la actividad de la toxina indicando que la mayor actividad funcional observada no fue debida al aumento de la concentración de NaCl en el medio, sino que fue debida al incremento de la toxina.

La mayor actividad observada con *X. riobravus* fermentada en PP3S además fue investigada por la purificación parcial de toxina(s) de las fermentaciones en PP3 y PP3S como se describe en este documento. Compatible con las observaciones que usan el caldo de cultivo, la(s) fracción(ones) activa(s) del caldo PP3S (obtenido del intercambio aniónico y la cromatografía de exclusión por tamaños como se describe en este documento) contenía(n) una mayor actividad biológica, concentración de proteína y un modelo de proteína más complejo como se determina por el análisis de SDS-PAGE.

TABLA 4

El efecto de diferentes medios de cultivo en potencia funcional de caldos de fermentación de Xenorhabdus seleccionados

Cepas	Condición A		Condición B	
	PP3	TSB	PP3	PP3S
GL133B	- *	-	-	+
<i>X. riobravus</i>	+	+++	+	+++
<i>X. Wi</i>	+	+++	+	+++
DEX8	-	+	-	-
DEX6	+	++	+	+++
Control	-	-	-	-

* + = mortalidad del 25-50%, ++ = mortalidad del 51-75%, +++ = mortalidad mayor del 76%, - = mortalidad menor del 25%.

Ejemplo 5

Cepas X. nem, X. riobravus, y X. Wi de de Xenorhabdus: purificación, caracterización y actividad

El protocolo, como sigue, fue establecido basado en la purificación de aquellas fracciones que tenían la mayor parte de actividad contra el gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*), en lo sucesivo en este documento THW, como se determina en lo bioensayos (véase el Ejemplo 2). Típicamente 4-20 L del cultivo de *Xenorhabdus* que habían sido cultivados en el caldo PP3 que se filtró, como se describe en este documento, fueron recibidos y concentrados usando un cartucho de ultrafiltración en espiral de Amicon tipo S1Y100 unido a un dispositivo de filtración M 12 de Amicon (Amicon Inc., Beverly, MA). El concentrado contenía proteínas naturales en el que la mayoría consistía en las que tenían tamaños moleculares mayores que 100 kDa, mientras que el flujo a través del material contenía proteínas naturales menores que 100 kDa en tamaño. La mayoría de la actividad frente a THW estaba contenida en el concentrado de 100 kDa. El concentrado fue entonces filtrado por diálisis continuamente con fosfato de sodio 10 mM (pH=7,0) hasta que el filtrado alcanzó una $A_{280} < 0,100$. A no ser que se especifique de otra manera, todos los procedimientos de este punto fueron realizados en un tampón definido tal como el fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0). El concentrado entonces fue concentrado a un volumen final de aproximadamente 0,20 L y luego fue filtrado usando una unidad de filtración estéril de 0,45 μm (Corning, Corning, Nueva York).

ES 2 286 850 T3

El material filtrado fue cargado a 7,5 mL/min en una columna HR16/10 de Pharmacia que había sido empaquetada con una matriz de intercambio aniónico fuerte POROS 50 HQ de PerSeptive Biosystem equilibrada en tampón usando un sistema HPLC SPRINT de PerSeptive Biosystem (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Después de la carga, la columna fue lavada con tampón hasta que fue alcanzada una $A_{280nm} < 0,100$. Las proteínas entonces fueron eluidas de la columna en 2,5 mL/min utilizando tampón con NaCl 0,4 M durante 20 minutos para un volumen total de 50 mL. La columna entonces fue lavada usando tampón con NaCl 1,0 M en un mismo caudal durante 20 minutos adicionales (volumen final = 50 ml). Las proteínas eluidas con NaCl 0,4 M y 1,0 M fueron colocadas en bolsas de diálisis separadas (SPECTRA/POR Membrana MWCO: 2.000; Spectrum, Houston, Texas) y se permitió dializarse de la noche a la mañana a 4°C en 12 L de tampón. En algunos casos, la fracción 0,4 M no fue dializada, sino que inmediatamente fue desalada por filtración de gel (véase más abajo). La mayoría de la actividad frente a THW estaba contenida en la fracción 0,4 M.

