



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 125**

51 Int. Cl.:
C07K 14/325 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02718513 .1**
86 Fecha de presentación : **28.03.2002**
87 Número de publicación de la solicitud: **1487868**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.12.2004**

54 Título: **Proteína endotoxina δ quimérica de Cry1Ea y Cry1Ca.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es: **COUNCIL OF SCIENTIFIC AND
INDUSTRIAL RESEARCH
Rafi Marg
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es: **Tuli, Rakesh**

74 Agente: **Torner Lasalle, Nuria**

ES 2 294 125 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

Proteína endotoxina δ quimérica de Cry1Ea y Cry1Ca.

5 **Ámbito técnico**

La presente invención se refiere a una proteína endotoxina δ quimérica Cry 1E de ID SEC N° 1 con extraordinariamente alta propiedad insecticida y a un gen quimera de ID SEC N° que codifica dicha proteína quimérica, y también a un método para tratar plantas infestadas por insectos usando dicha proteína quimera.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los daños debidos a los insectos cuestan miles de millones de dólares anualmente en forma de pérdidas de cosechas y debido al gasto que es necesario efectuar para mantener a estas plagas bajo control. Las pérdidas que son ocasionadas por las plagas en los entornos de producción agrícola incluyen la disminución del rendimiento de los cultivos, la mala calidad de las cosechas, los incrementados costes de recolección y los perjuicios para la salud y el medio ambiente.

Puede hacerse referencia Hofte H. y Whiteley H.R., 1989, "Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*", Microbiol. Rev. 53: 242-255, donde la especie *Bacillus thuringiensis* (B.t.) es una ubicua bacteria del suelo formadora de esporas y gram-positiva que es conocida por su capacidad para producir inclusiones cristalinas parasporales durante la esporulación. Estas inclusiones constan de proteínas que son conocidas como proteínas cristal o proteínas Cry o endotoxinas δ y presentan actividad insecticida, particularmente contra las larvas de especies de insectos de los órdenes de los lepidópteros, los dípteros y los coleópteros. Han sido también mencionadas en la literatura proteínas con toxicidad para insectos de los órdenes de los himenópteros, los homópteros, los ortópteros y los malófagos; los nematodos; los ácaros y los protozoos (pueden citarse al respecto Feitelson J.S., 1993, "The *Bacillus thuringiensis* family tree", 63-71, en L. Kim ed. Advanced engineered pesticides. Marcel Dekker. Inc., New York, N.Y. y Feitelson *et al.*, 1992, "*Bacillus thuringiensis*: insects and beyond", Bio/Tech. 10: 271-275). Varias cepas de *Bacillus thuringiensis* (B.t.) han sido identificadas con distintos espectros de huéspedes y clasificadas en distintas subespecies o serotipos sobre la base de los antígenos flagelares. El Instituto Pasteur de Francia ha catalogado 55 distintos serotipos flagelares y 8 biotipos no flagelados. Puede hacerse referencia a Schnepf *et al.*, 1998, "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins", Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806, donde varios genes codificadores de toxinas B.t. han sido clonados, secuenciados y caracterizados y han sido producidos y aprobados para el uso comercial productos basados en ADN recombinante. Mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética se han desarrollado nuevos enfoques para aportar estas toxinas B.t. a los ambientes agrícolas, incluyendo el uso de los cultivos manipulados genéticamente y de las células microbianas intactas estabilizadas como vehículos de aportación de endotoxinas δ (Gaertner, F.H., Kim L., 1988, TIBTECH 6: 54-57). Así, están llegando a ser comercialmente valiosos los genes de endotoxinas δ que codifican para proteínas dirigidas a matar a los huéspedes, y especialmente a las plagas y los insectos que ocasionan pérdidas económicas.

El uso comercial de los pesticidas B.t. en un determinado ambiente de cultivo es limitado porque una determinada endotoxina δ presenta toxicidad para una estrecha gama de plagas objetivo. Han venido usándose durante muchos años como insecticidas comerciales contra plagas de lepidópteros preparaciones de las esporas y los cristales de *B. thuringiensis* de la subespecie *kurstaki*. Por ejemplo, la variedad *kurstaki* HD-1 de *B. thuringiensis* produce varias endotoxinas δ y es por consiguiente tóxica para una relativamente más amplia gama de insectos lepidópteros. Sin embargo, las formulaciones basadas en las endotoxinas δ conocidas, incluyendo las B.t.k. HD-1, no son eficaces contra algunas de las plagas importantes de los cultivos, tales como las de *Spodoptera* sp., que también pertenecen al orden de los lepidópteros. Otras especies de B.t., y concretamente la *israelensis* y la *tenebrionis*, han sido usadas comercialmente para controlar ciertos insectos de los órdenes de los dípteros y los coleópteros, respectivamente (pueden citarse al respecto (Gaertner, F.H., 1989, "Cellular Delivery Systems for Insecticidal Proteins: Living and Non-Living Microorganisms", en Controlled Delivery of Crop Protection Agents, R.M. Wilkins, ed., Taylor and Francis, New York y Londres, 1990, pp. 245-255; Couch T.L., 1980, "Mosquito Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*", Development in Industrial Microbiology 22: 61-76 y Beegle C.C., 1978, "Use of Entomogenous Bacteria in Agroecosystems", "Developments in Industrial Microbiology" 20: 97-104). Kreig *et al.* (1983), en Z. ang. Ent. 96: 500-508, describen *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* que al parecer es activa contra dos escarabajos del orden de los coleópteros, es decir los escarabajos de la patata de Colorado *Leptinotarsa decemlineata* y *Agelastica alni*.

Puede hacerse referencia a Crickmore *et al.*, 1998, "Revision in the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins", Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 807-813, donde los genes de proteínas cristal son clasificados en 22 clases, primariamente sobre la base de la homología de las secuencias de aminoácidos. La clonación y expresión de un gen de proteína cristal B.t. en *Escherichia coli* ha sido descrita en varios casos en la literatura publicada (puede citarse al respecto Schnepf *et al.*, 1981, "Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*"). Las Patentes U.S. Núms. 4.448.885 y 4.467.036 describen la expresión de proteína cristal B.t. en *E. coli*. Las Patentes U.S. Núms. 4.797.276 y 4.853.331 describen *B. thuringiensis* de la cepa *tenebrionis* que puede ser usada para controlar plagas de coleópteros en varios ambientes. La Patente U.S. N° 4.918.006 describe

toxinas B.t. que tienen actividad contra dípteros. La Patente U.S. N° 4.849.217 describe aislados de B.t. que tienen actividad contra el gusano verde de la alfalfa. La Patente U.S. N° 5.208.017 describe aislados de *Bacillus thuringiensis* que tienen actividad contra los coleópteros. Las Patentes U.S. Núms. 5.151.363 y 4.948.734 describen ciertos aislados de B.t. que tienen actividad contra los nematodos. Extensivos recursos e investigaciones están siendo dedicados a descubrir nuevos aislados de B.t. y sus usos. Hasta la fecha sigue siendo una técnica empírica e imprevisible el descubrimiento de nuevos aislados de B.t. y de nuevos usos de los aislados de B.t. conocidos. Varios laboratorios en todo el mundo están intentando aislar nuevos genes de endotoxinas δ de *B. thuringiensis* para distintas gamas de huéspedes y distintos mecanismos de acción.

Bulla *et al.*, 1980, "Ultrastructure, physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*". CRC Crit. Rev. Microbiol. 8: 147-204 y Grochulski *et al.*, 1995, "*Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation", J. Mol. Biol. 254: 447-464, han descrito que la mayoría de las proteínas cristal insecticidas B.t. son sintetizadas de forma natural como protoxinas (de un peso molecular de 130-140 kDa) que forman inclusiones parasporales en virtud de interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y puentes de disulfuro. Las protoxinas, que no son tóxicas para las larvas de los insectos, se componen de dos segmentos que son la mitad N-terminal y la mitad C-terminal. Las protoxinas son convertidas en toxinas funcionalmente activas (de 60-70 kDa) en el intestino medio del insecto a continuación de su fragmentación específica de sitio por parte de proteasas a pH alcalino. Tales endotoxinas δ truncadas procesadas proteolíticamente se fijan a receptores específicos en el intestino medio del insecto y ocasionan mortalidad haciendo poros en la membrana epitelial (pueden citarse al respecto las referencias de Bietlot *et al.*, 1989, "Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*", Biochem. J., 260: 87-91; Choma *et al.*, 1990, "Unusual proteolysis of the protoxin and toxin from *Bacillus thuringiensis*: structural implications", Eur. J. Biochem. 189: 523-27; y Hofte *et al.*, 1986, "Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715", Eur. J. Biochem. 161: 273-280). La toxina activa resistente a la proteasa corresponde a la mitad N-terminal de la molécula de protoxina. Se cree que el otro segmento correspondiente a la mitad C-terminal se requiere para la formación de cristales altamente estables. Durante el procesamiento proteolítico es retirado del N-terminal de la protoxina un pequeño polipéptido que comprende aproximadamente 25-30 residuos de aminoácidos.

Son conocidas las estructuras cristalinas del segmento tóxico central de las endotoxinas δ Cry1Aa y Cry3Aa (Grochulsky *et al.*, "*Bacillus thuringiensis* CryIA(a) insecticidal toxin: crystal structure and channel formation", J. Mol. Biol. 254: 447-464 y Li *et al.*, 1991, "Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution", Nature. 353: 815-821), y sus estructuras tridimensionales son superponibles. Los dominios polipeptídicos razonablemente conservados sugieren que las correspondientes toxinas tienen una similar estructura topológica. Éstas son moléculas globulares que se componen de 3 distintos dominios estructurales conectados por pequeños ligadores peptídicos. No hay cruzamientos de las cadenas de polipéptidos entre los dominios. El dominio I consta de 7 estructuras helicoidales α . El dominio II consta de tres hojas β antiparalelas y dos hélices α cortas. El dominio III es un sándwich β de dos hojas β altamente trenzadas antiparalelas. Los dominios II y III están situados en el lado en el que quedan encarados a la hélice $\alpha 7$ del dominio I. Estos dominios están estrechamente empaquetados en virtud de numerosas fuerzas de van der Waals y numerosos enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas (puentes de sal) entre los dominios.

Una de las principales razones para la estrecha gama de huéspedes de las endotoxinas δ es la de que estas proteínas necesitan receptores específicos en el intestino del insecto a fin de hacer poros y ocasionar toxicidad. Puesto que una determinada endotoxina δ presenta toxicidad para una muy reducida gama de insectos, es deseable manipular estas proteínas para modificar su reconocimiento de receptores en el intestino medio larval, para hacer que resulte más amplia la gama de huéspedes y mejorar la toxicidad. Se han seguido dos enfoques con esta finalidad, que son primeramente el desarrollo de genes quiméricos (o híbridos) a base de intercambiar dominios funcionales de las proteínas, y en segundo lugar el desarrollo de proteínas endotoxinas δ mejoradas mediante mutagénesis sitio-dirigida. Puede hacerse referencia a las Patentes U.S. Núms. 5.128.130 y 5.055.294, en las que han sido construidas proteínas cristal B.t. híbridas que presentan una incrementada toxicidad y son de aplicación a una gama de huéspedes ampliada en cuanto a las plagas objetivo.

Puede hacerse referencia a Honne *et al.*, 1990, "A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum" Appl. Environ. Microbiol. 56: 823-825, donde se ha hecho la fusión traslacional de dos genes *cry* (*cry1Ab* y *cry1Ca*). La proteína híbrida resultante tenía un más amplio espectro de toxicidad que abarcaba a los de las dos proteínas cristal progenitoras que sirvieron para obtenerla. Sin embargo, el inconveniente es que la actividad de la toxina quimérica no aumentó con respecto a ninguna de las toxinas progenitoras para con las plagas insectiles que constituyen el objetivo perseguido. A pesar de la mala toxicidad, el gen de fusión fue expresado en tabaco tras modificación parcial, lo cual confirió solamente una protección parcial a las plantas transgénicas contra una más amplia gama de insectos entre los que se incluyen los de las especies *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* y *Manduca sexta* (puede citarse a este respecto la referencia de van der Salm *et al.*, 1994, "Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* *cry1Ab* and *cry1C* genes: a resistance management strategy", Plant. Mol. Biol. 26: 51-59).

Puede hacerse referencia a Honee *et al.*, 1991, "The C-terminal domain of the toxic fragment of *Bacillus thuringiensis* crystal protein determines receptor binding", Mol. Microbiol. 5: 2799-2806, donde han sido construidos 11 genes quiméricos usando *cry1Ab* y *cry1Ca* como genes progenitores a base de intercambiar dominios funcionales. El inconveniente es el de que solamente presentaban actividad insecticida dos proteínas quiméricas en las cuales habían

sido intercambiados dominios formadores de poros. Sin embargo, la eficacia de las proteínas quiméricas toxinas era más baja que la de las proteínas progenitoras. Otras proteínas híbridas eran atóxicas.

5 Masson *et al.*, 1992, "Insecticidal properties of a crystal protein gene product isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*", Appl. Environ. Microbiol. 58: 2, 642-646, describieron que una de las endotoxinas δ Cry1, y concretamente la Cry1Ea, no presenta toxicidad contra las larvas de *Spodoptera*. Además puede hacerse referencia a Bosch *et al.*, 1994, "Recombinant *Bacillus thuringiensis* Crystal protein with new properties: possibilities for resistance management", Bio/Tech 12: 915-918, donde muchos genes quiméricos han sido desarrollados a continuación de la recombinación *in vivo* de genes *cry1Ca* y *cry1Ea*. La endotoxina δ expresada desde uno de los genes quiméricos, la cual constaba del dominio I y II de la proteína Cry1Ea y del dominio III de la proteína Cry1Ca, presentaba actividad larvicida. La transferencia del dominio III de la Cry1Ca a la proteína Cry1Ea dio una proteína insecticida. Sin embargo, la toxina quimérica no era una toxina mejorada con respecto a la Cry1Ca, que es la toxina mejor descrita para *Spodoptera* sp. Otra toxina quimérica presentó muy mala toxicidad. Las toxinas quiméricas restantes eran inestables o atóxicas.

15 Puede citarse la referencia de Rang *et al.*, 1999, "Interaction between functional domain of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein", Appl Environ Microbiol, 65, 7: 2918-25, donde han sido desarrollados muchos genes quiméricos intercambiando las regiones que codifican para dominio I o dominio III de entre las endotoxinas δ Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ca y Cry1Ea y se ha verificado su estabilidad en *E. coli* y la permeabilidad de la membrana plásmica de células *Sf9*. Una toxina quimérica (que constaba de los dominios I y II de Cry1Ca y del dominio III de Cry1Ab) era más tóxica que las toxinas progenitoras. El intercambio del dominio III de Cry1Ab con el de Cry1Ca hizo que la proteína quimérica fuese más activa que la proteína Cry1Ca. Las proteínas con el intercambio de otros dominios eran inestables o menos tóxicas que las proteínas progenitoras. Sin embargo, no fue sometida a ensayo la toxicidad de la proteína quimérica para las larvas de insectos. Fue comparada la formación de poros en las líneas celulares de insectos, pero eso no puede ser correlacionado con la actividad insecticida de la endotoxina δ .

20 Puede hacerse referencia a Chandra *et al.*, 1999, "Amino acid substitution in alpha-helix 7 of Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner", FEBS Lett. 458: 175-179, donde se comprobó que un motivo hidrofóbico en el extremo C-terminal del fragmento B de la toxina de la difteria era homólogo con la hélice $\alpha 7$ de las endotoxinas δ . Tras la sustitución de la hélice $\alpha 7$ de la proteína Cry1Ac por este polipéptido, la proteína quimérica presentaba de 7 a 8 veces más toxicidad para con *Helicoverpa armigera*. El incremento de la toxicidad era debido a la mayor capacidad de formación de poros.

25 Estos ejemplos establecen el potencial de la manipulación de proteínas para el mejoramiento de las toxinas nativas, para desarrollar endotoxinas δ comercialmente útiles.

