



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 375**

51 Int. Cl.:
C07K 14/325 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00991258 .5**

96 Fecha de presentación : **19.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1255773**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.11.2002**

54 Título: **Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*.**

30 Prioridad: **28.12.1999 US 173387 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2009

73 Titular/es: **Bayer BioScience N.V.**
Technologiepark 38
9052 Gent, BE

72 Inventor/es: **Arnaut, Greta;**
Boets, Annemie;
Damme, Nicole;
Mathieu, Eva;
Vanneste, Stijn y
Van Rie, Jeroen

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 321 375 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

Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*.

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a nuevas secuencias de DNA que codifican proteínas insecticidas producidas por cepas de *Bacillus thuringiensis*. Particularmente, se proporcionan nuevas secuencias de DNA que codifican una proteína designada como Cry1Bf que son útiles para proteger las plantas contra el daño causado por los insectos. Se incluyen también en esta memoria microorganismos y plantas transformados(as) con el gen recién aislado de tal modo que los mismos son útiles para conferir resistencia a los insectos por expresión de la proteína insecticida.

Antecedentes de la invención15 **(i) Campo de la invención**

Bt o *Bacillus thuringiensis* es bien conocido por su toxicidad específica para las plagas de insectos, y ha sido utilizado desde hace casi un siglo para reprimir plagas de insectos en las plantas. En los últimos años, se han producido plantas transgénicas que expresan proteínas de Bt que se encontró reprimen con éxito el daño causado por los insectos en las plantas (v.g., Vaeck *et al.*, 1987).

A pesar del aislamiento de cierto número de genes de proteínas cristalinas de Bt, continúa la búsqueda de nuevos genes codificantes de proteínas insecticidas. De hecho, se sabe que las proteínas cristalinas insecticidas de Bt tienen una gama de insectos diana relativamente estrecha comparada con los insecticidas químicos. Asimismo, la posesión de toxinas múltiples activas sobre las mismas especies de insectos diana hace posible el uso de proteínas que tengan modos de acción diferentes a fin de que pueda evitarse o retardarse el desarrollo de resistencia de los insectos.

(ii) Descripción de la técnica afín

Con anterioridad, se han identificado varios tipos de proteínas Cry1B (véase Crickmore *et al.*, 1998, que se incorpora en esta memoria por referencia, para todos los detalles).

La nueva proteína Cry1Bf tiene la identidad de secuencia más estrecha con la proteína Cry1Be (Payne *et al.*, 1998, patente U.S. 5.723.758), pero difiere todavía aproximadamente en un 14 por ciento de la secuencia de aminoácidos de su fragmento de proteína tóxica con el fragmento tóxico de la proteína Cry1Be.

Sumario de la invención

De acuerdo con esta invención, se proporciona una secuencia de DNA que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del fragmento insecticida de digestión con tripsina de la proteína codificada por el gen *cry1Bf* depositado en la BCCM-LMBP bajo el número de acceso LMBP 3986.

De acuerdo con esta invención se prefiere particularmente una secuencia de DNA que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento insecticida de la proteína de SEQ ID No. 2; alternativamente, un DNA que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2; o una secuencia de DNA que comprende la secuencia de DNA de SEQ ID No. 1.

Adicionalmente, de acuerdo con esta invención se proporcionan secuencias de DNA que codifican al menos la porción siguiente de la proteína recién aislada: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 desde el aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 640.

Adicionalmente, de acuerdo con esta invención se proporcionan las secuencias anteriores de DNA que comprenden una secuencia artificial de DNA que tiene un uso de codones diferente comparado con la secuencia de DNA existente naturalmente pero que codifica la misma proteína o su fragmento insecticida.

Aún más, se proporciona de acuerdo con esta invención una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del fragmento insecticida de digestión con tripsina de la proteína codificada por el gen *cry1Bf* depositado en la BCCM-LMBP bajo el número de acceso LMBP 3986.

En esta invención se prefiere particularmente una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por: la secuencia de aminoácidos de un fragmento insecticida de la proteína de SEQ ID No. 2; alternativamente, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 desde el aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 640; o una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2.