La fracción 0,4 M además fue purificada por la aplicación de 20 mL a una columna XK 26/100 de Pharmacia que había sido preempaquetada con CL4B de Sepharose (Pharmacia) utilizando un caudal de 0,75 mL/min. El fraccionamiento de la fracción 0,4 M en la columna CL4B de Sepharose proporcionó de cuatro a cinco picos distintos purificando *X. nem* y *X. Wi*. Las proteínas de la cepa de *X. riobravis*, teniendo un equivalente del pico distinto frente al volumen vacío, también tenían una región de absorbancia muy amplia, baja en el intervalo de aprox. 280 minutos a aprox. 448 minutos en los 800 minutos de recorrido. Típicamente dos picos de absorbancia más grandes fueron observados después de 450 minutos y antes de 800 minutos. Las fracciones activas de *X. Wi* y *X. nem* típicamente eluyeron de aproximadamente 256 minutos a 416 minutos en los 800 minutos de recorrido.

Las fracciones fueron reunidas basado en el perfil del pico de A_{280nm} y fueron concentradas hasta un volumen final de 0,75 ml utilizando un dispositivo de filtro centrífugo ULTRAFREE-15 de Millipore con una membrana Biomax-50K NMWL (Millipore Inc., Bedford, MA) o fueron concentradas por unión a una columna MonoQ HR10/10 de Pharmacia, como se describe en este documento. Las concentraciones de proteína fueron determinadas usando un kit de ensayo de proteínas de BioRad (BioRad, Hercules, California) con γ -globulina bovina como estándar.

El peso molecular natural del complejo de toxina de THW fue determinado usando una columna HR 16/50 de Pharmacia que había sido preempaquetada con CL4B de Sepharose en dicho tampón de fosfato. La columna entonces fue calibrada usando proteínas de tamaño molecular conocido permitiendo así el cálculo del complejo de toxina aproximarse al tamaño molecular natural. Como se muestra en la Tabla 7, el tamaño molecular del complejo de toxina fue como sigue: 1500 ± 530 kDa para la cepa de *X. nem*; 1000 ± 350 kDa para la cepa de *X. riobravis*; 3290 kDa + 1150 kDa para la cepa de *X. Wi*; 980 ± 245 para la cepa de ILM078; 1013 ± 185 para la cepa de DEX6; y 956 ± 307 para la cepa de ILM080. Una fracción altamente purificada de *X. Wi*, siendo purificada dicha fracción vía intercambio iónico, filtración de gel, intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de intercambio iónico como se describe en este documento entonces fue analizada respecto al tamaño usando filtración de gel cuantitativa. Este material fue encontrado que tenía un tamaño molecular natural de 1049 ± 402 kDa (Tabla 5).

Las proteínas encontradas en el complejo de toxina fueron examinadas respecto al tamaño del polipéptido individual usando análisis de SDS-PAGE. Típicamente $20 \mu\text{g}$ de proteína del complejo de toxina de cada cepa fueron cargados en un gel de poliacrilamida del 2-15% (Integrated Separation Systems, Natick, MA) y fueron sometidas a electroforesis a 20 mA en tampón SDS-PAGE (BioRad). Después de la terminación de la electroforesis, los geles fueron teñidos de la noche a la mañana en azul de Coomassie R 250 de BioRad (0,2% en metanol: ácido acético: agua; 40:10:40 v/v/v). Posteriormente, los geles fueron destañados en metanol: ácido acético: agua; 40:10:40 (v/v/v). Los geles entonces fueron aclarados con agua durante 15 minutos y fueron explorados usando un densitómetro láser personal de Molecular Dynamics (Sunnyvale, California). Las columnas fueron cuantificadas y los tamaños moleculares fueron calculados comparando con estándares de pesos moleculares altos de BioRad, que estaban en el intervalo de 200-45 kDa.

Los tamaños de polipéptidos individuales que comprenden el complejo de toxina THW de cada cepa son catalogados en la Tabla 8. Los tamaños de los polipéptidos individuales estaban en el intervalo de 32 kDa a 330 kDa. Cada cepa de *X. Wi*, *X. nem*, *X. riobravis*, ILM080, ILM078, y DEX6 tenía polipéptidos que comprendían el complejo de toxina que estaban en el intervalo de 160-330 kDa, el intervalo de 100-160 kDa, y el intervalo de 50-80 kDa. Estos datos indican que el complejo de toxina puede variar en la composición del péptido y los componentes de cepa a cepa; sin embargo, en todos los casos los atributos de la toxina parecen consistir en un complejo proteico grande y oligomérico con subunidades en el intervalo de 23 kDa a 330 kDa.