30 Las plagas de lepidópteros son en su mayoría de naturaleza polífaga. El del género *Spodoptera* es un insecto lepidóptero común y sus 5 especies (*litura*, *littoralis*, *exigua*, *frugiperda* y *exempta*) se encuentran en todo el mundo. La de *Spodoptera littoralis* (el gusano de la hoja del algodón egipcio, CLW) es una importante plaga del algodón y otros cultivos de importancia agronómica en Europa (puede citarse a este respecto la referencia de Mazier *et al.*, 1997, "The *cry1C* gene from *Bacillus thuringiensis* provides protection against *Spodoptera littoralis* in young transgenic plants", Plant Sci. 127: 179-190. Se trata de una notoria plaga del algodón, del cacahuete, de la guindilla, de las leguminosas y de varios cultivos vegetales, especialmente en las regiones cálidas y húmedas tales como las partes meridionales de la India. La alta fecundidad, el corto ciclo de vida, los destructivos hábitos de alimentación y la frecuentemente descrita emergencia de resistencia a los insecticidas químicos han hecho que el control de *Spodoptera* constituya un creciente problema agrícola. Puede hacerse referencia a Bai *et al.*, 1993, "Activity of insecticidal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker)" J. Inverteb. Pathol. 62: 211-215, donde se expone que las larvas jóvenes son susceptibles a ciertas endotoxinas δ , pero las larvas que están más allá del 2º instar presentan considerable tolerancia. Esto ha sido atribuido al alto contenido de proteasas alcalinas en el jugo intestinal (puede citarse a este respecto la referencia de Keller *et al.*, 1996, "Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to Cry1C", Insect Biochem. Mol. Biol. 26: 365-373).

35 Se ha descrito que cuatro distintas endotoxinas δ ocasionan un bajo nivel de mortalidad a los *Spodoptera* sp. De éstas, la Cry1Ca es la toxina más eficaz. Las plantas que expresaban Cry1Ca a alto nivel ocasionaban mortalidad y por consiguiente conferían protección contra las larvas en fase instar inicial (pueden citarse a este respecto las referencias de Mazier *et al.*, 1997, "The *cry1C* gene from *Bacillus thuringiensis* provides protection against *Spodoptera littoralis* in young transgenic plants". Plant Sci. 127: 179-190 y Strizhov *et al.*, 1996, "A synthetic *cry1C* gene, encoding a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin, confers *Spodoptera* resistance in alfalfa and tobacco" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 15012-15017). Sin embargo, en ningún caso se ha descrito una protección total contra *Spodoptera*. Las larvas en fases de desarrollo avanzadas son matadas a moderados niveles de las endotoxinas δ conocidas. Por consiguiente, las plantas transgénicas que expresan Cry1Ca no son eficaces como plantas deseables para la protección contra *Spodoptera*. Otros genes tales como los *cry1Cb*, *cry1Ea* y *cry1F* no han sido empleados para el desarrollo de plantas transgénicas contra *Spodoptera* debido a su comparativamente baja toxicidad. La endotoxina δ Cry1Cb es 5 veces menos tóxica que la Cry1Ca. La toxicidad de la endotoxina δ Cry1Ea es muy baja y es puesta en duda en ciertos trabajos (pueden citarse a este respecto Masson *et al.*, 1992 y Bosch *et al.*, 1994). La Cry1F presenta ligera toxicidad para las larvas de *Spodoptera* (puede citarse a este respecto Chambers *et al.*, 1991).

Puede hacerse referencia a Kalman *et al.*, 1993, "Cloning of a novel *cryC*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Galleriae*", Appl. Environ. Microbiol. 59: 4: 1131-1137, donde se describe que la endotoxina δ Cry1Cb es 5 veces menos tóxica que la Cry1Ca. Los dos primeros dominios de estas proteínas son altamente homólogos (idénticos en un 92%). Se observa una diferencia importante en el dominio III, que presenta tan sólo una homología del 48%. La más alta toxicidad (5 veces superior) de la Cry1Ca en comparación con la endotoxina δ Cry1Cb nos sugirió que el dominio III de la Cry1Ca podría desempeñar un importante papel en su eficacia. La toxicidad de la endotoxina δ Cry1Ea es muy mala por cuanto que la misma se fija al receptor muy débilmente en el intestino medio de *Spodoptera exigua*, pero el intercambio del dominio III de Cry1Ca con el de Cry1Ea hizo que ésta última fuese tóxica. Esto sugiere el papel desempeñado por el dominio III de la proteína Cry1C en la fijación al receptor en el intestino medio de *Spodoptera* (puede citarse a este respecto la referencia de Bosch *et al.*, 1994, "Recombinant *Bacillus thuringiensis* Crystal protein with new properties: possibilities for resistance management". Bio/Tech 12: 915-918). En esta publicación, Bosch *et al.* (1994) establecieron la ventaja de la toxina híbrida por cuanto que la misma se fija a un receptor al que la Cry1Ca no se fija. Sin embargo era equiparable la toxicidad de ambas, o sea de la Cry1Ca nativa y de la Cry1Ea híbrida. Estos autores presentaron una patente (US 5736131) en la cual se reivindicaba un mejoramiento de 1,9 veces de la toxicidad para con *Spodoptera exigua*. La diferencia entre los resultados de la publicación que describe que no se da un acrecentamiento de la toxicidad y de la patente que reivindica una toxicidad mejorada 1,9 veces hace que la situación resulte en general poco clara.

La tecnología de la ingeniería genética en las plantas ha experimentado importantes adelantos durante los últimos 10 años. Ha llegado a ser posible introducir de manera estable genes foráneos en plantas. Esto ha proporcionado interesantes oportunidades para la agricultura moderna. Derivados del plásmido Ti del patógeno vegetal *Agrobacterium tumefaciens* han demostrado ser vehículos eficaces y altamente versátiles para la introducción de genes foráneos en tejido vegetal. Adicionalmente han sido desarrollados con la misma finalidad los de una variedad de métodos para aportar ADN (ADN = ácido desoxirribonucleico), tales como la electroporación, la microinyección, la transferencia de genes mediada por polen y la tecnología del cañón de partículas.

El principal objetivo que persigue la transformación de plantas mediante ingeniería genética ha sido el del mejoramiento de los cultivos. Se han hecho considerables esfuerzos para manipular las plantas para lograr que las mismas presenten rasgos útiles tales como la resistencia a los insectos. A este respecto se han logrado progresos en la línea de dotar artificialmente de resistencia a los insectos a las plantas transgénicas mediante el uso de genes que codifican endotoxinas δ y pertenecen a cepas de *B. thuringiensis*. Puesto que las endotoxinas δ poseen un específico espectro insecticida y no presentan toxicidad para otros animales y humanos no huéspedes, las mismas son muy adecuadas para desarrollar plantas comercialmente útiles. No se conoce otra proteína que como las endotoxinas δ presente una toxicidad tan alta (a niveles de ppm) y sea sin embargo tan inocua para los organismos que no constituyen el objetivo de la misma.

Se ha demostrado la viabilidad de generar cultivos transgénicos que sean resistentes a los insectos y expresen endotoxinas δ y su éxito en la agricultura comercial. (Puede hacerse a este respecto referencia a Vaeck *et al.*, 1987, "Transgenic plants protected from insect attack", Nature. 328: 33-37; Fischhoff *et al.*, 1987, "Insect tolerant transgenic tomato plants", Bio/tech. 5: 807-813; Barton *et al.*, 1987, "*Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects", Plant Physiol. 85: 1103-1109). Las plantas transgénicas ofrecen una alternativa para el control de insectos en agricultura que es al mismo tiempo inocua, compatible con la conservación del medio ambiente y rentable. Se ha observado un exitoso control de insectos bajo las condiciones que se dan en el campo (puede hacerse referencia a Delannay *et al.*, 19889; Meeusen y Warren, 1989).

Puede citarse la referencia de Von Tersch *et al.* 1991, "Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp *kanyae*: Gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* Cry1A(c) toxin" en Appl and Environ Microbiol, 57:2:39-58, donde fueron aisladas de dos distintas cepas dos variantes de *cryIAc*. Su composición de aminoácidos era distinta en 7 posiciones. Ambas endotoxinas δ eran expresadas en *E. coli*, y fue llevado a cabo un experimento de toxicidad. Las dos toxinas no presentaron diferencia alguna en cuanto a la eficacia para con las plagas objetivo.

En otro estudio (Schnepf *et al.*, 1998, "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins", 62: 3, 775-806) fueron alterados los residuos de aminoácidos GYY de la endotoxina δ Cry1Ac en la posición 312 a 314 para sustituirlos con ASY, GSY y GFS. No se observó diferencia de toxicidad alguna entre las tres proteínas.

Hay dos variantes naturales de la endotoxina δ Cry1C, que son concretamente la Cry1Ca y la Cry1Cb. Estas proteínas presentan una identidad de las secuencias de aminoácidos de un 81% (Schnepf *et al.*, 1998, "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins", 62: 3, 775-806). A pesar de esta diferencia, ambas toxinas son tóxicas para su plaga objetivo, si bien hay cierta diferencia en cuanto al nivel de toxicidad. Su gama de huéspedes es también la misma. (Kalman *et al.*, 1993, "Cloning of a novel *cryIC* type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp *galleriae*" Appl. Environ Microbiol 59: 4: 1131-37).

65

Objetos de la presente invención

El principal objeto de la presente invención es el de desarrollar una proteína endotoxina δ quimérica.

5 Otro objetivo principal de la presente invención es el de desarrollar un gen quimera que codifique para una proteína endotoxina δ quimérica.

Otro objeto adicional de la presente invención es el desarrollar un método para desarrollar dicha proteína quimérica.

10 Aun otro objeto de la presente invención es el de desarrollar un método para sobreexpresar dicha proteína quimérica en un microbio adecuado.

15 Aun otro objeto de la presente invención es el de desarrollar un método para tratar plantas infestadas por insectos usando dicha proteína quimérica.

Un objeto adicional de la presente invención es el de desarrollar un insecticida para insectos resistentes a multidro-

20 Otro objeto de la presente invención es el de desarrollar un insecticida eficaz.

Aun otro objeto de la presente invención es el de desarrollar un insecticida que no tenga efecto adverso alguno en las plantas.

25 Otro objeto adicional de la presente es el de desarrollar un insecticida con una actividad insecticida de aproximadamente un 100%.

Breve exposición de la presente invención

30 La presente invención se refiere a una proteína endotoxina δ quimérica Cry1E de ID SEC N° 1 con extraordinariamente alta propiedad insecticida y a un gen quimera de ID SEC N° 2 que codifica dicha proteína quimérica, y también a un método para tratar a plantas infestadas por insectos usando dicha proteína quimera.

35 Descripción detallada de la presente invención

En consecuencia, la presente invención se refiere a una proteína endotoxina δ quimérica Cry1E de ID SEC N° 1 con una extraordinariamente alta propiedad insecticida y a un gen quimera de ID SEC N° 2 que codifica dicha proteína quimérica, y también a un método para tratar plantas infestadas por insectos usando dicha proteína quimera.

En una realización de la presente invención, una proteína endotoxina δ quimérica Cry1E de ID SEC N° 1 y otras proteínas de una homología de un 75% y más en la secuencia.

45 En otra realización de la presente invención, una proteína endotoxina δ quimérica Cry1E de ID SEC N° 1.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha proteína es de una longitud de 641 residuos de aminoácidos.

50 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha proteína quimérica es diseñada a partir de las endotoxinas δ Cry1Ea y Cry1Ca de *Bacillus thuringiensis*.

55 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha proteína de una longitud de 641 residuos consta de los residuos 1 a 529 de la endotoxina Cry1Ea de la misma posición, los residuos 530 a 599 de Cry1Ca de la posición 533 a la 602, los residuos 600 a 616 de Cry1Ea de la posición 588 a la 604 y los residuos 617 a 641 de un polipéptido sintético.

En otra realización adicional de la presente invención, donde el dominio peptídico de 530 a 587 de Cry1Ea puede ser sustituido por el de cualquier otra endotoxina δ .

60 En otra realización adicional de la presente invención, donde los últimos 25 residuos de aminoácidos mejoran la estabilidad contra las proteasas de las plantas.

65 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha proteína quimérica es estable a una temperatura que está situada entre 4 y 35°C.

En otra realización adicional de la presente invención, un gen quimera de ID SEC N° 2.

ES 2 294 125 T3

En otra realización de la presente invención, donde dicha quimera codifica la proteína quimérica de ID SEC N° 1.

5 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera es de una longitud de 1990 pares de bases (bp).

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera es un ADN de doble hebra de 1,99 kb.

10 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera contiene codón preferido por las plantas distribuido uniformemente para facilitar la eficaz traducción.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera contiene codón de ATGGCT de iniciación de la traducción preferido por las plantas en el extremo 5'.

15 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera contiene codón de TAATGA de terminación de la traducción preferido por las plantas.

20 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera contiene 33 sitios de restricción distribuidos uniformemente a todo lo largo del gen a una distancia de aproximadamente 40-80 bp.

En otra realización adicional de la presente invención, donde los sitios de restricción son enzimas seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *Hind* III, *Eco*RI y *Bam*HI.

25 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera está dividida en 58 oligonucleótidos solapados de una longitud de 40 a 65 bp cada uno situados a una distancia de 6 a 26 pares de bases (bp).

30 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera contiene dichos nucleótidos solapados con un solapamiento de 13 a 18 nucleótidos con los oligonucleótidos inmediatamente adyacentes en la hebra complementaria.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera tiene un valor T_m que está situado entre 44 y 55°C.

35 En una realización adicional de la presente invención, un método para sobreexpresar la proteína quimérica insecticida CryIE en microbios.

En otra realización de la presente invención, clonar el gen CryIE de ID SEC N° 2 que codifica dicha proteína quimérica en un vector.

40 En otra realización adicional de la presente invención, transformar un microbio con dicho vector clonado.

En otra realización adicional de la presente invención, sobreexpresar dicha proteína quimérica en dicho microbio.

45 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha quimera es expresada en un microbio seleccionado de entre los miembros de un grupo que consta de bacterias, algas y hongos.

En otra realización adicional de la presente invención, donde las enzimas de restricción para dicha clonación son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *Hind* III, *Eco*RI, *Nco*I, *Mfe* I y *Bam*HI.

50 En otra realización adicional de la presente invención, donde se induce la sobreexpresión de dicha proteína usando isopropiltiogalactósido (IPTG).

55 En otra realización adicional de la presente invención, donde se sobreexpresa dicha proteína a 15°C para evitar el plegado incorrecto de dichas proteínas.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dichos vectores son seleccionados de entre los miembros de un grupo que consta de plásmidos, ADN viral y cósmidos.

60 En otra realización adicional de la presente invención, donde la expresión de la quimera en el microbio es confirmada mediante RT-PCR (RT-PCR = transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa), análisis western y ELISA (ELISA = inmunoanálisis ligado a enzimas).

65 En otra realización adicional de la presente invención, donde la presencia de quimera en el microbio es confirmada mediante PCR (PCR = reacción en cadena de la polimerasa) y análisis southern.

En otra realización adicional de la presente invención, un método para tratar plantas infectadas con insectos usando dicha proteína quimérica insecticida.

ES 2 294 125 T3

En otra realización de la presente invención, incorporar gen que codifica proteína quimera Cry1E a una planta infectada con insectos.

En otra realización adicional de la presente invención, exponer la planta transgénica a insectos.

En otra realización adicional de la presente invención, determinar la actividad insecticida de dichas plantas transgénicas.

En otra realización adicional de la presente invención, donde las plagas insectiles son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *spodoptera sp.* y *Helicoverpa sp.*

En otra realización adicional de la presente invención, donde las plantas son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de tabaco, algodón, garbanzo, quinchoncho, cacahuete, coliflor, col, guindilla y pimienta.

En otra realización adicional de la presente invención, donde las enzimas de restricción para dicha clonación son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *Hind III*, *EcoRI*, *NcoI* y *BamHI*.

En otra realización adicional de la presente invención, donde la proteína quimérica presenta un alto grado de expresión en plantas, ascendiendo a aproximadamente un 0,5% de la proteína soluble total de las plantas.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha proteína quimérica es estable en dicha planta transgénica.

En otra realización adicional de la presente invención, donde los insectos expuestos a dicha proteína quimérica presentan pérdida de peso antes de la muerte.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha proteína quimérica presenta propiedad insecticida contra los insectos en todas las fases de desarrollo.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha proteína quimérica es un insecticida varias veces más potente en comparación con las proteínas progenitoras.

En otra realización adicional de la presente invención, donde la actividad insecticida de dicha proteína quimérica arroja una mortalidad de las plagas insectiles que está situada entre un 80 y un 100% a las aproximadamente 4 horas de exposición.

En otra realización adicional de la presente invención, donde los insectos expuestos a dicha proteína quimérica por espacio de aproximadamente 1 hora presentan un desarrollo retardado, infertilidad y metamorfosis desbaratada.

En otra realización adicional de la presente invención, donde la EC₅₀ para *Helicoverpa sp.* está situada entre 250 y 350 ng/ml de dieta artificial de insectos.