Se proporcionan también en esta memoria genes quiméricos que comprenden el DNA que se ha definido arriba bajo el control de un promotor expresable en plantas, y células de plantas, plantas o semillas transformadas que contienen dichos genes quiméricos, particularmente células de plantas, plantas, o semillas seleccionadas del grupo

constituido por maíz, algodón, arroz, colza oleaginosa, especies de Crucíferas, berenjena, soja, patata, girasol, tomate, caña de azúcar, té, habichuelas, tabaco, fresa, trébol, pepino, sandía, pimienta, avena, cebada, trigo, dalia, gladiolo, crisantemo, remolacha azucarera, sorgo, alfalfa, y cacahuete. De acuerdo con esta invención, el gen quimérico puede estar integrado en el DNA nuclear o el DNA de los cloroplastos de las células vegetales.

Adicionalmente, de acuerdo con esta invención se proporcionan microorganismos transformados que contienen cualquiera de las secuencias anteriores de DNA, particularmente los seleccionados de los géneros *Agrobacterium*, *Escherichia*, o *Bacillus*.

Se proporciona también en esta memoria un proceso para reprimir insectos, que comprende expresar cualquiera de las secuencias de DNA anteriores en una célula hospedadora, particularmente células vegetales, y poner en contacto los insectos con dichas células hospedadoras, y un proceso para conferir a una planta resistencia a los insectos, que comprende transformar células de plantas con cualquiera de las secuencias de DNA o genes quiméricos anteriores, y regenerar plantas transformadas a partir de dichas células que son resistentes a los insectos.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

De acuerdo con esta invención, han sido aisladas y caracterizadas secuencias de DNA que codifican una nueva toxina de *Bt*. El nuevo gen se designó *cry1Bf*, y su proteína codificada Cry1Bf.

De acuerdo con esta invención, "proteína Cry1Bf" hace referencia a cualquier proteína que comprenda el fragmento mínimo de proteína de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 que retiene actividad insecticida, particularmente cualquier proteína que comprenda la secuencia de aminoácidos desde el aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 640 en SEQ ID No. 2, con inclusión, pero sin carácter limitante, de la proteína completa con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2. Esto incluye híbridos o proteínas quiméricas que comprenden el fragmento mínimo de la proteína tóxica, así como proteínas que contienen al menos uno de los tres dominios funcionales del fragmento tóxico de SEQ ID No. 2.

La expresión "DNA/proteína que comprende la secuencia X", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a un DNA o una proteína que incluye o contiene al menos la secuencia X, de tal modo que otras secuencias de nucleótidos o aminoácidos pueden incluirse en el extremo 5' (o terminal N) y/o 3' (o terminal C), v.g. (la secuencia de nucleótidos de) una proteína marcadora seleccionable como se describe en EP 0 193 259.