Ejemplo 5

60 *Subfraccionamiento del complejo de toxina de Xenorhabdus a partir de X. riobravis y X. Wi*

Para el subfraccionamiento, aproximadamente 10 mg del complejo de toxina proteica de *Xenorhabdus X. riobravis* fueron aislados como se describe anteriormente y fueron aplicados a una columna HR 10/10 MonoQ de Pharmacia equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 7,0 a un caudal de 2 mL/min. La columna fue lavada con dicho tampón hasta que una absorbancia de 280 nm volvió a la línea de fondo. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1,0 M en dicho tampón a 2 mL/min durante 1 h. Fracciones de dos mL fueron recogidas y sometidas a análisis por bioensayo frente a THW como se describe en este documento. Los picos de actividad fueron determinados examinando una dilución de 2 veces de cada fracción en bioensayos de THW. Un pico

ES 2 286 850 T3

de actividad frente a THW fue observado que eluía a aproximadamente NaCl 0,3-0,4 M. Las fracciones que tenían actividad frente a THW fueron reunidas y analizadas por electroforesis de gel de SDS-PAGE. Fue observado que había cuatro péptidos predominantes que tenían los tamaños aproximados de 220 kDa, 190 kDa, 130 kDa y 54 kDa.

5 Los péptidos descritos anteriormente fueron sometidos a electroforesis en un SDS-PAGE del 4-20% (Integrated Separation Systems) y fueron transferidos a membranas PVDF de PROBLOTT (Applied Biosystems, Foster City, California). Las transferencias fueron enviadas para el análisis de aminoácidos y la secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal en Harvard MicroChem y Cambridge ProChem, respectivamente.

10 Para los experimentos de subfraccionamiento con *X. Wi*, aprox. 10 mg de toxina fueron aplicados a una columna HR 10/10 Monoq equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 7,0 a un caudal de 2 mL/min. La columna fue lavada con dicho tampón hasta que la A_{280nm} volvió a la línea de fondo. Las proteínas unidas a la columna fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1,0 M en dicho tampón a 2 mL/min durante 1 h. Fracciones de dos mL fueron
15 principales detectables a A_{280nm} fueron observados. La mayoría de la actividad funcional de THW que fue observada eluyó a aproximadamente NaCl 0,10-0,25 M. Las fracciones que tenían actividad frente a THW fueron reunidas y analizadas por electroforesis de gel. En la SDS-PAGE fue observado que había hasta ocho péptidos predominantes que tenían los tamaños aproximados de 330 kDa, 320 kDa, 270 ka, 220 kDa, 200 kDa, 190 kDa, 170 kDa, 130 kla, 91 kDa, 76 kDa, 55 kDa y 36 kDa.

20 La fracción de actividad del pico de THW reunida fue aplicada a la columna de HR 5/5 de fenil-sepharose. $(NH_4)_2SO_4$ sólido se añadió a una concentración final de 1,7 M. La solución entonces fue aplicada a la columna equilibrada con $(NH_4)_2SO_4$ 1,7 M en tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7, a 1 mL/min. Las proteínas unidas a la columna entonces fueron eluidas con un gradiente lineal de $(NH_4)_2SO_4$ 1,7 M, fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0 hasta fosfato
25 de potasio 10 mM, pH 7,0 a 0,5 mL/min durante 60 minutos. Después de los bioensayos de THW, fue determinado que la actividad del pico eluía a una A_{280nm} entre 40 minutos a aprox. 50 minutos. Las fracciones fueron dializadas de la noche a la mañana contra tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0. En la SDS-PAGE fue observado que había hasta seis péptidos predominantes que tenían los tamaños aproximados de 270 kDa, 220 kDa, 170 kDa, 130 kDa, y 76 kDa.

30 Los péptidos de fracciones de THW activas de la columna de fenil-sepharose de 5/5 o 10/10 fueron sometidos a electroforesis en un gel de SDS-PAGE del 4-20% (Integrated Separation Systems) y fueron transferidos a membranas de PVDF de PROBLOTT (Applied Biosystems, Foster City, California). Las transferencias fueron enviadas para el análisis de aminoácidos y la secuenciación de aminoácidos del extremo N-terminal a Harvard MicroChem y Cambridge ProChem, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos del extremo N-terminal para los péptidos de 130 kDa
35 (SEQ ID NO: 1), 76 kDa (SEQ ID NO: 2) y 38 kDa (SEQ ID NO: 3) son introducidas en este documento.