En otra realización adicional de la presente invención, donde la EC₅₀ para *Spodoptera sp.* está situada entre 25 y 50 ng/ml de dieta artificial.

En otra realización adicional de la presente invención, dicho método no presenta efecto adverso alguno en el crecimiento normal de las plantas transformadas.

En una realización adicional de la presente invención, una nueva endotoxina δ quimérica de *Bacillus thuringiensis* es desarrollada estratégicamente sustituyendo un dominio polipeptídico de una endotoxina δ , que es aquí la susodicha Cry1Ea, por el correspondiente dominio de otras endotoxinas δ y un nuevo polipéptido en el extremo C-terminal. Se diseña teóricamente y se sintetiza químicamente un gen para codificar la nueva toxina quimérica y expresarla a alto nivel en el tejido vegetal. El gen fue expresado en un microbio (*E. coli*) y dos plantas dicotiledoneas (tabaco y algodón). Fue establecida en ambos sistemas la eficacia de la endotoxina δ estratégicamente diseñada. Se vio mejorada la toxicidad de la proteína quimérica para las larvas de insectos lepidópteros (*Spodoptera* y *Helicoverpa*) en comparación con las proteínas progenitoras. El gen sintético quimérico es comercialmente valioso por cuanto que puede ser usado para desarrollar plantas de cultivo agrónomicamente mejoradas para presentar resistencia a las plagas insectiles.

En otra realización de la presente invención, en consecuencia, la presente invención aporta “una nueva endotoxina δ mejorada para presentar actividad insecticida y un gen para su expresión a alto nivel en plantas”, lo cual comprende el diseño estratégico de una nueva endotoxina δ quimérica, que es aquí la susodicha Cry1E quimérica (616 residuos de aminoácidos), a base de sustituir un dominio polipeptídico (de la posición 530 a la 587) de proteína Cry1Ea por el de Cry1Ca (de la posición 533 a la 602), la incorporación de un nuevo polipéptido de 25 residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal, el diseño teórico de un gen para codificar la endotoxina δ quimérica de una longitud de 641 residuos de aminoácidos a alto nivel en plantas, el diseño y la síntesis química de los oligonucleótidos que representan al gen diseñado teóricamente, el ensamblaje de los oligonucleótidos para formar ADN de doble hebra, la clonación y

ES 2 294 125 T3

el análisis de secuencia del ADN sintético clonado, la construcción de vectores para la expresión del gen quimérico en *E. coli* y plantas, la expresión del gen quimérico sintético en *E. coli*, la comparación de la toxicidad de la proteína quimérica con la de las proteínas progenitoras contra *Spodoptera litura* y *Helicoverpa armigera*, la transformación de tabaco con el gen quimérico, la expresión a alto nivel de la proteína manipulada en las plantas transgénicas, la purificación de la proteína endotoxina δ quimérica a partir de las plantas transgénicas y la confirmación de su eficacia en las larvas de *Spodoptera litura* y *Helicoverpa armigera*, y la evaluación del potencial de la toxina quimérica expresada en las plantas transgénicas para la protección contra las plagas insectiles objetivo.

En una realización de la presente invención, una endotoxina δ que se da de manera natural y es concretamente la CryIEa ha sido diseñada estratégicamente y modificada como corresponde para hacerla biológicamente activa contra las larvas de plagas insectiles como las de *Spodoptera* sp.

En otra realización de la presente invención, una endotoxina δ quimérica de una longitud de 616 residuos de aminoácidos, que es aquí la susodicha CryIE quimérica, fue diseñada teóricamente sustituyendo un dominio peptídico de CryIEa de la posición 530 a la 587 por el de CryICa de la posición 533 a la 602. Adicionalmente fue introducido en el extremo C-terminal de la endotoxina δ un nuevo polipéptido de 25 residuos de aminoácidos.

En otra realización adicional de la presente invención, dos dominios peptídicos de las posiciones 530 a 545 y 578 a 587 de CryIEa pueden ser sustituidos por los de CryICa de las posiciones 533 a 555 y 558 a 602. Tal toxina quimérica puede también desarrollar una similar (o equivalente) actividad biológica.

En otra realización adicional de la presente invención, el dominio peptídico de 530 a 587 de CryIEa puede ser sustituido por el de otras endotoxinas δ .

En otra realización adicional de la presente invención, un polipéptido de 25 residuos de aminoácidos es introducido en el C-terminal de la endotoxina δ . Este polipéptido mejoró la estabilidad de la endotoxina δ contra las proteasas de la planta. Esto podría haber mejorado la estabilidad de la endotoxina δ en el intestino medio del insecto.

En otra realización adicional de la presente invención, un polipéptido de una longitud de 25 residuos de aminoácidos puede ser incluido en el C-terminal de otras endotoxinas δ , pudiendo tales toxinas devenir estables contra distintas clases de proteasas.

En otra realización adicional de la presente invención, un polipéptido de una longitud de 25 residuos de aminoácidos puede ser incorporado en el C-terminal de cualquier proteína recombinante para dar a dichas proteínas estabilidad contra las proteasas.

En otra realización adicional de la presente invención, un ADN de doble hebra de 1,99 kb fue diseñado teóricamente para codificar la proteína quimérica. Fueron usados codones preferidos por las plantas para codificar los aminoácidos de la proteína toxina quimérica para facilitar la expresión a alto nivel del gen en las plantas.

Hay 6 variantes de la endotoxina δ CryIAa, que son concretamente las que van desde la CryIAa1 hasta la CryIAa6, que aparecen en la base de datos EMBL. Se presenta a continuación el análisis grupal de la secuencia de aminoácidos de estas proteínas endotoxinas δ . En tres posiciones (77, 148 y 302) son distintos los residuos de aminoácidos. Las posiciones variantes están indicadas a continuación en negritas. Sin embargo, los seis genes han sido desplegados en experimentos de toxicidad por distintos laboratorios. Es equiparable la eficacia de las seis variantes en cuanto a su toxicidad para con los insectos.

CRYIAA1

MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEF 50

CRYIAA4 MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEF

50

ES 2 294 125 T3

CRY1AA5 MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEF
50
5 CRY1AA6 MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEF
50
10 CRY1AA2 MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEF
50
15 CRY1AA3 MDNNPNINECIPYNCLSNPEVEVLGGERIETGYTPIDISLSLTQFLLSEF
50
15 CRY1AA1
VPGAGFVLGLVDIHWGIFGPSQWDAFPVQIEQLINQRIEEFARNQAISRL 100
20 CRY1AA4
VPGAGFVLGLVDIHWGIFGPSQWDAFPVQIEQLINQRIEEFARNQAISRL 100
CRY1AA5
25 VPGAGFVLGLVDIHWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRL 100
CRY1AA6
VPGAGFVLGLVDIHWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRL 100
30 CRY1AA2
VPGAGFVLGLVDIHWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRL 100
CRY1AA3
35 VPGAGFVLGLVDIHWGIFGPSQWDAFLVQIEQLINQRIEEFARNQAISRL 100
CRY1AA1
40 EGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAV 150
CRY1AA4
EGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAV 150
45 CRY1AA5
EGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAV 150
CRY1AA6
50 EGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAV 150
CRY1AA2
EGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAV 150
55 CRY1AA3
EGLSNLYQIYAESFREWEADPTNPALREEMRIQFNDMNSALTTAIPLLAV 150
CRY1AA1
60 QNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLI 200
CRY1AA4
65 QNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLI 200

ES 2 294 125 T3

CRY1AA5
QNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLI 200
5 CRY1AA6
QNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLI 200
CRY1AA2
10 QNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLI 200
CRY1AA3
15 QNYQVPLLSVYVQAANLHLSVLRDVSVFGQRWGFDAATINSRYNDLTRLI 200
CRY1AA1
GNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLVLDIVALFSNY 250
20 CRY1AA4
GNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLVLDIVALFSNY 250
CRY1AA5
25 GNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLVLDIVALFSNY 250
CRY1AA6
GNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLVLDIVALFSNY 250
30 CRY1AA2
GNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLVLDIVALFSNY 250
CRY1AA3
35 GNYTDYAVRWYNTGLERVWGPDSRDWVRYNQFRRELTTLVLDIVALFSNY 250
CRY1AA1
40 DSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL 300
CRY1AA4
DSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL 300
45 CRY1AA5
DSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL 300
CRY1AA6
50 DSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL 300
CRY1AA2
55 DSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL 300
CRY1AA3
DSRRYPIRTVSQLTREIYTNPVLENFDGSFRGMAQRIEQNIRQPHLMDIL 300
60 CRY1AA1
NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLV 350
CRY1AA4
65 NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLV 350

ES 2 294 125 T3

CRY1AA5
NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLV 350
5 CRY1AA6
NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLV 350
CRY1AA2
10 NRITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLV 350
CRY1AA3
NSITIYTDVHRGFNYWSGHQITASPVGFSGPEFAFPLFGNAGNAAPPVLV 350
15 CRY1AA1 SLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPST
400
CRY1AA4 SLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPST
20 400
CRY1AA5 SLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPST
25 400
CRY1AA6 SLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPST
400
30 CRY1AA2 SLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPST
400
CRY1AA3 SLTGLGIFRTLSSPLYRRIILGSGPNNQELFVLDGTEFSFASLTTNLPST
35 400
CRY1AA1
40 IYRQRGTVDSL DVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAP 450
CRY1AA4
IYRQRGTVDSL DVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAP 450
45 CRY1AA5
IYRQRGTVDSL DVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAP 450
CRY1AA6
50 IYRQRGTVDSL DVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAP 450
CRY1AA2
IYRQRGTVDSL DVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAP 450
55 CRY1AA3
IYRQRGTVDSL DVIPPQDNSVPPRAGFSHRLSHVTMLSQAAGAVYTLRAP
60 450CRY1AA1
TFSWQHRS AEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDILR 500
CRY1AA4
65 TFSWQHRS AEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPGFTGGDILR 500

ES 2 294 125 T3

CRY1AA5
TFSWQHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPFTGGDILR 500
5 CRY1AA6
TFSWQHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPFTGGDILR 500
CRY1AA2
10 TFSWQHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPFTGGDILR 500
CRY1AA3
TFSWQHRSAEFNNIIPSSQITQIPLTKSTNLGSGTSVVKGPFTGGDILR 500
15 CRY1AA1
RTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNF 550
20 CRY1AA4
RTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNF 550
CRY1AA5
25 RTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNF 550
CRY1AA6
RTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNF 550
30 CRY1AA2
RTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNF 550
35 CRY1AA3
RTSPGQISTLRVNITAPLSQRYRVIRYASTTNLQFHTSIDGRPINQGNF 550
CRY1AA1
40 SATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDR 600
CRY1AA4
SATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDR 600
45 CRY1AA5
SATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDR 600
CRY1AA6
50 SATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDR 600
CRY1AA2
55 SATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDR 600
CRY1AA3
SATMSSGSNLQSGSFRTVGFTTPFNFSNGSSVFTLSAHVFNSGNEVYIDR 600
60 CRY1AA1 IEFVPAEVT 609
CRY1AA4 IEFVPAEVT 609
CRY1AA5 IEFVPAEVT 609
65 CRY1AA6 IEFVPAEVT 609

CRY1AA2 IEFVPAEVT 609

CRY1AA3 IEFVPAEVT 609

5 Puede citarse la referencia de Von Tersch *et al.* 1991, "Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp kanyae: Gene cloning and characterization and comparison with *B. thuringiensis* subsp *kurstaki* Cry1A(c) toxin" en *Appl and Environ Microbial*, 57: 2: 349-58, donde dos variantes de *cry1Ac* fueron aisladas a partir de dos cepas distintas. Su composición de aminoácidos era distinta en 7 posiciones. Ambas endotoxinas δ fueron expresadas en *E. coli*, y fue
10 llevado a cabo un experimento de toxicidad. Las dos toxinas no presentaban diferencia alguna en cuanto a la eficacia para con las plagas objetivo.

Además, esto indica claramente que en las proteínas, y más en particular en el campo de las endotoxinas, no se constata que la alta homología de la secuencia represente diferencia significativa alguna en cuanto a la actividad. El
15 susodicho ejemplo de las endotoxinas Cry1Aa1 a Cry1Aa6 refleja claramente la esencia de este trabajo. En la presente Solicitud, la solicitante ha observado una extraordinariamente alta actividad insecticida. Además, se comprueba también que la homología de un 70% y más en la secuencia de la proteína quimérica Cry1E de la presente Solicitud no presenta variación significativa alguna en cuanto a la actividad. Esto significa que las proteínas con una homología de secuencia de un 70% y más para la proteína quimérica Cry1E se usan como agentes insecticidas.

20 En otro estudio (Schnepf *et al.*, "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins", 62: 3, 775-806), los residuos de aminoácidos GYY de la endotoxina δ Cry1Ac en la posición 312 a 314 fueron alterados para sustituirlos con ASY, GSY y GFS. No se observó diferencia de toxicidad alguna de las tres proteínas.

25 Adicionalmente, hay dos variantes naturales de la endotoxina δ Cry1C, que son concretamente la Cry1Ca y la Cry1Cb. Estas proteínas presentan una identidad de las secuencias de aminoácidos de un 81% (Schnepf *et al.*, 1998, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins", 62: 3, 775-806). A pesar de esta diferencia, ambas toxinas son tóxicas para su plaga objetivo, si bien hay cierta diferencia en cuanto al nivel de toxicidad. Su gama de huéspedes es también la misma. (Kalman *et al.*, 1993, "Cloning of a novel *cry1C* type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp *galleriae*" *Appl. Environ Microbiol* 59: 4: 1131-37).
30

Breve descripción de los dibujos acompañantes

35 La Figura 1 representa el ensamblaje basado en la PCR de 58 oligonucleótidos solapados formando el nuevo ADN *cry1E* quimérico de 1,99 kb. Los carriles 2-4 representan el ensamblaje del gen en distintas condiciones de PCR, estando el deseado fragmento de ADN indicado con una flecha; mostrando el Carril 1 el marcador del peso molecular del λ ADN/HindIII-EcoRI.

40 La Figura 2 representa el análisis de restricción del plásmido pPK59 que tiene el promotor E-35-S en el lado de cabeza con respecto al nuevo gen quimérico. El plásmido fue sometido a digestión con la enzima de restricción SaII (a 40 bp en el lado de cola con respecto al gen). El plásmido lineal fue adicionalmente sometido a digestión con NcoI (carril 2), NheI (carril 3), BstXI (carril 4), NruI (carril 5) y SacI (carril 6). Los carriles 1 y 7 representan respectivamente los marcadores del peso molecular de λ ADN/HindIII-EcoRI y de λ ADN/HindIII.

45 La Figura 3 representa los mapas de los plásmidos pPK202, pPK141, pPK135 y pPk206.

La Figura 4 representa el bioensayo con insectos y con tabacos transgénicos. Las larvas de 1^{er} instar de *Spodoptera litura* presentaron una mortalidad del 100% tras 2 días de alimentarse en la hoja transgénica que expresaba el nuevo gen *cry1E* quimérico (izquierda). La hoja de control fue vorazmente devorada por las larvas (derecha).

50 La Figura 5 representa larvas de 3^{er} instar de *Spodoptera litura* que presentaron una mortalidad del 100% tras haber estado alimentándose durante 2 días (izquierda). La hoja de la planta transgénica presentaba un alto nivel de protección contra las larvas en contraste con la hoja de la planta de control (derecha).

55 La Figura 6 representa la mortalidad del 100% de las larvas de 5^o instar de *Spodoptera* tras haber estado las mismas alimentándose por espacio de 48 h en la hoja de tabaco transgénico (izquierda). Durante el mismo periodo de tiempo, las larvas que se alimentaban con hojas de la planta de control ingirieron 6 hojas (derecha).

60 En otra realización adicional de la presente invención, fueron diseñados 58 oligonucleótidos para representar el ADN de *cry1E* quimérico de 1,99 kb. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados químicamente y fusionados enzimáticamente para así obtener el deseado ADN de doble hebra. (Hágase referencia a la figura 1).

65 En otra realización adicional de la presente invención se hicieron dos constructos independientes, cada uno para expresión en la planta y en *E. coli*. Los genes progenitores (*cry1Ea* y *cry1Ca*) fueron también introducidos en otros vectores de expresión para su expresión en *E. coli*.

En otra realización adicional de la presente invención, los tres genes fueron todos ellos expresados en *E. coli*. La eficacia de la Cry1E quimérica contra *Spodoptera litura* fue comparada con la de las toxinas progenitoras (Cry1Ea

ES 2 294 125 T3

y Cry1Ca). Los experimentos de toxicidad establecieron que la toxina manipulada es varias veces más tóxica en comparación con las proteínas progenitoras.