Como se utiliza en esta memoria, el término "*cry1Bf*DNA" hace referencia a cualquier secuencia de DNA que codifica la proteína Cry1Bf, respectivamente, como se ha definido arriba. Esto incluye secuencias de DNA existentes naturalmente, artificiales o sintéticas que codifican las proteínas recién aisladas o sus fragmentos insecticidas como se han definido arriba. Se incluyen también en esta memoria secuencias de DNA que codifican proteínas insecticidas que son lo bastante similares a las regiones codificantes de las secuencias de DNA genómico depositadas o a las secuencias proporcionadas en el listado de secuencias de tal manera que las mismas pueden (es decir, tienen la capacidad de) hibridarse a estas secuencias de DNA en condiciones de hibridación severas. La expresión condiciones de hibridación severas, como se utiliza en esta memoria, se refiere particularmente a las condiciones siguientes: inmovilización de las secuencias de DNA genómico relevantes en un filtro, y prehibridación de los filtros durante 1 a 2 horas en 50% formamida; 50% SSPE, 2x reactivo de Denhardt y 0,1% SDS a 42°C, o 1 a 2 horas en 6 x SSC, 2 x reactivo de Denhardt y 0,1% SDS a 68°C. La sonda desnaturalizada y marcada se añade luego directamente al fluido de prehibridación y se lleva a cabo incubación durante 16 a 24 horas a la temperatura apropiada arriba mencionada. Después de la incubación, se lavan los filtros durante 20 minutos a la temperatura ambiente en 1 x SSSC, 0,1% SDS, seguido por tres lavados de 20 minutos cada uno a 68°C en 0,2 x SSC y 0,1% SDS. Se realiza una autorradiografía por exposición de los filtros durante 24 a 48 horas a película de rayos X (Kodak XAR-2 o equivalente) a -70°C con un filtro de intensificación. Por supuesto, en este proceso pueden utilizarse condiciones y parámetros equivalentes con tal que todos ellos retengan las condiciones deseadas de hibridación severa. Una de tales condiciones equivalentes incluye: inmovilización de las secuencias de DNA genómico relevantes en un filtro, y prehibridación de los filtros durante 1 a 2 horas en 50% formamida, 5% SSPE, 2 x reactivo de Denhardt y 0,1% SDS a 42°C o 1 a 2 horas en 6 x SSC, 2 x reactivo de Denhardt y 0,1% SDS a 68°C. La sonda desnaturalizada (DIG- o radio-) marcada se añade luego directamente al fluido de prehibridación y se lleva a cabo incubación durante 16 a 24 horas a la temperatura apropiada arriba mencionada. Después de la incubación, se lavan luego los filtros durante 30 minutos a la temperatura ambiente en 2 x SSC, 0,1% SDS, seguido por dos lavados de 30 minutos cada uno a 68°C en 0,5 x SSC y 0,1% SDS. Se realiza una autorradiografía por exposición de los filtros durante 24 a 48 horas a película de rayos X (Kodak XAR-2 o equivalente) a -70°C con un filtro intensificador.

"Actividad insecticida" de una proteína, como se utiliza en esta memoria, significa la capacidad de una proteína para matar los insectos cuando se proporciona dicha proteína como alimento a los insectos, preferiblemente por expresión en un hospedador recombinante tal como una planta. "Cantidades represoras de los insectos" de una proteína, como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una cantidad de proteína que es suficiente para limitar el daño causado a una planta por los insectos que se alimentan de dicha planta hasta niveles comercialmente aceptables, v.g. por matar los insectos o por inhibir el desarrollo o crecimiento de los insectos de tal manera que aquéllas aportan un menor daño a una planta y el rendimiento de una planta no se ve afectado desfavorablemente en un grado significativo.

De acuerdo con esta invención, los insectos sensibles a las nuevas proteínas Cry de la invención se ponen en contacto con esta proteína en cantidades represoras de los insectos, preferiblemente cantidades insecticidas.

“Proteína Cry” o “proteína Cry de esta invención”, como se utiliza en esta memoria, hacen referencia a la nueva proteína aislada de acuerdo con esta invención e identificada en esta memoria como proteína Cry1Bf. Una proteína Cry, como se utiliza en esta memoria, puede ser una proteína con el tamaño de longitud total, denominada también una protoxina, o puede encontrarse en una forma ligera o totalmente truncada (v.g., truncación en el terminal N y el terminal C) con tal que se retenga la actividad insecticida, o puede ser una combinación de diferentes proteínas o partes de proteínas en una proteína híbrida o de fusión. Una “protoxina Cry” hace referencia a la proteína cristalina de longitud total tal como es codificada por la secuencia de DNA de *Bt* existente naturalmente; una “toxina Cry” hace referencia a un fragmento insecticida de la misma, particularmente el fragmento tóxico más pequeño de la misma, comprendido típicamente en el intervalo de pesos moleculares de aproximadamente 60 a aproximadamente 80 kD como se determina por electroforesis SDS-PAGE. Un “gen *cry*” o “DNA *cry*”, como se utiliza en esta memoria, es una secuencia de DNA que codifica una proteína Cry de acuerdo con esta invención, haciendo referencia a cualquiera de las secuencias de DNA de *cry1Bf* arriba definidas.