Los bioensayos de insecto fueron realizados usando el complejo de toxina o las fracciones purificadas de THW de fenil-sepharose. La actividad funcional (mortalidad al menos del 20%) y/o la inhibición del crecimiento (al menos el 40%) fue observada para el gusano cogollero, la lagarta del girasol, el gusano del cuerno del tabaco, la oruga del
40 tabaco, el perforador de grano europeo y el gusano de la raíz del maíz del sur. En las preparaciones del complejo de toxina analizadas, la actividad más alta fue observada frente al gusano del cuerno del tabaco y la oruga del tabaco que frente a las larvas del gusano de la raíz del maíz del sur. La actividad del insecto del complejo de toxina de *X. Wi* y cualesquiera otras fracciones adicionalmente purificadas se mostraron que eran termo-sensibles.

45 Ejemplo 6

Producción, aislamiento y caracterización de la cepa X. carpocapsae de Xenorhabdus

Un inóculo del 1% de un cultivo de noche del aislado de *X. carpocapsae*, también conocido como *X. carp*, fue
50 añadido a un matraz de 125 mL que contenía 25 mL de PP3 y fue incubado durante 72 h a 28°C en un agitador rotatorio a 250 revoluciones por minuto. Después, los cultivos fueron centrifugados durante 20 minutos a 10.000 x g como se describe en este documento seguido de la filtración del sobrenadante usando un filtro de membrana de 0,2 μ m. Una muestra de 15 mL del sobrenadante entonces fue añadida a un dispositivo de filtro centrífugo NMWL 100.000 de Ultrafree-15 (Millipore, MA) y fue centrifugado a 2000 x g. El concentrado fue lavado 2 x con KPO4 100 mM, pH
55 6,9, y luego fue resuspendido en 1,0 mL del mismo. Las proteínas fueron analizadas con SDS-PAGE como se describe en este documento utilizando un gel de resolución del 10% y un gel de carga del 4% con tamaños calibrados usando estándares de BioRad preteñidos (Hercules, California). Los geles fueron sometidos a electroforesis a 40V durante 16 h a 15°C y luego fueron teñidos con Azul Coloidal de Novex, Inc., (San Diego, California).

60 Para separaciones adicionales, las muestras fueron aplicadas a una columna S4000 de BIO-SEP (Phenomenex, Torrance, California), I.D. 7,5 mm, CML 60 cm en un sistema isocrático usando KPO₄ 100 mM, pH 6,9. La cantidad total cargada por muestra fue 250-500 μ g de proteína. Las fracciones fueron recogidas en 3 grupos dependiendo del tamaño de la proteína (cromatografía de exclusión por tamaños) como sigue: proteínas mayores que 1.000 kDa; proteínas iguales a 800-1.000 kDa; y proteínas menores que 800.000 kDa. La fracción de 800.000-1.000.000 Da fue
65 seleccionada para posteriores análisis.

ES 2 286 850 T3

TABLA 5

Caracterización de un complejo de toxina de cepas de Xenorhabdus

CEPA	TAMAÑO DE COMPLEJO DE TOXINA ^a
X. Wi	3290 kDa ± 1150 kDa
X. Wi (Altamente Purificado)	1049 kDa ± 402 kDa
X. nem	1010 kDa ± 350 kDa
X. riobravus	1520 kDa ± 530 kDa
ILM 078	980 kDa ± 245 kDa
ILM 080	1013 kDa ± 185 kDa
DEX6	956 kDa ± 307 kDa

^apeso molecular natural determinado utilizando una columna HR16/50 de Pharmacia empaquetada con CL4B de Sepharose. X. Wi altamente purificado era de una fracción aislada de una columna Q 5/5 de Mono.