5 En otra realización adicional de la presente invención, se demostró que la proteína quimérica expresada en las plantas era también tóxica para *Helicoverpa armigera*, que es otra grave plaga insectil. Esto estableció el mejoramiento en cuanto a la gama de huéspedes de la nueva toxina quimérica diseñada en este estudio.

10 En otra realización adicional de la presente invención, el gen sintético fue introducido en tabaco para la expresión de la toxina quimérica. Las plantas transgénicas expresaron la toxina quimérica y acumularon hasta un 0,5% de la proteína soluble total. Las plantas transgénicas presentaron una excelente protección contra las larvas de *Spodoptera litura* y ocasionaron una mortalidad del 100% en todas las fases de desarrollo.

15 En otra realización adicional de la presente invención, la nueva toxina quimérica fue purificada a partir de la proteína soluble total de la hoja del tabaco transgénico y fue mezclada en dieta semisintética. Los experimentos de toxicidad de nuevo establecieron la eficacia de la toxina híbrida.

La presente invención es relativa al descubrimiento de endotoxinas δ quiméricas altamente activas. Una nueva endotoxina δ de una longitud de 641 residuos de aminoácidos, que es aquí la susodicha Cry1E quimérica, fue diseñada estratégicamente a base de sustituir un dominio polipeptídico (de la posición 530 a la 587) de la proteína Cry1Ea por el de la Cry1Ca (de la posición 533 a la 602). De esta manera, la toxina quimérica comprende los residuos de aminoácidos 1-529 de Cry1Ea, 530 a 599 de Cry1Ca y 600 a 616 de Cry1Ea. Un nuevo polipéptido de 25 residuos de aminoácidos fue incluido como el extremo C-terminal de la endotoxina δ . En otras palabras, este polipéptido constituía el residuo de aminoácidos 617-641 de la toxina quimérica. Pueden crearse varias toxinas quiméricas sustituyendo distintas partes de la toxina Cry1Ea por partes o secuencias de aminoácidos diseñadas estratégicamente de las otras toxinas. Una secuencia de nucleótidos de 1,99 kb fue diseñada teóricamente para codificar para la endotoxina δ quimérica anteriormente mencionada. El gen que codifica proteína toxina, que es aquí el susodicho *cry1E* quimérico, fue diseñado para una expresión a alto nivel en las plantas, introduciendo codones preferidos por las plantas. Los codones preferidos por las plantas para cada aminoácido fueron distribuidos uniformemente para facilitar la eficaz traducción. Un contexto de iniciación de la traducción apropiado para la expresión génica en las plantas (TAAACCATGGCT) fue incluido en el extremo 5' y dos codones (señales) de parada de la traducción fueron introducidos en el extremo del marco de lectura de la toxina quimérica. Un total de 33 sitios de restricción únicos fueron introducidos uniformemente a todo lo largo del gen a una distancia de 40-80 bp. Fueron creados sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III en el lado de cabeza y *Bam*HI y *Eco*RI en el lado de cola del gen para facilitar su clonación (véase la Figura 2).

35 El contexto de iniciación de la traducción creó automáticamente un sitio *Nco*I en el inmediato inicio del gen. El gen fue dividido en 58 oligonucleótidos solapados (de una longitud de 40 a 65 nucleótidos) con separaciones de una longitud de 6 a 26 bases entremedio (véase la figura 1). Cada oligonucleótido tenía un solapamiento de una longitud de 13-18 nucleótidos con los oligonucleótidos inmediatamente adyacentes en la hebra complementaria. Los solapamientos complementarios fueron diseñados para mantener el valor T_m entre 48 y 50°C. Los oligonucleótidos fueron sintetizados en un sintetizador de ADN (Gene Assembler Special, Pharmacia, Suecia) a escala de 200 nmoles y purificados por electroforesis en gel de urea-poliacrilamida desnaturalizante. Los 58 oligonucleótidos fueron ensamblados para así formar con los mismos ADN de doble hebra de 1,99 kb, que es aquí dicho gen *cry1E* quimérico, siguiendo el método de síntesis de genes sin ligación de Singh *et al.* (1996) y como se muestra en la figura 1. El ADN fue sometido a digestión con enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI y clonado en pBluescriptII SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA). El plásmido fue denominado pPK200. La secuencia de nucleótidos del ADN sintético fue confirmada secuenciando el ADN sintético clonado en un sistema de secuenciación de ADN automatizada (Applied Biosystems modelo 373A).

50 Fue construido un casete también para la expresión de la toxina quimérica en *E. coli* bajo el control del promotor *T7lac*. El plásmido pPK200 fue sometido a digestión con las enzimas de restricción *Nco*I y *Bam*HI y clonado en el vector de expresión pET-19b (Novagen, Madison WI). El plásmido fue denominado pPK206. ADN que codificaban las toxinas Cry1Ca y Cry1Ea fueron amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa, usando cebadores adecuados, con lo cual se crearon sitios de restricción *Nco*I y *Bam*HI en el lado de cabeza y en el lado de cola del amplicón. Los productos amplificados fueron clonados en el vector pET-19b. Los constructos que tenían ADN que codificaba las toxinas Cry1Ca y Cry1Ea fueron denominados pPK135 y pPK141, respectivamente. Cepa de *E. coli* BL21DE3 fue transformada con los constructos pPK206, pPK135 y pPK141. (Véase la figura 3). Las proteínas toxina fueron expresadas mediante inducción con apropiadas concentraciones de IPTG. La expresión fue realizada a 15°C para evitar el posible plegado incorrecto. Células de *E. coli* fueron lisadas con lisozima y sonicadas para liberar las endotoxinas δ . Las proteínas toxina fueron halladas en cuerpos de inclusión. Éstos fueron solubilizados en tampón de bicarbonato 50 mM (pH 9,5) a 28°C. Las proteínas toxina fueron cuantificadas densitométricamente. Diluciones seriales de las toxinas fueron mezcladas en dieta semisintética y la mezcla fue vertida en las cápsulas de Petri. Sirvió de dieta de control proteína de *E. coli* total. Quince larvas neonatales de *Spodoptera litura* fueron liberadas sobre las tortas de la mezcla dietaria en un vaso de 100 ml y la boca fue cubierta con paño de muselina para permitir el intercambio gaseoso. Cada experimento fue llevado a cabo con 6 réplicas. Se cambiaba la dieta cada dos días. El bioensayo fue llevado a cabo con un fotoperiodo de 16/8 h a $25 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Los datos de toxicidad fueron registrados a los 7 días de haber sido iniciada la alimentación. La EC_{50} fue determinada mediante análisis log-probit estándar. Fueron analizadas simultáneamente las tres proteínas. Los resultados representativos son como aquí se indica en la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Endotoxinas δ (S)	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$ de dieta semisintética)
CryIEa	> 108
CryICa	29,48 \pm 1,77
CryIE quimérica	6,27 \pm 0,59

El resultado demostró que la cepa de *E. coli* que expresaba la toxina quimérica era varias veces más tóxica en comparación con la proteína CryIEa y más de cuatro veces más tóxica en comparación con la proteína CryICa. La proteína toxina CryIEa no logró ocasionar efecto alguno en las larvas de *Spodoptera*. El resultado estableció la exitosa manipulación de la toxina CryIEa para desarrollar una nueva proteína quimérica CryIE que es biológicamente activa y una toxina mejorada. La proteína manipulada era cuatro veces más tóxica que la proteína CryICa, que es la endotoxina δ mejor conocida contra *Spodoptera* sp.

Las tres endotoxinas δ fueron también sometidas a ensayo contra larvas de *Helicoverpa* sp. de 72 h de edad. Cada larva fue depositada sobre la dieta dispuesta en una caja aparte. 40 larvas fueron expuestas a cada concentración de la toxina. Los resultados de toxicidad demuestran que la toxina quimérica es también tóxica para *Helicoverpa*. Se indica aquí a continuación en la Tabla 2 un resultado representativo.

TABLA 2

Endotoxinas δ (S)	EC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$ de dieta semisintética)
CryIEa	> 176
CryICa	136,22 \pm 8,77
CryIE quimérica	26,71 \pm 1,39

En el sentido en el que se utiliza en la presente, el vocablo "toxina" significa el segmento N-terminal que es responsable de la actividad pesticida para los insectos. Un experto en esta materia puede convertir esta toxina en una protoxina incluyendo una parte de un fragmento C-terminal o todo un fragmento C-terminal de una endotoxina δ homóloga o heteróloga. Tal protoxina será una molécula muy estable dentro de las células microbianas, como por ejemplo en *E. coli*, *Pseudomonas*, etc., y puede ser usada para desarrollar formulaciones microbianas. Tales formulaciones pueden ser usadas como pesticidas. El desarrollo de tales protoxinas y de formulaciones usando la nueva toxina desarrollada por nosotros queda también dentro del alcance de la invención reivindicada por nosotros.

El gen y la toxina que son útiles según la presente invención incluyen no tan sólo la toxina de una longitud de 641 aminoácidos, sino también fragmentos de la nueva secuencia, variantes y mutantes que conservan la actividad pesticida característica de la toxina que aquí se ejemplifica específicamente. En el sentido en el que se les utiliza en la presente, los vocablos "variantes" o "variaciones" de genes se refieren a secuencias de nucleótidos que codifican las mismas toxinas o que codifican toxinas que tienen una actividad pesticida más baja o equivalente. En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión "actividad pesticida equivalente" se refiere a toxinas que tienen una actividad biológica similar o prácticamente igual contra las plagas objetivo en comparación con las toxinas que se reivindican.

Un experto en la materia está perfectamente en condiciones de crear secuencias de ADN alternativas que codifiquen la misma o prácticamente la misma toxina. Estas secuencias de ADN variantes quedan dentro del alcance de la presente invención. En el sentido en el que se la utiliza en la presente, la expresión "prácticamente la misma" secuencia hace referencia a secuencias que tienen sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que prácticamente no afectan a la actividad pesticida. Los fragmentos que conservan la actividad pesticida quedan también incluidos en esta definición.

Se ha ejemplificado aquí específicamente una nueva toxina quimérica de la presente invención. Se comprenderá fácilmente que la presente invención comprende las toxinas variantes o equivalentes (y las secuencias de nucleótidos que codifican toxinas equivalentes) que tienen la misma actividad pesticida como la toxina ejemplificada o una actividad pesticida similar. Las toxinas equivalentes tendrán homología de aminoácidos con la toxina ejemplificada. Esta homología de aminoácidos será típicamente de más de un 75%, preferiblemente será de más de un 90% y con la máxima preferencia será de más un 95%. La homología de aminoácidos será máxima en las regiones críticas de la toxina que son responsables de la actividad biológica o intervienen en la determinación de la configuración tridimensional, que en última instancia es responsable de la actividad biológica. A este respecto, son aceptables y pueden ser de esperar ciertas sustituciones de aminoácidos y si estas sustituciones están en regiones que no son críticas para la actividad biológica o si dichas sustituciones son sustituciones de aminoácidos conservadoras que no afectan a la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los aminoácidos pueden clasificarse en las clases siguientes: apolares, polares sin carga, básicos y ácidos. Las sustituciones conservadoras con las cuales un aminoácido de una clase es sustituido por otro aminoácido de la misma clase quedan dentro del alcance de la presente invención siempre que la sustitución no altere de manera importante la actividad biológica de la endotoxina δ . Se da en la siguiente Tabla 3 un listado de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a cada clase.

ES 2 294 125 T3

TABLA 3

Clase de Aminoácido	Ejemplos de Aminoácidos
Apolares	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polares sin Carga	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácidos	Asp, Glu
Básicos	Lys, Arg, His

En algunos casos pueden también hacerse sustituciones no conservadoras. El factor decisivo es el de que estas sustituciones no deben redundar en un importante detrimento de la actividad biológica de la toxina. Un experto en la técnica de la manipulación de proteínas está perfectamente en condiciones de sustituir por alanina cualquier aminoácido de la toxina quimérica. La sustitución de cualquier aminoácido es la más segura, por cuanto que la alanina es un típico aminoácido. Tal sustitución queda también por entero dentro del alcance de la invención.

Puede ser introducido en los de una amplia variedad de huéspedes microbianos o vegetales un gen que codifique la toxina quimérica de la presente invención. La expresión del gen de la toxina redonda directa o indirectamente en la producción y el mantenimiento intracelular de la toxina quimérica pesticida. Con adecuados huéspedes microbianos, como p. ej. *Pseudomonas*, los microbios pueden ser aplicados a los sitios en los que proliferen las plagas. Esto redundará en el control de la plaga. Como alternativa, el microbio que alberga al gen de la toxina puede ser tratado bajo condiciones que prolonguen la actividad de la toxina y estabilicen la célula. La célula tratada, que conserva la actividad tóxica, puede ser entonces aplicada al ambiente de la plaga objetivo. En los casos en los que el gen que codifica la toxina quimérica es introducido a través de un vector adecuado en un huésped microbiano y dicho huésped es aplicado al ambiente en estado viviente, es esencial que se usen ciertos microbios huéspedes. Se seleccionan como huéspedes microorganismos de los que se sabe que ocupan la "fitosfera" (filoplano, filosfera, rizosfera y/o rizoplano) de uno o varios cultivos de interés. Estos microorganismos son seleccionados de forma tal que sean capaces de competir exitosamente en el ambiente en cuestión (el cultivo y otros habitats insectiles) con los microorganismos de tipo salvaje, proporcionar un estable mantenimiento y expresión del gen que expresa el pesticida polipeptídico, y, según lo deseable, proporcionar una mejorada protección del pesticida contra la degradación e inactivación ambiental.

Se sabe de los de un gran número de microorganismos que habitan el filoplano (la superficie de las hojas de las plantas) y/o la rizosfera (el suelo que rodea a las raíces de las plantas) de los de una amplia de variedad de importantes cultivos. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. Son particularmente de interés microorganismos tales como bacterias, como p. ej. las de los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; hongos y particularmente levadura, como p. ej. los de los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. Son particularmente de interés especies bacterianas de la fitosfera tales como las *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroids*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus* y *Azotobacter vinlandii* y especies de levadura de la fitosfera tales como las *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoros*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pollulans*. Son particularmente de interés los microorganismos pigmentados. Hay una amplia variedad de maneras de introducir un gen que codifique una toxina quimérica en un huésped microorganismo bajo condiciones que permitan el estable mantenimiento y expresión del gen. Estos métodos son perfectamente conocidos para los expertos en la materia y están descritos, por ejemplo, en la Patente U.S. N° 5.135.867, que queda incorporada a la presente por referencia.

Fue construido un vector de transformación de plantas para el desarrollo de plantas transgénicas. Un plásmido pPK58 (que tenía el promotor camv35s con potenciador duplicado) fue sometido a digestión con *Bam*HI y *Hind*III y el pPK200 con *Hind*III y *Eco*RI para escindir el promotor CaMV35S con el potenciador duplicado y el gen *cry*IE quimérico, respectivamente. Fue efectuada una ligación triple para la clonación de los dos fragmentos en vector de clonación pLITMUS38 (New England Biolabs). El plásmido, que era concretamente el pPK59, tenía el promotor CaMV35S con el potenciador duplicado en el lado de cabeza con respecto al gen quimérico. Se muestra en la figura 2 el análisis de restricción de pPK59. El terminador de transcripción *nos* fue clonado en el lado de cola con respecto al gen quimérico. El ADN del elemento de poliadenilación *nos* fue amplificado usando pBI101.1 como plantilla con cebadores adecuados, lo cual creó sitios de restricción *Mfe*I y *Eco*RI en el lado de cabeza y en el lado de cola, respectivamente. El plásmido pPK59 fue sometido a digestión con *Eco*RI y el producto de PCR fue clonado a continuación de la digestión con las enzimas de restricción *Mfe*I y *Eco*RI. El clon en el cual el sitio de restricción *Eco*RI del gen sintético estaba ligado al sitio *Mfe*I del terminador *nos* (por tener los mismos extremos compatibles) fue seleccionado y denominado pPK201. La correcta orientación del terminador *nos* fue confirmada mediante análisis de restricción y también mediante secuenciación. El casete de expresión (el gen *cry* sintético con promotor E-35S y terminador *nos*) fue clonado en vector binario Ti. El fragmento *Bam*HI-*Eco*RI del plásmido pPL201 fue clonado en pBI101.1 en sustitución del fragmento *Bam*HI-*Eco*RI (gen *uidA* y terminador *nos*) del plásmido. El vector binario fue denominado pPK202. Se muestran en la figura 3 los mapas de los vectores de expresión en *E. coli* y en plantas.