El “fragmento tóxico más pequeño” de una proteína Cry como se utiliza en esta memoria, es aquel fragmento que puede obtenerse por digestión con tripsina o quimotripsina de la proteína cristalina solubilizada de longitud total que retiene la toxicidad, o aquel fragmento tóxico de proteína codificado por los fragmentos de DNA de la proteína Cry. Esta proteína tendrá en la mayor parte de los casos una truncación corta en el terminal N y una truncación larga en el terminal C comparada con la protoxina. Aunque para la expresión recombinante, los fragmentos tóxicos que comienzan en o alrededor de el aminoácido de la posición original 1 son una realización más preferida de acuerdo con esta invención, debe indicarse que además de una truncación en el terminal C, pueden estar deletionados también algunos aminoácidos del terminal N con tal que se retenga el carácter insecticida de la proteína. El extremo N-terminal del fragmento tóxico más pequeño se determina convenientemente por determinación de la secuencia de aminoácidos del terminal N de la proteína cristalina soluble tratada con tripsina o quimotripsina por métodos disponibles rutinariamente en la técnica.

El DNA codificante de las proteínas Cry de esta invención puede aislarse de manera convencional a partir de las cepas de *E. coli*, depositadas en 25 de noviembre de 1999 en la BCCM-LMBP bajo los números de acceso LMBP 3983, LMBP 3984, LMBP 3985 y LMBP 3986. Las proteínas Cry codificadas pueden utilizarse para preparar anticuerpos específicos monoclonales o policlonales de manera convencional (Hofte *et al.*, 1988). Las formas de toxina pueden obtenerse por digestión con proteasa (v.g., tripsina) de las protoxinas Cry.

Las secuencias de DNA que codifican las proteínas Cry pueden aislarse de manera convencional a partir de las cepas respectivas o pueden sintetizarse sobre la base de la secuencia de aminoácidos codificada.

Las secuencias de DNA que codifican las proteínas Cry de la invención se identificaron por digestión de DNA total procedente de cepas aisladas de *Bt* con enzimas de restricción; fraccionamiento por tamaños de los fragmentos de DNA, así producidos, en fracciones de DNA de 5 a 10 Kb; ligación de estas fracciones a vectores de clonación; cribado del *E. coli*, transformado con los vectores de clonación, con una sonda de DNA que se construyó a partir de una región de genes de proteínas cristalinas *Bt* conocidas o con una sonda de DNA basada en fragmentos PCR específicos generados a partir de DNA de *Bt* utilizando iniciadores correspondientes a los genes de las proteínas cristalinas de *Bt* conocidas.

Asimismo, secuencias de DNA para uso en esta invención pueden producirse por síntesis. De hecho, debido a la degeneración del código genético, algunos codones de aminoácidos pueden estar reemplazados con otros sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína. Adicionalmente, algunos aminoácidos pueden emplearse en sustitución de otros aminoácidos equivalentes sin cambiar significativamente la actividad insecticida de la proteína. Asimismo, cambios en la secuencia o composición de aminoácidos en regiones de la molécula, diferentes de los responsables de fijación y toxicidad (v.g. formación de poros) tienen menos probabilidad de causar una diferencia en la actividad insecticida de la proteína. Tales equivalentes del gen incluyen secuencias de DNA que se hibridan a la secuencia de DNA de las toxinas o protoxinas Cry de SEQ ID No. 2, 4, 6 en condiciones severas y que codifican una proteína con las mismas características insecticidas que la (pro)toxina de esta invención, o secuencias de DNA que codifican proteínas con una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, muy preferiblemente al menos 95%, con la forma de la toxina proteínica (desde el término N hasta 2 aminoácidos más allá del bloque 5 de la secuencia conservada como se define en Schnepf *et al.*, 1998) o con la forma de protoxina proteínica de la proteína Cry1Bf de esta invención, como se determina utilizando el programa GAP del paquete Wisconsin de GCG (Madison, Wisconsin, EE.UU., versión 10.0; se utilizaron los defectos de GCG en el programa GAP; para las comparaciones de secuencia de aminoácidos, se utilizó la matriz de registro blosum62).