TABLA 6

Tamaños moleculares de péptidos en el complejo de toxina de cepas de Xenorhabdus en kDa

X. Wi	X. nem	X. riobravus	ILM 080	ILM 078	DEX 6
330	220	220	200	203	201
320	190	190	197	200	181
270	170	100	173	173	148
220	150	96	112	150	138
200	140	92	106	144	128
190	85	85	90	106	119
170	79	79	80	80	90
130	65	65	74	62	75
91	56	56	61	58	65
76	50	50	60	54	59
55	42	47	58	50	55
49	38	42	55	45	45
46	31	38	53		41
43	29	34	48		37
40	26	31	46		32
36		26	43		
32		23	42		
			40		

Las fracciones de 800-1000 kDa, que tenían la actividad más funcional, fueron reunidas y concentradas usando un dispositivo de filtro centrífugo de NMWL 100.000 (Millipore, Bedford, MA). Cada fracción de concentrado reunida fue lavada 2 x y fue resuspendida en 300 μ L de KPO₄ 100 mM, pH 6,9. Las concentraciones de proteína fueron determinadas usando el kit de reactivo de ensayo de proteína de ácido bicínico (Pierce, Rockford, IL). Las proteínas en esta fracción fueron analizadas con SDS-PAGE como se describe en este documento y fue encontrado que había muchas proteínas de tamaños diferentes. Este material entonces fue separado después en una columna DEAE por la que las proteínas fueron eluidas con concentraciones de sal creciente. Aquellas fracciones que tenían la mayor actividad entonces fueron examinadas de nuevo vía SDS-PAGE y fue encontrado que estaban comprendidas de 4 proteínas predominantes que tenían los siguientes tamaños: 200, 190, 175 y 45 kDa. La fracción activa de la etapa de DEAE fue pasada por una columna de filtración de gel de HPLC como se describe anteriormente (BioSep S4000) y la actividad tóxica frente a *Manduca sexta* fue encontrada que estaba contenida dentro de una fracción que tenía proteínas naturales > 800 kDa.

ES 2 286 850 T3

Los bioensayos fueron realizados como sigue. Huevos de *M. sexta* fueron comprados en la compañía Carolina Biological Supply. Los huevos fueron incubados y criados con una dieta de germen de trigo fresca (ICN, CA) mientras que se incubaban a 25°C con una incubadora de fotociclo de luz de 16 h /8 h de oscuridad. Los datos de la toxicidad oral fueron determinados colocando doce larvas de *M. sexta* en un pedazo de alimento de insecto que contenía 300 µg de concentrado de ultrafiltración obtenido como se describe anteriormente. Las observaciones fueron hechas a los 5 días. Para las fracciones de cromatografía de exclusión de HPLC-tamaño, 20 µg de la proteína total fueron aplicados a la dieta de germen de trigo. El experimento fue repetido por duplicado.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 286 850 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un cultivo de microorganismos sustancialmente puro que comprende una cepa de *Xenorhabdus* seleccionada a partir del grupo que consiste en las cepas que tienen el número de depósito NRRL-B-21732, NRRL-B-21733, NRRL-B-21734, NRRL-B-21735, KRRL-B-21736, y NRRL-B-21737.

10 2. Un cultivo de microorganismos sustancialmente puro como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la cepa de *Xenorhabdus* tiene el número de depósito NRRL-B-21733.

10 3. El método para producir una toxina proteica de *Xenorhabdus* a partir del cultivo que se reivindica en la reivindicación 1, en el que la toxina tiene actividad funcional oral contra un insecto.

15 4. El método para producir una composición que comprende una cantidad eficaz de una toxina proteica de *Xenorhabdus* a partir del cultivo que se reivindica en la reivindicación 1, en el que la toxina tiene actividad funcional oral contra un insecto.