ES 2 294 125 T3

A fin de estudiar la eficacia de la toxina CryIE quimérica en plantas, fue seleccionado para la expresión el tabaco. *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa LBA 4404 que contenía el plásmido colaborador pAL4404 fue transformada con el vector binario pPK202 siguiendo el protocolo modificado de “electroporación de *Agrobacterium*” descrito por Cangelosi *et al.* (1991) y la colonia transformada fue sometida a selección sobre los antibióticos estreptomycin, rifampicina y canamicina. Fue efectuada transformación mediada por *Agrobacterium* de *Nicotiana tabacum* cv. Patit Havana siguiendo el método de Horsch *et al.*, 1985, y las plantas transgénicas fueron sometidas a selección sobre el antibiótico canamicina. La presencia del gen que codifica la toxina quimérica fue confirmada mediante PCR y análisis Southern y la expresión del transgen fue establecida mediante RT-PCR, análisis Western y ELISA. El resultado del ELISA puso de manifiesto una expresión del 0,5% de la proteína toxina de entre la proteína foliar soluble total en una línea transgénica seleccionada. Este alto nivel de la expresión era el resultado del diseño del gen en el cual fueron usados exclusivamente codones preferidos por las plantas. El contexto de iniciación de la traducción preferido por las plantas que se usó en este estudio habría también desempeñado un importante papel de cara a alcanzar la expresión acrecentada.

Fue llevado a cabo bioensayo con insectos con plantas transgénicas de dos meses de edad y larvas de 1^{er} y 5^o instar de *Spodoptera litura*. (Hágase referencia a las figuras 4-6). Discos foliares de 15 cm² de plantas transgénicas y de control fueron puestos en cajas cilíndricas que contenían papel secante húmedo en el fondo, y fueron depositadas sobre los mismos larvas de 1^{er} instar. Las bocas de las cajas fueron cubiertas con paño de muselina húmedo para mantener una suficiente humedad y un suficiente intercambio de aire. Los experimentos de toxicidad fueron llevados a cabo en tres réplicas a 25 ± 0,2°C, y se mantuvo un fotoperíodo de 16/8 h. En el bioensayo con larvas de 5^o instar se usaron hojas completas de plantas transgénicas y de control. El peciolo de la hoja fue mantenido en tapón de algodón en un matraz de 250 ml que contenía solución salina 1/2 MS (1/2 MS = diluida a la mitad) para así superar el marchitamiento de la hoja. Se dejó que se alimentasen en cada hoja cinco larvas de insecto. Las hojas de la planta de control se cambiaban cada 8 h, y las mismas fueron completamente consumidas por las larvas de insecto.

El resultado (figuras 4 y 6) estableció que las larvas de 1^{er} instar así como las de 5^o instar murieron a las 48-72 h. La cantidad de hoja comida por las larvas de 1^{er} instar era despreciable en comparación con los discos foliares de la planta de control, que fueron devorados vorazmente. La ingestión de aproximadamente 1 cm² de hoja transgénica era suficiente para matar las larvas de 5^o instar. Estas larvas se veían moribundas a las 8-16 h de alimentarse con la hoja transgénica, y finalmente murieron a los 2-3 días. Se observaban sobre la superficie de la hoja excrementos de color verde con un alto contenido de agua. Algunas de las larvas presentaban una gran pérdida de peso antes de la muerte. En un experimento aparte se dejó que larvas de distintos instar se alimentasen con hojas de planta transgénica por espacio de 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 16 h, y dichas larvas fueron luego transferidas a hojas de planta de control. Se observó que 8 h de alimentación en las plantas transgénicas eran suficientes para ocasionar una mortalidad del 100% de las larvas en todas las fases de desarrollo, incluso después de haberse alimentado en plantas no transgénicas. La ingestión de muy pequeñas cantidades de la toxina por parte de larvas jóvenes retrasó su pupación en 10-15 días con respecto al ciclo larval normal de 15 días. Las pocas larvas que escaparon a la mortalidad se desarrollaron convirtiéndose en moscas. Dieron huevos los del 40% de los apareamientos con cópula en los que se usaron tales moscas. Sin embargo, los huevos eran estériles y no llegaron a eclosionar. La proteína soluble total del tabaco transgénico fue extraída y cargada en una columna de intercambio iónico Sepharose Q. La proteína fue eluida con un gradiente creciente de cloruro sódico y el pico que contenía endotoxina δ fue reunido y desalado en columna G10. La proteína eluida fue mezclada en dieta semisintética. Fue también llevada a cabo una similar extracción y purificación de proteína a partir de las hojas de los tabacos no transgénicos, y tal proteína vegetal sirvió de control. El experimento de toxicidad fue llevado a cabo como se ha expuesto anteriormente. La EC₅₀ para *Spodoptera litura* y *Helicoverpa armigera* fue de 37 ng/ml y 285 ng/ml de dieta artificial. El resultado confirmó de nuevo la eficacia de la endotoxina δ quimérica para con las plagas insectiles objetivo.

Una nueva endotoxina δ para el control de plagas insectiles y un gen para su expresión a alto nivel en plantas, comprendiendo el diseño teórico de una nueva endotoxina δ a la que aquí se denomina la CryIE quimérica, que es diseñada estratégicamente a base de sustituir un dominio polipeptídico (de la posición 530 a la 587) de la proteína CryIEa por el de la CryICa (de la posición 533 a la 602), con un nuevo polipéptido de una longitud de 25 residuos de aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína para la estabilidad, el diseño teórico del gen para expresar la endotoxina δ quimérica a alto nivel en plantas, el diseño y la síntesis química de los oligonucleótidos que representan al gen diseñado teóricamente, el ensamblaje de los oligonucleótidos para así formar ADN de doble hebra, la clonación y el análisis secuencial del ADN sintético clonado, la construcción de vectores para la expresión del gen quimérico en *E. coli* y en plantas, la expresión del gen sintético en *E. coli*, la comparación de la toxicidad de la proteína quimérica con la de las proteínas progenitoras contra *Spodoptera litura*, la transformación de la planta, como por ejemplo del tabaco, con el gen quimérico, la expresión a alto nivel de la proteína manipulada en las plantas transgénicas y la evaluación del potencial de la toxina quimérica en las plantas transgénicas para la protección contra *Spodoptera litura*.

En otra realización adicional de la presente invención, donde hay los aminoácidos N° 1 a 529 de CryIEa, 530 a 599 de CryICa, 600 a 616 de CryIEa y 617 a 641 de un nuevo polipéptido y sus variantes o fragmentos de ello estructural y/o funcionalmente equivalentes.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicha toxina tiene una secuencia de aminoácidos que se indica en la ID SEC N° 1 y presenta una toxicidad varias veces más alta para los insectos lepidópteros objetivo en comparación con las toxinas progenitoras CryIEa y CryICa.

ES 2 294 125 T3

En otra realización adicional de la presente invención, donde el gen *cryIE* quimérico que codifica una toxina quimérica que tiene actividad contra los insectos lepidópteros tiene la secuencia de nucleótidos que se indica en la ID SEC N° 2 o su fragmento de la misma.

5 En otra realización adicional de la presente invención, donde se trata de un proceso para controlar las plagas de lepidópteros empleando la proteína, usándose una cantidad eficaz de la toxina tal cual o como componente de una formulación química o microbiana.

10 En otra realización adicional de la presente invención, donde se usa un vector de transferencia de ADN recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una toxina que tiene actividad contra los insectos lepidópteros, teniendo dicha secuencia polinucleotídica la secuencia de nucleótidos de la ID SEC N° 2 o fragmentos de la misma.

15 En otra realización adicional de la presente invención, donde un huésped recombinante es transformado con el gen.

En otra realización adicional de la presente invención, donde dicho huésped es un microbio como por ejemplo *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, Levadura, Cianobacterias y/o otros microbios.

20 En otra realización adicional de la presente invención, donde dicho huésped transformado es una planta como por ejemplo tabaco, algodón garbanzo, quinchoncho, cacahuete, coliflor, col, guindilla, pimiento y/u otras plantas que expresan la toxina, donde dicha toxina tiene la secuencia de aminoácidos de la ID SEC N° 1, o sus variantes con una equivalente actividad contra los insectos lepidópteros.

25 En una realización adicional de la presente invención, la presente Solicitud indica claramente que en las proteínas, y más en particular en el campo de las endotoxinas, no se constata que la alta homología de la secuencia implique diferencia importante alguna en cuanto a la actividad. Los susodichos trabajos sobre las endotoxinas Cry1Aa1 a Cry1Aa6 reflejan claramente la esencia de este trabajo. En la presente Solicitud, la solicitante ha observado una extraordinariamente alta actividad insecticida. Además, tampoco se constata que la homología de un 70% y más en la secuencia de la proteína quimérica Cry1E de la presente Solicitud presente variación importante alguna de la actividad. Esto significa
30 que se usan como agentes insecticidas las proteínas con una homología de secuencia de un 70% y más para la proteína quimérica Cry1E.

Los ejemplos siguientes se dan a título de ilustraciones, y por consiguiente no deberá interpretarse que los mismos limiten en modo alguno en alcance de la presente invención.

35

Ejemplo 1

40 *Toxicidad comparativa de la nueva Cry1E quimérica expresada en E. coli para larvas de plagas insectiles de lepidópteros*

Una endotoxina δ quimérica de una longitud de 616 residuos de aminoácidos, que es aquí la susodicha Cry1E quimérica, fue diseñada estratégicamente a base de sustituir un dominio polipeptídico (de la posición 530 a la 587) de la proteína Cry1Ea por el de la Cry1Ca (de la posición 533 a la 602). Fue adicionalmente incluido en el extremo C-terminal como se ha descrito anteriormente un polipéptido de 25 residuos de aminoácidos. Una secuencia nucleotídica de 1,99 kb fue diseñada teóricamente para codificar para la endotoxina δ quimérica anteriormente mencionada. Los codones para cada aminoácido fueron distribuidos uniformemente para evitar la deficiencia temporal del tARN durante la traducción. Fueron creados en el gen diseñado varios sitios de enzimas de restricción de corte de 6 bases. Fueron creados sitios de restricción *Bam*HI, *Hind*III y *Nco*I en el extremo 5' y *Eco*RI en el extremo 3' del gen diseñado.
50 El gen fue dividido en 58 oligonucleótidos solapados (de 40 a 65 nucleótidos de longitud). Cada oligonucleótido tenía un solapamiento de 13-18 nucleótidos de longitud con los nucleótidos inmediatamente adyacentes en la hebra complementaria (T_m de entre 48 y 50°C). Los oligonucleótidos fueron sintetizados en un sintetizador de ADN (Gene Assembler Special, Pharmacia, Suecia) a una escala de 200 nmoles y purificados mediante electroforesis en gel de urea-poliacrilamida desnaturalizante. Los 58 oligonucleótidos fueron ensamblados para así formar el ADN de doble hebra, que es aquí el susodicho gen *cry1E* quimérico, siguiendo el método de síntesis de genes sin ligación de Singh
55 *et al.* (1996) y como se muestra en la figura 1. El ADN fue sometido a digestión con enzima de restricción *Hind*III y *Eco*RI y clonado con pBluescriptII SK(+) (Stratagene). El plásmido fue denominado pPK200. La secuencia de nucleótidos del ADN sintético fue confirmada mediante secuenciación del ADN sintético clonado en un sistema de secuenciación de ADN automatizada (Applied Biosystems modelo 373).

60

Fue construido un casete para la expresión de la toxina quimérica en *E. coli* bajo el control del promotor T7. Para esto, el plásmido pPK200 fue sometido a digestión con las enzimas de restricción *Nco*I y *Bam*HI y clonado en vector de expresión pET-19b (Novagen). El plásmido fue denominado pPK206. ADNs que codificaban la parte de toxina de Cry1Ea y Cry1Ca fueron amplificados mediante reacción en cadena de la polimerasa, usando cebadores adecuados,
65 lo cual creó sitios de restricción *Nco*I y *Bam*HI en el lado de cabeza y en el lado de cola con respecto al amplicón, respectivamente en ambos ADNs. Los productos amplificados fueron clonados en los sitios *Nco*I y *Bam*HI en el mismo vector (pET-19b). El constructo que tenía el ADN de la toxina Cry1Ea fue denominado pPK141 y el constructo que tenía el ADN de la toxina Cry1Ca fue denominado pPK35, como se ha descrito anteriormente. La cepa BL21DE3

ES 2 294 125 T3

de *E. coli* fue transformada con los constructos pPK141, pPK135 y pPK206. Las proteínas toxina fueron expresadas mediante inducción con apropiadas concentraciones de IPTG. La expresión fue efectuada a 15°C para evitar todo posible plegado incorrecto de las toxinas. Las proteínas toxina fueron cuantificadas densitométricamente sobre el gel de poliacrilamida desnaturizante. Fueron mezcladas en dieta semisintética diluciones seriales de las toxinas. La proteína de *E. coli* total sirvió de control en la dieta. Quince larvas neonatales de *Spodoptera litura* fueron liberadas sobre las tortas de la mezcla dietaria en un vaso de 100 ml y la boca del vaso fue cubierta con paño de muselina para permitir el intercambio gaseoso. Cada experimento fue llevado a cabo en 6 réplicas. La dieta era cambiada cada dos días. El bioensayo fue llevado a cabo con un fotoperiodo de 16/8 h a 25 ± 0,2°C. Los datos de toxicidad fueron registrados después de 7 días de alimentación. La EC₅₀ fue determinada mediante análisis log-probit estándar. Las tres proteínas fueron sometidas a ensayo simultáneamente. Los resultados representativos están indicados en la Tabla 4.

TABLA 4

Endotoxinas δ (S)	EC ₅₀ (µg/ml de dieta semisintética)
CryIEa	> 108
CryICa	29,48 ± 1,77
CryIE quimérica	6,27 ± 0,59

El resultado demostró que la toxina quimérica era varias veces más tóxica en comparación con la CryIEa y más de cuatro veces más tóxica en comparación con la proteína CryICa. La proteína toxina CryIEa no logró ocasionar mortalidad alguna o retardo alguno del crecimiento de las larvas de *Spodoptera*. El resultado estableció la exitosa manipulación de la toxina CryIEa para convertirla en una toxina mejorada biológicamente activa. La proteína manipulada era más tóxica que la proteína CryICa, que es la endotoxina δ mejor conocida contra *Spodoptera* sp.

Un similar experimento de toxicidad fue llevado a cabo con las larvas de *Helicoverpa armigera*. En este caso, larvas de 72 h de edad fueron liberadas sobre dieta semisintética que contenía una de las tres proteínas, y fue liberada solamente una larva en cada caja. La pérdida de peso fue registrada después de 7 días de alimentación. Los resultados representativos están indicados en la siguiente Tabla 5.

TABLA 5

Endotoxinas δ (S)	EC ₅₀ (µg/ml de dieta semisintética)
CryIEa	> 176
CryICa	136,22 ± 8,77
CryIE quimérica	26,71 ± 1,39

El resultado demuestra que la nueva endotoxina δ quimérica diseñada por nosotros no solamente es más tóxica para *Spodoptera*, sino que es también eficaz contra *Helicoverpa*. El diseño ha ampliado la gama de huéspedes de la toxina y ha mejorado asimismo considerablemente la toxicidad en comparación con la de las proteínas progenitoras.