Por supuesto, puede construirse cualquier otra secuencia de DNA que difiera en su uso de codones pero que codifique la misma proteína o una proteína similar que tenga sustancialmente la misma actividad insecticida, dependiendo del propósito particular. Se ha descrito, en sistemas de expresión procariotas y eucariotas, que el cambio del uso de codones al de la célula hospedadora es deseable para la expresión génica en hospedadores extraños (Benneze & may, 1982; Itakura, 1977). Adicionalmente, se sabe que los genes de la proteína cristalina de *Bt* no presentan sesgo alguno hacia codones eucariotas, y son muy ricos en AT (Adang *et al.*, 1985, Schnepf *et al.*, 1985). En la bibliografía están disponibles tablas de uso de codones (Wada *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1989) y en los principales bancos de datos

de secuencias de DNA (v.g. EMBL en Heidelberg, Alemania). De acuerdo con ello, pueden construirse secuencias de DNA sintético de tal manera que se produzcan las mismas o sustancialmente las mismas proteínas. Es evidente que pueden idearse varias secuencias de DNA una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos de la proteína Cry de esta invención. Tales otras secuencias de DNA incluyen secuencias de DNA sintéticas o semisintéticas que se han cambiado a fin de desactivar ciertos sitios en el gen, v.g. por desactivación selectiva de ciertos elementos crípticos reguladores o de procesamiento presentes en la secuencia nativa como se describe en las publicaciones PCT WO 91/16432 y WO 93/09218, o por adaptación del uso global de codones al de un organismo hospedador más afín, preferiblemente el del organismo hospedador en el que se desea la expresión. Cuando se producen dichos genes, la secuencia de aminoácidos codificada debe retenerse en el mayor grado posible, aunque pueden hacerse truncaciones o sustituciones o adiciones poco importantes de aminoácidos con tal que no se vea afectada negativamente la toxicidad de la proteína.

Modificaciones pequeñas en una secuencia de DNA tal como la descrita arriba pueden realizarse rutinariamente por mutagénesis mediada por PCR (Ho *et al.*, 1989, White *et al.*, 1989).

Con la expresión “sustancialmente igual”, cuando se hace referencia a una proteína, se entiende la inclusión de una proteína que difiere en algunos aminoácidos, o a la que se han añadido algunos aminoácidos (v.g. una proteína de fusión, véase Vaeck *et al.*, 1987) o de la que se ha delecionado (v.g. truncación N- o C-terminal), con tal que la proteína no presente una diferencia fundamental en su actividad insecticida.

La expresión “dominio funcional” de una toxina Cry como se utiliza en esta memoria significa cualquier o cualesquiera partes o dominios de la toxina con una estructura específica que puede transferirse a otra proteína (Cry) para proporcionar una nueva proteína híbrida que tanga al menos una característica funcional (v.g., las características de fijación y/o toxicidad) de la toxina Cry de la invención (Ge *et al.*, 1991). Dichas partes pueden formar una característica esencial de la proteína híbrida *Bt* con las características de fijación y/o toxicidad de la proteína Cry de esta invención. Una proteína híbrida de este tipo puede tener una gama de hospedadores ampliada, una toxicidad incrementada y/o puede utilizarse en una estrategia para prevenir el desarrollo de resistencia a los insectos (Publicación de Patente Europea (“EP”) 408403; Visser *et al.*, 1993).

Los fragmentos de 5 a 10 Kb, preparados a partir de DNA total de las cepas *Bt* de la invención, pueden ligarse en vectores de expresión adecuados y transformarse en *E. coli*, y los clones pueden cribarse luego por métodos convencionales de inmunosondeo de colonias (French *et al.*, 1986) para expresión de la toxina con anticuerpos monoclonales o policlonales generados contra la proteína Cry, o por hibridación con sondas de DNA.