20

25

30

35

40

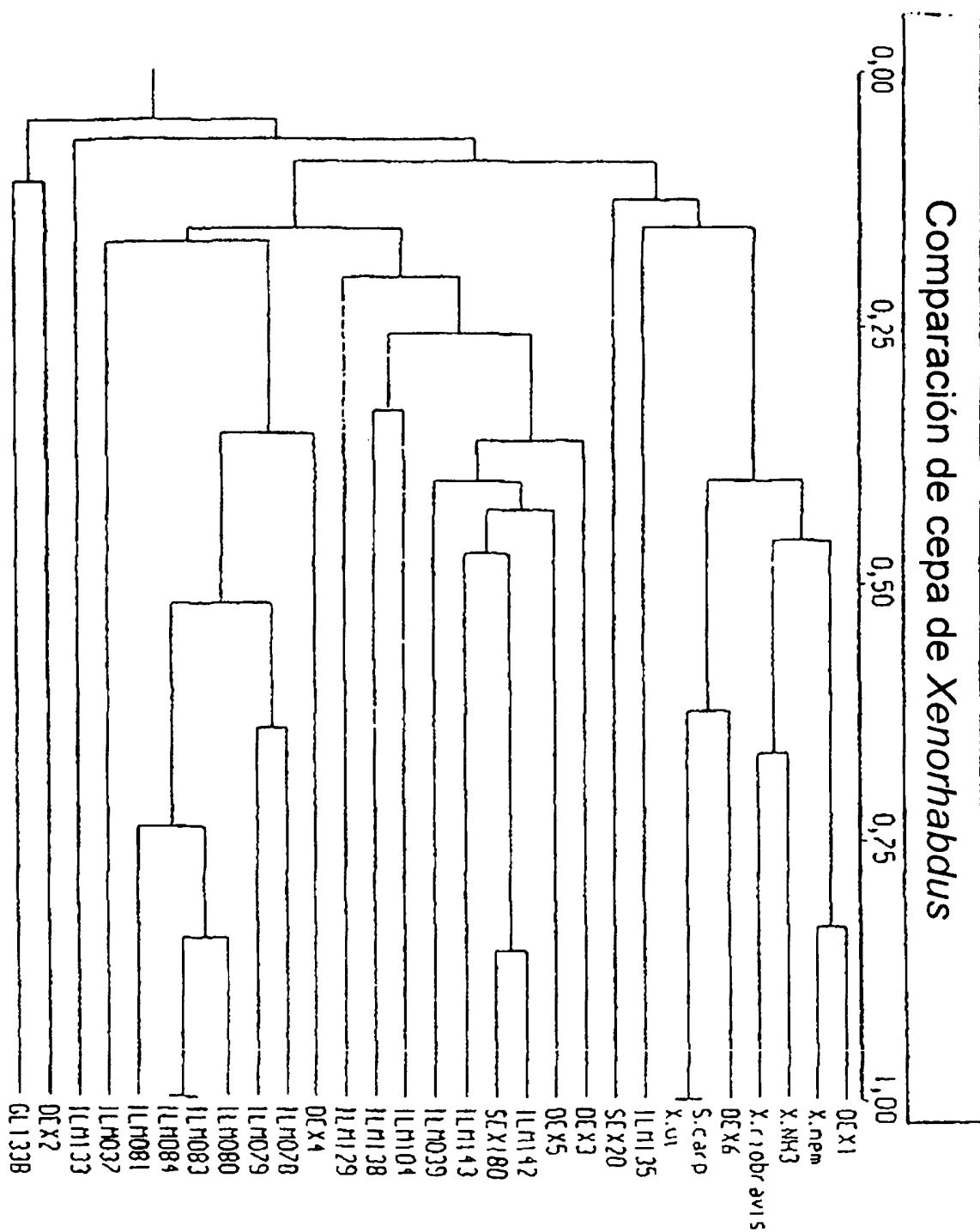
45

50

55

60

65



ES 2 286 850 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTES: Ensign, Jerald C.
Bowen, David J.
Tenor, Jennifer L.
Ciche, Todd A.
10 Petell, James K.
Strickland, James A.
Orr, Gregorio L.
Fatig, Raymond
Bintrim, Scott B.
- 15 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Toxinas proteicas insecticidas de *Xenorhabdus*
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 3
- (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
- 20 (A) DESTINATARIO: Dow AgroSciences, LLC
(B) CALLE: 9330 Zionsville Road
(C) CIUDAD: Indianápolis
25 (D) ESTADO: IN
(E) PAÍS: EE.UU.
(F) CÓDIGO POSTAL: 46268
- (v) FORMATO LEGIBLE PARA EL ORDENADOR
- 30 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
(B) ORDENADOR: IBM
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
35 (D) SOFTWARE: PatentIn Release N°. 1.0, Versión N°. 1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUALES
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
40 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Borucki, Andrea T.
45 (B) NÚMERO DE COLEGIADO: 33651
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/ETIQUETA: 50612P1
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN
- 50 (A) TELÉFONO: 317-337-4846
(B) NÚMERO DE FAX: 317-337-4847

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA;
- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
60 (C) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO MOLECULAR: proteína
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: extremo N-terminal
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1

ES 2 286 850 T3

Asn Gln Asn Val Glu Pro Ser Ala Gly Asp Ile Val
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA;

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: extremo N-terminal

(vi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 2

Ser Gln Asn Val Tyr Arg Tyr Pro
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA;

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 3

Met Thr Lys Gln Glu Tyr Leu
1 5