Ejemplo 2

Alta toxicidad larval de las plantas transgénicas que expresan la nueva proteína CryIE quimérica

A fin de establecer la eficacia de la nueva toxina quimérica en las plantas, fue construido un vector de transformación de plantas para el desarrollo de plantas transgénicas. Un plásmido pPK58 (que tenía el promotor CaMV35S con potenciador duplicado) fue sometido a digestión con *Bam*HI y *Hind*III y un plásmido pPK200 fue sometido a digestión con *Hind*III y *Eco*RI para escindir el promotor CaMV35S con el potenciador duplicado y el gen *cryIE* quimérico, respectivamente. Fue efectuada una triple ligación para la clonación de los dos fragmentos en vector de clonación pLITMUS38 (New England Biolabs). El plásmido fue denominado pPK59, que tenía el promotor CaMV35S con el potenciador duplicado en el lado de cabeza con respecto al gen quimérico. El terminador de transcripción *nos* fue clonado en el lado de cola con respecto al gen quimérico. El elemento de poliadenilación *nos* fue amplificado usando pBI101.1 como plantilla con cebadores adecuados, lo cual creó sitios de restricción *Mfe*I y *Eco*RI en el lado de cabeza y en el lado de cola, respectivamente. El plásmido pPK59 fue sometido a digestión con *Eco*RI y el producto de PCR fue clonado a continuación de la digestión con las enzimas de restricción *Mfe*I y *Eco*RI. El clon en el cual el sitio de restricción *Eco*RI del gen sintético estaba ligado al sitio *Mfe*I del terminador *nos* (por cuanto que los mismos tienen

extremos compatibles) fue seleccionado y denominado pPK201. La orientación correcta del terminador *nos* fue confirmada mediante análisis de restricción y también mediante secuenciación de ADN. El casete de expresión (el gen *cry* sintético con promotor E-35S y terminador *nos*) fue clonado en vector binario Ti. El fragmento *Bam*HI-*Eco*RI del plásmido pPK201 fue clonado en pB1101.1 sustituyendo el fragmento *Bam*HI-*Eco*RI (gen *uidA* y terminador *nos*) del plásmido. Este vector binario fue denominado pPK202. Se presenta esquemáticamente en la figura 3 la construcción del vector de expresión en *E. coli* y en plantas. El constructo tenía las secuencias polinucleotídicas TAAACCATG GCT como contexto de iniciación de la traducción preferido por las plantas, siendo las TAA TGA introducidas en gen sintético para la terminación traslacional. *Agrobacterium tumefaciens* de la cepa LBA 4404 que contenía el plásmido colaborador pAL4404 fue transformada con vector binario pPK202 siguiendo el protocolo modificado de “electroporación de *Agrobacterium*” descrito por Cangelosi *et al.* (1991), y la colonia transformada fue sometida a selección sobre los antibióticos estreptomomicina, rifampicina y canamicina. Fue efectuada transformación mediada por *Agrobacterium* de *Nicotiana tobacum* cv. Patit Havana siguiendo el método de Horsch *et al.*, 1985, y las plantas transgénicas fueron sometidas a selección sobre el antibiótico canamicina. La presencia del gen que codificaba la toxina quimérica fue confirmada mediante PCR y Análisis Southern, y la expresión del transgen fue establecida mediante RT-PCR, análisis Western y ELISA. El resultado del ELISA estableció la expresión al 0,5% de la proteína toxina en la proteína foliar soluble total en la línea transgénica seleccionada para estos experimentos. Este alto nivel de la expresión fue el resultado del diseño del gen en el cual se usaron exclusivamente codones preferidos por las plantas. El contexto de iniciación de la traducción preferido por las plantas habría también desempeñado un importante papel en la expresión. Fue llevado a cabo bioensayo con insectos con las hojas de plantas transgénicas de dos meses de edad y larvas neonatales de *Spodoptera litura*. Discos foliares de 15 cm² de plantas transgénicas y de control fueron puestos en cajas cilíndricas que contenían papel secante húmedo en el fondo, y fueron liberadas sobre los mismos diez larvas de 1^{er} instar. Las bocas de las cajas fueron cubiertas con paño de muselina húmedo para mantener una suficiente humedad y permitir el intercambio de aire. Los experimentos de toxicidad fueron llevados a cabo en seis réplicas a 25 ± 0,2°C, y se mantuvo un fotoperiodo de 16/8 h. El resultado demostró (figura 4) que las plantas transgénicas que expresaban la nueva proteína quimérica eran altamente tóxicas para las larvas neonatales de *Spodoptera litura* y ocasionan una mortalidad del 100% a las 48 h de alimentación. El daño infligido a los discos filiares por las larvas de insecto era despreciable en comparación con los discos foliares de las plantas de control, que fueron comidos casi completamente. El alto nivel de la protección de la planta transgénica y la mortalidad de las larvas de *Spodoptera* tras haberse alimentado de las plantas transgénicas establecieron la eficacia de la toxina quimérica y las plantas transgénicas.

Ejemplo 3

35 *Alta toxicidad de la proteína Cry1E quimérica para las larvas de Spodoptera sp. en todas las fases de su desarrollo*

Fue llevado a cabo un bioensayo con larvas de 1^{er} instar (de 3 días de edad), de 3^{er} instar (de 7 días de edad) y de 5^o instar (de 12 días de edad) para establecer la eficacia de la proteína manipulada expresada en las plantas transgénicas. El bioensayo con larvas de 1^{er} instar ha sido descrito en el ejemplo 2. Fueron usadas para alimentar las larvas de fases avanzadas hojas completas de las plantas transgénicas y de control. El peciolo de la hoja fue mantenido en tapón de algodón en un matraz de 250 ml que contenía solución salina 1/2 MS para superar el marchitamiento de la hoja. Se dejó que se alimentasen de cada hoja cinco larvas de insecto. Las hojas de planta de control de las que se alimentaban las larvas de 3^{er} instar (figura 5) y de 5^o instar (figura 6) se cambiaban a las 16 h y a las 8 h, respectivamente, puesto que las mismas eran consumidas por completo por las larvas de insecto. El resultado estableció que la alimentación a base de las hojas transgénicas ocasiona la mortalidad de las larvas en todas las fases de desarrollo a las 48 h. La ingestión de aproximadamente 1 cm² de hoja transgénica fue suficiente para matar las larvas de 5^o instar. Estas larvas se veían moribundas tras haber estado alimentándose en la hoja transgénica por espacio de 8-16 h, y finalmente murieron a los 2 días. Se observaron en la superficie de las hojas excrementos de color verde con un alto contenido de agua. Algunas de las larvas presentaban una considerable pérdida de peso antes de la muerte.

En un experimento aparte, larvas de distintos instar fueron alimentadas con hojas de plantas transgénicas por espacio de 1 h, 2 h, 4 h, 8 h y 16 h, y fueron luego trasladadas a hojas de plantas de control. Se observó que 4 h de alimentación en plantas transgénicas eran suficientes para ocasionar una mortalidad del 100% de las larvas en todas las fases de desarrollo, aunque dichas larvas fuesen a continuación alimentadas con plantas no transgénicas. La ingestión de muy pequeñas cantidades de la toxina por parte de las larvas jóvenes retrasaba su pupación en 10-15 días más allá del ciclo larval normal de 15 días. Las pocas larvas que escaparon a la mortalidad se desarrollaron convirtiéndose en moscas. Los del 40% de los apareamientos con cópula usando tales moscas dieron huevos. Sin embargo, los huevos eran estériles y no llegaron a eclosionar. No ha sido descrita en la literatura hasta la fecha la toxicidad de la endotoxina δ para larvas de insectos de fase avanzada. El alto nivel de toxicidad puede ser debido a la elevada estabilidad de la toxina quimérica en el intestino medio de las larvas de insecto o a la mejorada fijación al receptor y a la capacidad de formación de poros de la endotoxina δ . El ejemplo estableció de nuevo el potencial de la toxina quimérica contra *Spodoptera* sp. Puesto que la *Helicoverpa* no prefiere comer hoja de tabaco, no pudo llevarse a cabo con *Helicoverpa* el experimento de toxicidad con tabacos transgénicos.

65

ES 2 294 125 T3

Ejemplo 4

Alta toxicidad de la nueva CryIE quimérica preparada a partir de hojas de tabacos transgénicos que expresan endotoxina δ

Se preparó proteína soluble total a partir de hojas de tabaco transgénico. Tejido de hojas frescas fue pulverizado bajo N_2 líquido y fue puesto luego en suspensión en 5 volúmenes de tampón de extracción de proteína (TrisCl, 20 mM, pH 9,5; EDTA 2 mM, pH 8,0; NaCl, 50 mM; DTT, 1 mM; PVP 2% y PMSF, 100 mM). La suspensión fue mezclada a fondo y centrifugada dos veces (20.000 x g, 20 min. y 4°C). El supernatante fue cargado en columna Sepharose Q (de 10 cm x 2,5 cm). La proteína fue eluida con un gradiente creciente de NaCl en tampón de extracción, y fueron recogidas 100 fracciones de 5 ml. La endotoxina δ fue detectada mediante ELISA. Fueron reunidas las fracciones que contenían la endotoxina δ . Una cantidad conocida de la endotoxina δ purificada a partir de la planta fue mezclada en dieta semisintética. Las pruebas de toxicidad fueron llevadas a cabo con larvas de 3 días de edad de *Spodoptera litura* y *Helicoverpa armigera*, como se ha descrito en los ejemplos anteriores. El resultado demostró que la EC_{50} (la concentración necesaria para una mortalidad del 50%) para *Spodoptera* y *Helicoverpa* era de $42,39 \pm 1,72$ ng/ml y $283,11 \pm 8,29$ ng/ml de dieta semisintética. El resultado estableció además el alto nivel de toxicidad para las larvas de *Spodoptera* y *Helicoverpa*. Es de notar que la proteína cristal insecticida hecha en tejido vegetal es mucho más tóxica en comparación con la misma proteína hecha en *E. coli*. Probablemente la endotoxina δ se pliega mucho mejor en el citoplasma vegetal, no pudiendo desestimarse el papel de algunos acompañantes no identificados en tal plegado.

Ejemplo 5

Estabilidad de la endotoxina δ quimérica en tejido vegetal

Proteína foliar soluble total de planta transgénica fue extractada como se ha expuesto anteriormente e incubada a 4°C y 28°C. Esto se usó para pruebas de toxicidad. Las muestras fueron tomadas cada dos días en el primer caso y cada día en el segundo caso. La proteína cruda total fue mezclada en dieta semisintética, y fue efectuado un experimento de toxicidad con larvas neonatales de *Spodoptera litura*. Los datos de mortalidad de los insectos fueron registrados a los 7 días de alimentación, y fue calculada la LC_{50} . Los resultados están indicados en las siguientes Tablas 6 y 7.

TABLA 6

Nº M	Periodo de incubación de la proteína cruda a 4°C (en días)	LD_{50} (en ng/ml de dieta semisintética)
1.	2	$4,78 \pm 2,4$
2.	4	$57,87 \pm 2,96$
3.	6	$66,44 \pm 3,65$
4.	8	$70,19 \pm 3,55$
5.	12	$73,82 \pm 3,1$
6.	16	$74,37 \pm 3,67$

TABLA 7

Nº M	Periodo de incubación de la proteína cruda a 28°C (en días)	LD_{50} (en ng/ml de dieta semisintética)
1.	1	$76,44 \pm 3,3$
2.	2	$98,13 \pm 4,6$
3.	3	$143,46 \pm 8,5$
4.	4	-
5.	5	-

El resultado estableció la estabilidad de la endotoxina δ quimérica diseñada por nosotros contra las proteasas vegetales. La toxina quimérica fue estable por espacio de más de 16 días a 4°C y 3 días a 28°C, y ocasionó una mortalidad de más de un 80%. El incremento de la LC_{50} con el transcurso del tiempo era presumiblemente debido a alguna degradación de la toxina.

ES 2 294 125 T3

Las principales ventajas de la presente invención son las siguientes:

- 5 1. La endotoxina δ CryIEa fue manipulada para obtener una nueva toxina quimérica, que es aquí la susodicha CryIE quimérica. La toxicidad de la proteína quimérica era varias veces más alta en comparación con las toxinas progenitoras o con otras endotoxinas δ de las que se ha descrito que funcionan contra *Spodoptera*. Su actividad larvívora era muy alta cuando esta toxina se hace en plantas.
- 10 2. El gen que codifica la toxina quimérica fue diseñado para ser expresado tanto en *E. coli* como en plantas. Por consiguiente, dicho gen puede ser usado en la manipulación de un microbio para la expresión de la toxina quimérica, lo cual puede usarse en la preparación de la formulación microbiana. El mismo gen puede ser también usado en la manipulación genética de las plantas para impartir resistencia a los insectos. Hemos demostrado que la secuencia diseñada por nosotros da un muy alto nivel de expresión (un 0,5% de la proteína soluble total) de la toxina quimérica en las hojas de algodón y tabaco transgénico (resultados no incluidos).
- 15 3. Las plantas transgénicas que expresaban la toxina quimérica presentaban un muy alto grado de protección contra las larvas de *Spodoptera litura* en todas las fases de desarrollo. Dichas larvas morían a los 2-3 días de alimentarse con las plantas transgénicas. Tal alto nivel de toxicidad de las plantas transgénicas contra cualquier insecto lepidóptero no ha sido descrito hasta la fecha. Esta proteína puede también ser eficaz contra muchas otras larvas de insectos. Nuestros resultados demuestran que la toxina era también eficaz contra *Helicoverpa*.
- 20 4. El potencial de la toxina quimérica en las plantas transgénicas fue establecido adicionalmente mediante alimentación de corta duración con plantas transgénicas. La alimentación por espacio de 4 horas ocasionó una mortalidad del 100% de las larvas de *Spodoptera* en todas las fases de desarrollo. La alimentación por espacio de periodos de tiempo extremadamente cortos (de hasta una hora) retardaba el desarrollo larval y estorbaba la metamorfosis. Tal proteína puede ser extremadamente valiosa para proteger bosques y cultivos agrónomicamente importantes. El gen que codifica la toxina quimérica puede ser usado en el desarrollo de plantas transgénicas y/o para la producción de la toxina en un microbio, que puede ser usado en formulaciones microbianas.
- 25 5. Puesto que las plantas transgénicas que expresaban la nueva toxina quimérica ocasionaban una mortalidad del 100% de las larvas de *Spodoptera* dentro de un muy corto periodo de tiempo de alimentación, será extremadamente baja la probabilidad de desarrollo de resistencia en los insectos contra esta endotoxina δ .
- 30

Información para la ID de secuencia N° 1

35

1. Características de la secuencia

- | | | |
|----|-----------|--------------------------|
| A | Longitud: | 641 |
| 40 | B | Tipo: Aminoácido |
| | C | Topología: Lineal |
| 45 | D | Tipo molecular: Proteína |

50

55

60

65

ES 2 294 125 T3

2. Descripción de secuencia: ID de secuencia N° 1

5
10
15
20
25
30
35

**1 MAIVNNQNQCVPYNCLNNPENEILDIERSN
31 STVATNIALEISRLLASATPIGGILLGLFD
61 AIWGSIGPSQWDLFLEQIELLIDQKIEEFA
91 RNQAISRLEGISSLYGIYTEAFREWEADPT
121 NPALKEEMRTQFNDMNSILVTAIPLFSVQN
151 YQVPFLSVYVQAANLHLSVLRDVSFVFGQAW
181 GFDIATINSRYNDLTRLIPIYTDYAVRWYN
211 TGLDRLPRTGGLRNWARFNQFRRELTISVL
241 DIISFFRNYDSRLYPIPTSSQLTREVYTD
271 VINITDYRVGSPFENIENSAIRSPHLMDFL
301 NNLTDIDTLIRGVHYWAGHRVTSHFTGSSQ
331 VITTPQYGITANAEPRTIAPSTFPGLNLF
361 YRTLSPFFRSENITPTLGINVVQGVGFI
391 QPNNAEVLYRSRGTVDSLNELPIDGENSLV
421 GYSHRLSHVTLTRSLYNTNITSLPTFVWTH
451 HSATNTNTINPDIITQIPLVKGFRLGGGTS
481 VIKGPGFTGGDILRRNTIGEFVSLQVNINS
511 PITQRYRLRFYASSRDARVIVLTGAASTG
541 VGGQVSVNMPLQKTMEIGENLTSRTFRYTD
571 FSNPFSFRANPDIIGISEQPLFGAGSISG
601 ELYIDKIELILADATFKRRRWSVHKASRPL
631 HLHQQAGLAAD**

Información para la ID de secuencia N° 2

- 40 1. Características de la secuencia
- A Longitud: 1990 bp
- 45 B Tipo: Ácido nucleico
- C Orientación: Doble
- 50 D Topología: Lineal
- E Tipo molecular: Sintético
- 55 F Fuente original: *Bacillus thuringiensis*
- G Característica: Gen quimérico

2. Descripción de secuencia: ID de secuencia N° 2

60

10 20 30 40 50

65 1 CCCGCATGCCCCGGGGGATCCAAGCTTTAAACCATGGCTATCGTTAACAA
GGGCGTACGGGGCCCCCTAGGTTCGAAATTTGGTACCGATAGCAATTGTT

ES 2 294 125 T3

51
CCAGAACCAGTGCCTCCCTTACAATTGCCTCAACAACCCAGAGAACGAGA
GGTCTTGGTCACGCAGGGAATGTTAACGGAGTTGTTGGGTCTCTTGGCTCT

5

101 TCTTGGACATCGAAAGATCCAATTCTACCGTGGCCACCAACATTGCTCTT
AGAACCTGTAGCTTTCTAGGTTAAGATGGCACCGGTGGTTGTAACGAGAA

10

151 GAGATTTCCAGATTGCTCGCTAGCGCAACTCCCATTGGTGGCATCCTCCT
CTCTAAAGGTCTAACGAGCGATCGCGTTGAGGGTAACCACCGTAGGAGGA

201
TGGATTGTTGACGCCATTTGGGGTTCATCGGACCATCACAATGGGATC
ACCTAACAGCTGCGGTAAACCCCAAGGTAGCCTGGTAGTGTACCCTAG

15

251
TCTTCCTTGAACAGATCGAGTTGCTCATTGACCAGAAGATCGAAGAGTTT
AGAAGGAACCTTGTCTAGCTCAACGAGTAACTGGTCTTCTAGCTTCTCAA

20

301
GCTAGGAACCAGGCAATTAGCCGTCTCGAGGGGATCTCTTCCCTTTACGG
CGATCCTTGGTCCGTTAATCGGCAGAGCTCCCCTAGAGAAGGGAAATGCC

25

351
AATCTATACAGAGGCCTTCAGAGAGTGGGAAGCTGACCCTACTAATCCAG
TTAGATATGTCTCCGGAAGTCTCTCACCTTCGACTGGGATGATTAGGTC

30

401
CAITGAAGGAAGAGATGCGTACTCAATTCAACGATATGAACTCTATCTTG
GTAACCTCCTTCTCTACGCATGAGTTAAGTTGCTATACTTGAGATAGAAC

35

451 GTCACCGCCATTCTCTCTTCTCAGTGCAGAACTACCAAGTGCCATTCT
CAGTGGCGGTAAGGAGAGAAGAGTCACGTCTTGATGGTTCACGGTAAGGA

40

501 CTCCGTCTATGTTCAAGCTGCAAACCTTGCACCTTTCTGTCTTCGCGACG
GAGGCAGATACAAGTTGACGTTTGAACGTGGAAAGACAGGAAGCGCTGC

45

551 TGTCCGTCTTTGGTCAAGCCTGGGGCTTCGATATCGCTACTATCAACTCC
ACAGGCAGAAACCAGTTCGGACCCCGAAGCTATAGCGATGATAGTTGAGG

50

601 CGTTACAACGACCTCACAAGGTTGATTCTATCTACACTGACTACGCTGT
GCAATGTTGCTGGAGTGTTCCAACCTAAGGATAGATGTGACTGATGCGACA

55

651
TAGATGGTACAATACTGGGCTTGACAGACTCCCACGTACCGGCGGATTGA
ATCTACCATGTTATGACCCGAAGTGTCTGAGGGTGCATGGCCGCCTAACT

60

65

ES 2 294 125 T3

701
GGAATTGGGCTCGCTTCAACCAGTTTAGGCGTGAGCTCACCATTAGCGTG
CCTTAACCCGAGCGAAGTTGGTCAAATCCGCACTCGAGTGGTAATCGCAC

5
751 TTGGACATCATTTCCTTCTTCAGAACTACGACTCTAGACTTTATCCTAT
AACCTGTAGTAAAGGAAGAAGTCTTTGATGCTGAGATCTGAAATAGGATA

10
801
TCCAACTAGTTCTCAACTCACCAGGGAGGTCTACACCGATCCTGTGATCA
AGGTTGATCAAGAGTTGAGTGGTCCCTCCAGATGTGGCTAGGACACTAGT

15
851
ACATTACCGACTATCGTGTGGGTCCTCCTTCGAGAACATTGAAAACAGC
TGTAATGGCTGATAGCACACCCAGGGAGGAAGCTCTTGTAACCTTTGTGCG

20
901 GCTATCAGATCTCCACACCTTATGGACTTCCTCAATAACTTGACTATCGA
CGATAGTCTAGAGGTGTGGAATACCTGAAGGAGTTATTGAACTGATAGCT

25
951
TACAGACCTTATCAGAGGTGTTCACTACTGGGCTGGCCATAGGGTCACCT
ATGTCTGGAATAGTCTCCACAAGTGATGACCCGACCGGTATCCCAGTGGA

30
1001
CTCACTTTACCGGTAGTTCCCAAGTGATCACAACCCCTCAATACGGAATT
GAGTGAAATGGCCATCAAGGGTTCCTAGTGTGGGGAGTTATGCCTTAA

35
1051
ACTGCCAACGCAGAGCCAAGACGTACCATTGCTCCAAGTACCTTTCCCGG
TGACGGTTGCGTCTCGGTTCTGCATGGTAACGAGGTTTCATGGAAAGGGCC

40
1101 GTTGAACCTCTTCTACCGCACATTGTCAAATCCATTCTTCAGGAGATCTG
CAACTTGAGAAGATGGCGTGTAAACAGTTTAGGTAAGAAGTCTCTAGAC

45
1151
AGAACATCACCCCTACCCTTGGGATCAACGTTGTCCAGGGAGTGGGTTTC
TCTTGTAGTGGGGATGGGAACCCTAGTTGCAACAGGTCCCTCACCCAAAG

50
1201
ATCCAGCCAAACAATGCTGAGGTGCTCTACAGGTCTAGAGGCACAGTGGA
TAGGTTCGGTTTGTACGACTCCACGAGATGTCCAGATCTCCGTGTCACCT

55
1251
CTCCTTGAACGAACTTCCAATTGACGGTGAGAACTCACTCGTCGGATACA
GAGGAACTTGCTTGAAGGTTAACTGCCACTCTTGAGTGAGCAGCCTATGT

60
1301 GTCACCGTCTTAGCCACGTTACTTTGACCAGGTCTCTCTATAACACTAAT
CAGTGGCAGAATCGGTGCAATGAACTGGTCCAGAGAGATATTGTGATTA

65
1351
ATCACTAGTTTGGCCACCTTCGTGTGGACTCACCCTCAGCCACCAACAC
TAGTGATCAAACGGGTGGAAGCACACCTGAGTGGTGAGTCCGGTGGTTGTG

ES 2 294 125 T3

1401
AAACACTATCAATCCCGATATCATTACACAAATCCCCCTTGTCAAGGGCT
TTTGTGATAGTTAGGGCTATAGTAATGTGTTTAGGGGGAACAGTTCCCGA

5

1451
TCCGCTTGGGTGGAGGGACCTCCGTCATTAAGGGCCCGGATTACCCGGT
AGGCGAACCACCTCCCTGGAGGCAGTAATTTCCCGGGCCTAAGTGGCCA

10

1501
GGCGATATCCTCCGTAGAAACACCATTGGTGAGTTTGTGTCCCTCCAGGT
CCGCTATAGGAGGCATCTTTGTGGTAACCACTCAAACACAGGGAGGTCCA

15

1551
TAACATTA ACTCTCCTATCACACAAAGGTACCGTCTTAGGTTCCGCTACG
ATTGTAATTGAGAGGATAGTGTGTTCCATGGCAGAATCCAAGGCGATGC

20

1601
CTTCCTCTAGAGACGCAAGAGTCATTGTGCTTACCGGTGCCGCTTCCACA
GAAGGAGATCTCTGCGTTCTCAGTAACACGAATGGCCACGGCGAAGGTGT

25

1651
GGAGTCGGTGGCCAAGTCAGCGTTAACATGCCATTCGAAAAGACTATGGA
CCTCAGCCACCGGTT CAGTCGCAATTGTACGGTAACGTTTTCTGATACCT

30

1701
GATCGGAGAGAACCTCACTAGTAGAACCTTCAGGATATACCGACTTCTCTA
CTAGCCTCTCTTGGAGTGATCATCTTGAAGTTCATATGGCTGAAGAGAT

35

1751
ACCCTTTCTCCTTCCGTGCTAACCCAGATATCATTGTCATCAGCGAACAA
TGGGAAAGAGGAAGGCACGATTGGGTCTATAGTAACCGTAGTCGCTTGTT

40

1801
CCTCTCTTCGGCGCCGGCTCCATCAGCTCTGGTGA ACTCTACATCGATAA
GGAGAGAAGCCGCGGCCGAGGTAGTCGAGAACACTTGAGATGTAGCTATT

45

1851
GATCGAGTTGATCCTTGCTGACGCCACATTCAAGAGGAGACGATGGAGCG
CTAGCTCAACTAGGAACGACTGCGGTGTAAGTTCTCCTCTGCTACCTCGC

50

1901
TGCACAAAGCCTCACGCCCTCTTCACCTCCACCACTCAAGCTGGACTCGCT
ACGTGTTTCGGAGTGCGGGAGAAGTGGAGGAGGTTGTTTCGACCTGAGCGA

55

1951 GCTGATTAATGAGAATTCGGATCCAAGCTTCGGCCCGCTC
CGACTAATTA CTTAAGCCTAGGTTTCGAACTTCGGGCGAG

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína endotoxina δ quimérica CryIE de ID SEC N° 1.
2. Proteína como la reivindicada en la reivindicación 1, donde dicha proteína de ID SEC N° 1 es de una longitud de 641 residuos de aminoácidos.
- 10 3. Proteína como la reivindicada en la reivindicación 1, donde dicha proteína quimérica de ID SEC N° 1 es diseñada a partir de las endotoxinas δ CryIEa y CryICa de *Bacillus thuringiensis*.
- 15 4. Proteína como la reivindicada en la reivindicación 2, donde dicha proteína quimérica de una longitud de 641 residuos consta de los residuos 1 a 529 de la endotoxina CryIEa de la misma posición, los residuos 530 a 599 de CryICa de la posición 533 a la 602, los residuos 600 a 616 de CryIEa de la posición 588 a la 604 y los residuos 617 a 641 de un polipéptido sintético.
- 20 5. Proteína como la reivindicada en la reivindicación 1, donde el dominio peptídico de 530 a 587 de CryIEa puede ser sustituido por el de la endotoxina δ .
6. Proteína como la reivindicada en la reivindicación 2, donde los últimos 25 residuos de aminoácidos mejoran la estabilidad contra las proteasas de las plantas.
7. Proteína como la reivindicada en la reivindicación 1, donde dicha proteína quimérica es estable a temperaturas de entre 4 y 35°C.
- 25 8. Gen quimera de ID SEC N° 2.
9. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera codifica proteína quimérica de ID SEC N° 1.
- 30 10. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera es de una longitud de 1990 pares de bases (bp).
- 35 11. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera es un ADN de doble hebra de 1,99 kb.
12. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera contiene codón preferido por las plantas distribuido uniformemente para facilitar la eficaz traducción.
- 40 13. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera contiene codón de ATGGCT de iniciación de la traducción preferido por las plantas en el extremo 5'.
14. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera contiene codón de TAATGA de terminación de la traducción preferido por las plantas.
- 45 15. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera contiene 33 sitios de restricción distribuidos uniformemente a todo lo largo del gen a una distancia de aproximadamente 40-80 bp.
- 50 16. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 15, donde los sitios de restricción son enzimas seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *Hind* III, *Eco*RI y *Bam*HI.
17. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera está dividida en 58 oligonucleótidos solapados de una longitud de 40 a 65 bp cada uno situados a una distancia de 6 a 26 pares de bases (bp).
- 55 18. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera contiene dichos nucleótidos solapados con un solapamiento de 13 a 18 nucleótidos con los oligonucleótidos inmediatamente adyacentes en la hebra complementaria.
- 60 19. Quimera como la reivindicada en la reivindicación 8, donde dicha quimera tiene un valor T_m que está situado entre 44 y 55°C.
20. Método para sobreexpresar la proteína quimérica insecticida CryIE en microbios, comprendiendo dicho método los pasos de:
- 65 (a) clonar el gen CryIE de ID SEC N° 2 que codifica dicha proteína quimérica en un vector,
- (b) transformar un microbio con dicho vector clonado, y

ES 2 294 125 T3

(c) sobreexpresar dicha proteína quimérica en dicho microbio.

21. Método como el reivindicado en la reivindicación 20, donde dicha quimera es expresada en un microbio seleccionado de entre los miembros de un grupo que consta de bacterias, algas y hongos.

22. Método como el reivindicado en la reivindicación 20, donde las enzimas de restricción para dicha clonación son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *Hind* III, *Eco*RI, *Nco*I, *Mfe* I y *Bam*HI.

23. Método como el reivindicado en la reivindicación 20, donde se induce la sobreexpresión de dicha proteína usando isopropiltiogalactósido (IPTG).

24. Método como el reivindicado en la reivindicación 20, donde se sobreexpresa dicha proteína a 15°C para evitar el plegado incorrecto de dichas proteínas.

25. Método como el reivindicado en la reivindicación 20, donde dichos vectores son seleccionados de entre los miembros de un grupo que consta de plásmidos, ADN viral y cósmidos.

26. Método como el reivindicado en la reivindicación 20, donde la expresión de la quimera en el microbio es confirmada mediante RT-PCR, análisis Western y ELISA.

27. Método como el reivindicado en la reivindicación 20, donde la presencia de quimera en el microbio es confirmada mediante PCR y análisis southern.

28. Método para tratar plantas infectadas con insectos usando proteína quimérica insecticida de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método los pasos de:

(a) incorporar un gen que codifica proteína quimera CryIE de la reivindicación 1 a una planta infectada con insectos,

(b) exponer la planta transgénica a insectos, y

(c) determinar la actividad insecticida de dichas plantas transgénicas.

29. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde las plagas insectiles son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *spodoptera sp.* y *Helicoverpa sp.*

30. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde las plantas son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de tabaco, algodón, garbanzo, quinchoncho, cacahuete, coliflor, col, guindilla y pimiento.

31. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde las enzimas de restricción para dicha clonación son seleccionadas de entre los miembros de un grupo que consta de *Hind* III, *Eco*RI, *Nco*I y *Bam*HI.

32. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde la proteína quimérica presenta un alto grado de expresión en plantas, ascendiendo a aproximadamente un 0,5% de la proteína soluble total de las plantas.

33. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde dicha proteína quimérica es estable en dicha planta transgénica.

34. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde los insectos expuestos a dicha proteína quimérica presentan pérdida de peso antes de la muerte.

35. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde dicha proteína quimérica presenta propiedad insecticida contra los insectos en todas las fases de desarrollo.

36. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde dicha proteína quimérica es un insecticida varias veces más potente en comparación con las proteínas progenitoras.

37. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde la actividad insecticida de dicha proteína quimérica arroja una mortalidad de las plagas insectiles que está situada entre un 80 y un 100% a las aproximadamente 4 horas de exposición.

38. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde los insectos expuestos a dicha proteína quimérica por espacio de aproximadamente 1 hora presentan un desarrollo retardado, infertilidad y metamorfosis desbaratada.

39. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde la EC₅₀ para *Helicoverpa sp.* está situada entre 250 y 350 ng/ml de dieta artificial de insectos.

ES 2 294 125 T3

40. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde la EC_{50} para *Spodoptera sp.* está situada entre 25 y 50 ng/ml de dieta artificial.

5 41. Método como el reivindicado en la reivindicación 28, donde dicho método no presenta efecto adverso alguno en el crecimiento normal de las plantas transformadas.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 294 125 T3



Fig.1

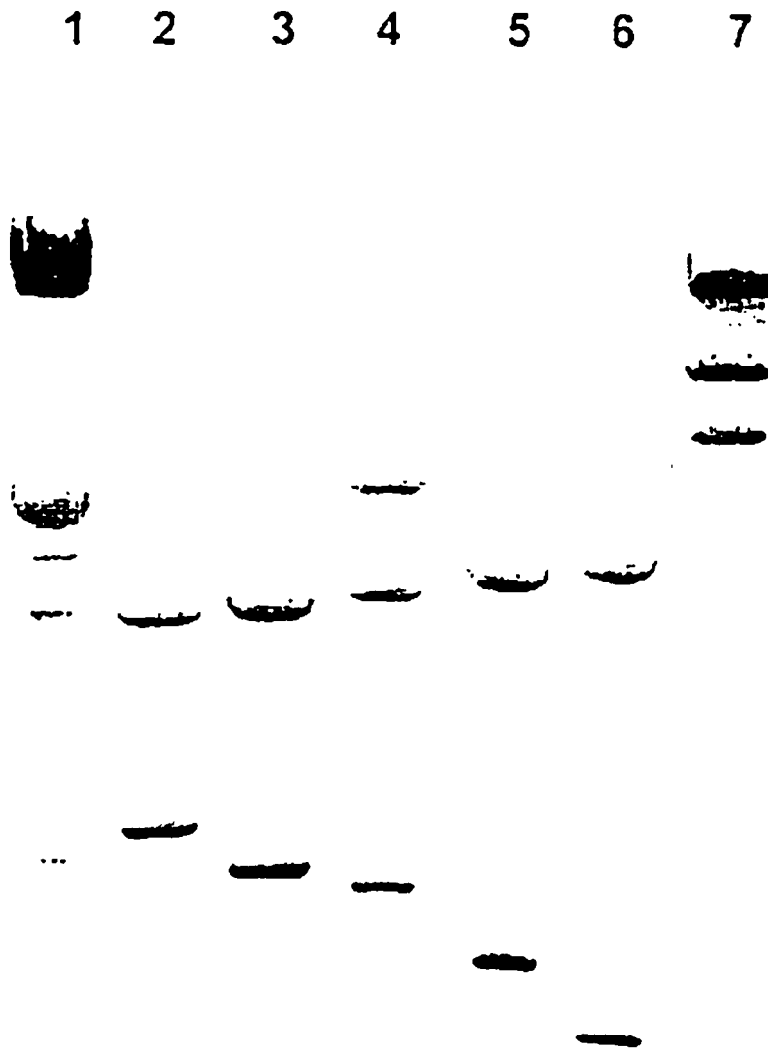


Fig.2

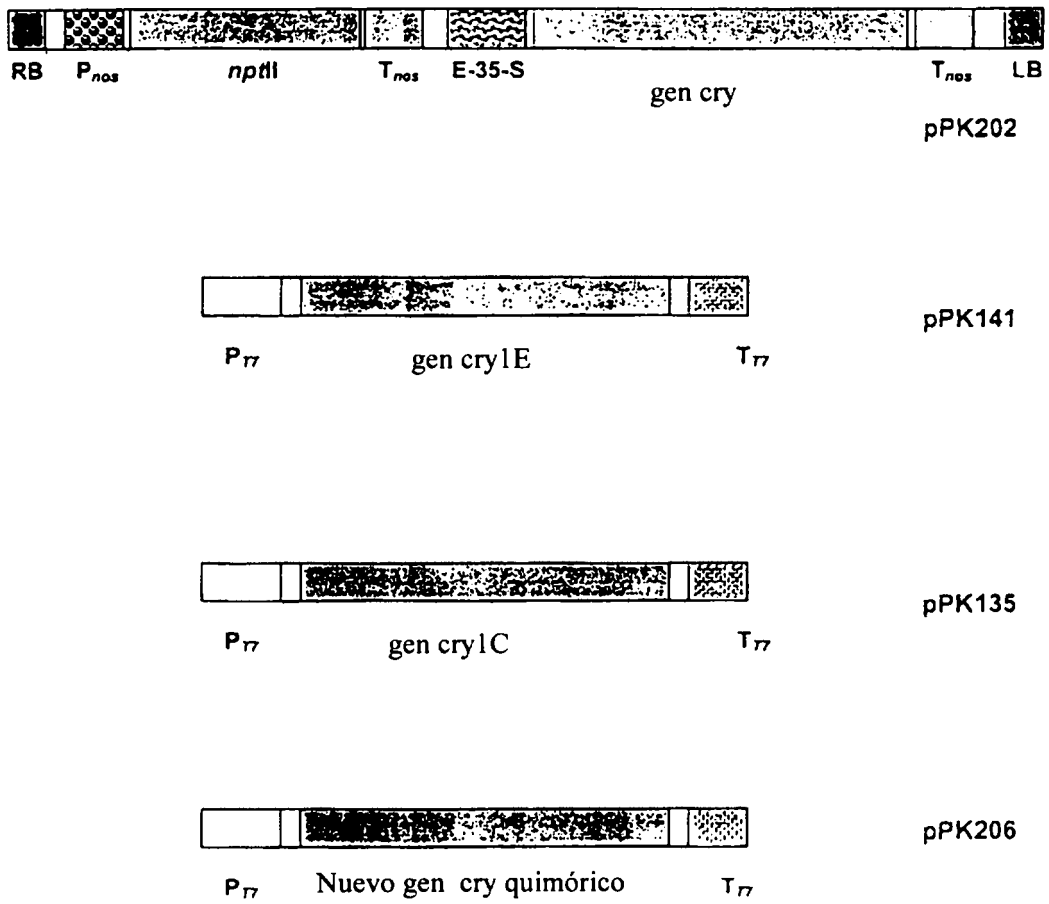


Fig.3

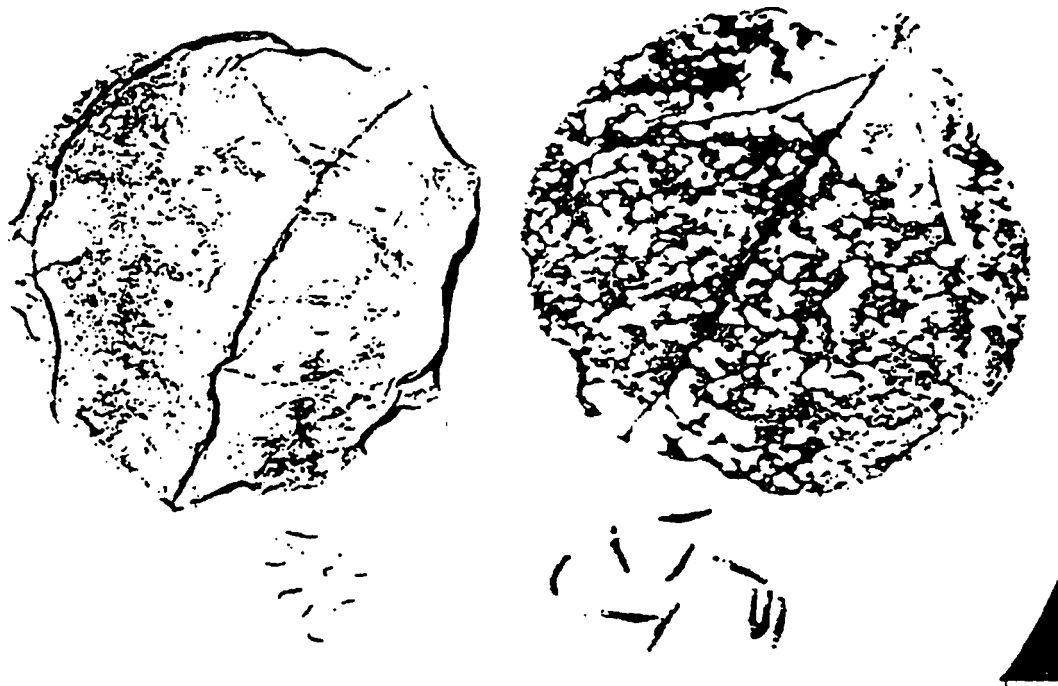


Fig.4

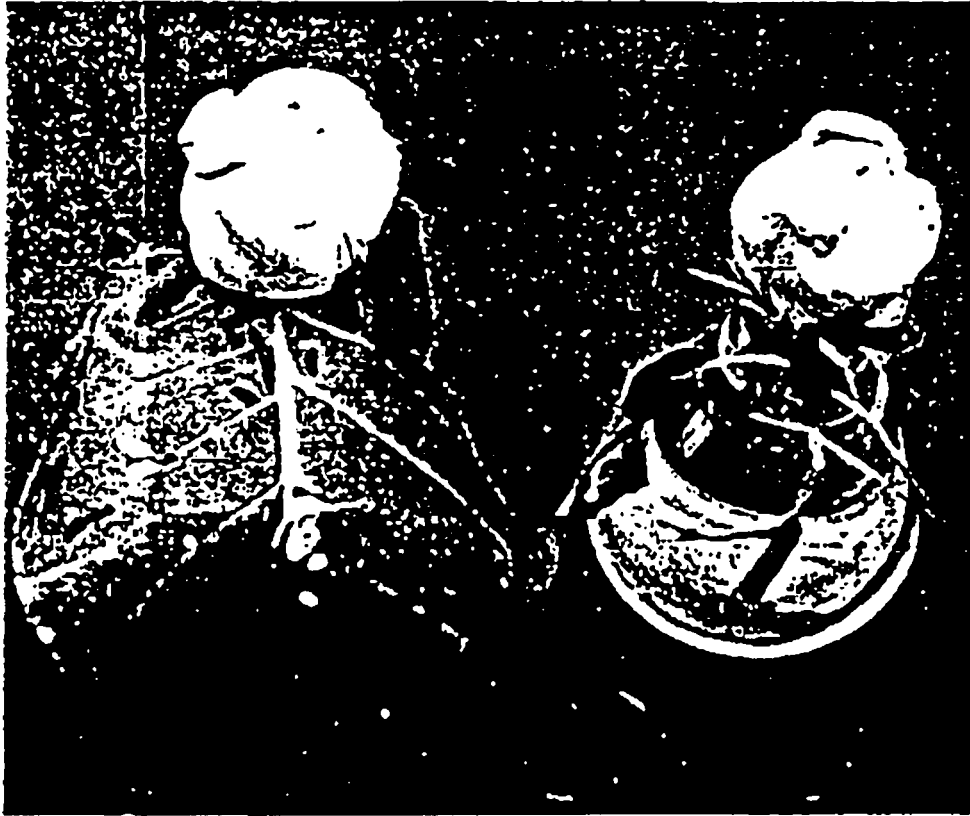


Fig.5



Fig.6

ES 2 294 125 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo de Investigación Científica e Industrial
<120> Proteína endotoxina delta quimérica con extraordinariamente alta actividad insecticida
5 <130> PCT 206
<140> PCT/IN 02/00092
<141> 2000-03-28
10 <160> 2
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 641
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> Una proteína endotoxina delta quimérica CryIE de una longitud de 641 residuos de aminoácidos
<400> 1

25 Met Ala Ile Val Asn Asn Gln Asn Gln Cys Val Pro Tyr Asn Cys Leu
1 5 10 15

30 Asn Asn Pro Glu Asn Glu Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Asn Ser Thr
20 25 30

35 Val Ala Thr Asn Ile Ala Leu Glu Ile Ser Arg Leu Leu Ala Ser Ala
35 40 45

40 Thr Pro Ile Gly Gly Ile Leu Leu Gly Leu Phe Asp Ala Ile Trp Gly
50 55 60

45 Ser Ile Gly Pro Ser Gln Trp Asp Leu Phe Leu Glu Gln Ile Glu Leu
65 70 75 80

50

55

60

65

ES 2 294 125 T3

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

ES 2 294 125 T3

Asn Ile Thr Asp Tyr Arg Val Gly Pro Ser Phe Glu Asn Ile Glu Asn
 275 280 285
 5 Ser Ala Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Phe Leu Asn Asn Leu Thr
 290 295 300
 10 Ile Asp Thr Asp Leu Ile Arg Gly Val His Tyr Trp Ala Gly His Arg
 305 310 315 320
 15 Val Thr Ser His Phe Thr Gly Ser Ser Gln Val Ile Thr Thr Pro Gln
 325 330 335
 20 Tyr Gly Ile Thr Ala Asn Ala Glu Pro Arg Arg Thr Ile Ala Pro Ser
 340 345 350
 25 Thr Phe Pro Gly Leu Asn Leu Phe Tyr Arg Thr Leu Ser Asn Pro Phe
 355 360 365
 30 Phe Arg Arg Ser Glu Asn Ile Thr Pro Thr Leu Gly Ile Asn Val Val
 370 375 380
 35 Gln Gly Val Gly Phe Ile Gln Pro Asn Asn Ala Glu Val Leu Tyr Arg
 385 390 395 400
 40 Ser Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Asn Glu Leu Pro Ile Asp Gly Glu
 405 410 415
 45 Asn Ser Leu Val Gly Tyr Ser His Arg Leu Ser His Val Thr Leu Thr
 420 425 430
 50 Arg Ser Leu Tyr Asn Thr Asn Ile Thr Ser Leu Pro Thr Phe Val Trp
 435 440 445
 Thr His His Ser Ala Thr Asn Thr Asn Thr Ile Asn Pro Asp Ile Ile
 450 455 460

55

60

65

ES 2 294 125 T3

Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Leu Gly Gly Gly Thr Ser
465 470 475 480

5 Val Ile Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile Leu Arg Arg Asn
485 490 495

10 Thr Ile Gly Glu Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn Ser Pro Ile
500 505 510

15 Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg Asp Ala
515 520 525

20 Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly Gly Gln
530 535 540

25 Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly Glu Asn
545 550 555 560

30 Leu Thr Ser Arg Thr Phe Arg Tyr Thr Asp Phe Ser Asn Pro Phe Ser
565 570 575

35 Phe Arg Ala Asn Pro Asp Ile Ile Gly Ile Ser Glu Gln Pro Leu Phe
580 585 590

40 Gly Ala Gly Ser Ile Ser Ser Gly Glu Leu Tyr Ile Asp Lys Ile Glu
595 600 605

45 Leu Ile Leu Ala Asp Ala Thr Phe Lys Arg Arg Arg Trp Ser Val His
610 615 620

Lys Ala Ser Arg Pro Leu His Leu His Gln Gln Ala Gly Leu Ala Ala
625 630 635 640

50 <210> 2

<211> 1990

<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Un gen quimera de una longitud de 1990 bps que codifica para proteína endotoxina delta quimérica Cry1E.

60

65

ES 2 294 125 T3

<400> 2

5 cccgcatgcc ccgsggggac caagctttaa accatggcta tcgttaacaa ccagaaccag
 60

 tgcgtccctt acaattgcct caacaacca gagaacgaga tcttggacat cgaaagatcc
 120

10 aattctaccg tggccacca cttgctctt gagattcca gattgctcgc tagcgcaact
 180

 cccattgggtg gcctcctcct tggattgttc gacgccattt ggggttccat cggaccatca
 240

 caatgggacg tcttccttga acagatcgag ttgctcattg accagaagat cgaagagttt
 300

20 gctaggaacc aggcaattag ccgtctcgag gggatctctt ccttttacgg aatctataca
 360

 gaggccttca gagagtggga agctgaccct actaatccag cattgaagga agagatgcgt
 420

 acctcaattca acgatatgaa ctctatcttg gtcaccgcca ttcctctctt ctcagtgcag
 480

30 aactaccaag tgccattcct ctccgtctat gttcaagctg caaacttgca cctttctgtc
 540

 cttcgogacg tgtccgtctt tggtaagcc tggggcttcg atatcgctac tatcaactcc
 600

 cgttacaacg acctcacaag gttgattcct atctacactg actacgctgt tagatggtag
 660

40 aatactgggc ttgacagact cccacgtacc ggcggattga ggaatcgggc tcgottcaac
 720

 cagtttaggc gtgagctcac cattagcgtg ttggacatca tttcctctct cagaaactac

45

50

55

60

65

ES 2 294 125 T3

780

5 gactctagac tttatcctat tccaactagt tctcaactca ccagggaggt ctacaccgat
840

cctgtgatca acattaccga ctatcgtgtg ggtccctcct togagaacat tgaaaacagc
900

10 gctatcagat ctccacacct tatggacttc ctcaataact tgactatcga tacagacctt
960

15 atcagaggtg ttcactactg ggctggccat agggtcacct ctcactttac oggtagtctc
1020

caagtgatca caaccctca atacggaatt actgccaacg cagagccaag acgtaccatt
1080

20 gctccaagta cctttcccgg gttgaacctc ttctaccgca cattgtcaaa tccattcttc
1140

25 aggagatctg agaacatcac ccctaccctt gggatcaacg ttgtccaggg agtgggtttc
1200

atccagccaa acaatgctga ggtgctctac aggtctagag gcacagtgga ctcccttgaac
1260

30 gaacttccaa ttgacgggtga gaactcactc gtcggataca gtcaccgtct tagccacggt
1320

actttgacca ggtctctcta taacactaat atcactagtt tgcccacctt cgtgtggact
1380

35 caccactcag ccaccaaacac aaacactatc aatcccgata tcattacaca aatccccctt
1440

40 gtcaagggct tccgcttggg tggagggacc tccgtcatta aagggcccgg attcaccggt
1500

45 ggcgatatcc tccgtagaaa caccattggt gagtttgtgt cctccaggt taacattaac
1560

tctctatca cacaaaggta ccgtcttagg ttccgctacg cttcctctag agacgcaaga
1620

50 gtcattgtgc ttaccggtgc cgcttccaca ggagtccgtg gccaaagtacg cgttaacatg
1680

55 ccattgcaaa agactatgga gatcggagag aacctcacta gtagaacctt caggtatacc

60

65

ES 2 294 125 T3

1740

gacttctcta acccttcttc cttccgtgct aaccagata tcattggcat cagcgaacaa
1800

5

ccctctcttcg gcgcccggctc catcagctct ggtgaactct acatcgataa gatcgagttg
1860

10

atccttgctg acgccaqatt caagaggaga cgatggagcg tgcacaaagc ctcacgcctt
1920

15

cttcacctcc accaacqagc tggactcgtc gctgattaat gagaattcgg atccaagctt
1980

gggcccggctc
1990

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65