Asimismo, los fragmentos de 5 a 10 Kb, preparados a partir de DNA total de las cepas *Bt* de la invención o fragmentos del mismo clonados y/o subclonados en *E. coli*, pueden ligarse en vectores lanzadera *Bt* adecuados (Lereclus *et al.*, 1992) y transformarse en un mutante *Bt* cristal menos. Los clones se criban luego respecto a la producción de cristales (detectada por microscopía) o proteínas cristalinas (detectadas por SDS-PAGE).

El gen que codifica la proteína Cry de esta invención puede secuenciarse de manera convencional (Maxam y Gilbert, 1980; Sanger, 1977) para obtener la secuencia de DNA. Las comparaciones de secuencia indican que los genes son diferentes de genes descritos previamente que codifican protoxinas y toxinas con actividad contra Lepidópteros (Höfte y Whiteley, 1989; Crickmore, *et al.*, 1998); y las actualizaciones de 15 de diciembre de 1999 y 16 de octubre de 2000 en el sitio de nomenclatura de *Bt* en Internet correspondiente a la publicación de Crickmore *et al.* (1998) que se encuentra en:

http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html

Una parte eficaz como insecticida de las secuencias de DNA, que codifica una porción eficaz como insecticida de la forma de protoxina de la proteína Cry recién identificada, puede producirse de manera convencional después del análisis de la secuencia del gen. En tales fragmentos, se prefiere que se retenga al menos la secuencia hasta el extremo C-terminal del bloque 5 de secuencia conservada de las proteínas *Bt* (Höfte & Whiteley, 1989; Schnepf *et al.*, 1998), preferiblemente hasta dos amino-ácidos del terminal C del bloque 5 de la secuencia conservada. La secuencia de aminoácidos de la proteína Cry puede determinarse a partir de la secuencia de DNA de las secuencias de DNA aisladas. Por “una parte eficaz como insecticida” de secuencias de DNA que codifican la proteína Cry, a la que se hace referencia también en esta memoria como “gen truncado” o “DNA truncado”, se entiende una secuencia de DNA que codifica un polipéptido que tiene menos aminoácidos que la forma de protoxina de la proteína Cry, pero que es insecticida para los insectos.

Con objeto de expresar la totalidad o una parte eficaz como insecticida de la secuencia de DNA que codifica una proteína Cry de esta invención en *E. coli*, en otras cepas de *Bt* y en plantas, pueden introducirse sitios de restricción adecuados, que flanquean la secuencia de DNA. Esto puede hacerse por mutagénesis orientada, utilizando procedimientos bien conocidos (Stanssens *et al.*, 1989; White *et al.*, 1989). Con objeto de obtener una expresión mejorada en plantas, el uso de codones del gen *Cry* o parte eficaz como insecticida del gen *Cry* de esta invención puede modificarse para formar un gen o parte de gen equivalente, modificado o artificial de acuerdo con las publicaciones PCT WO 91/16432 y WO 93/09218; EP 0 358 962 y EP 0 359 472, o los genes o partes de genes *Bt* pueden insertarse en el genoma del cloroplasto y expresarse en el mismo utilizando un promotor activo en cloroplastos (v.g., McBride *et al.*, 1995). Para obtener expresión mejorada en plantas monocotiledóneas tales como maíz, puede añadirse también

un intrón de monocotiledónea al gen quimérico, y la secuencia de DNA del gen *cry* o su parte insecticida de esta invención puede cambiarse ulteriormente de una manera neutra respecto a la traducción, a fin de modificar secuencias de DNA posiblemente inhibitorias presentes en la parte del gen por medio de inserción de intrones orientada y/o por la introducción de cambios respecto al uso de codones, v.g., adaptación del uso de codones al más preferido por la planta específica (Murrat *et al.*, 1989) sin cambiar significativamente la secuencia de aminoácidos codificada.

Adicionalmente, pueden evaluarse las propiedades de fijación de la proteína Cry de la invención, utilizando métodos conocidos en la técnica (Van Rie *et al.*, 1990), a fin de determinar si la proteína Cry de la invención se fija a sitios en el intestino medio de los insectos que son diferentes de los reconocidos por otras proteínas Cry u otras proteínas *Bt* conocidas. Las toxinas *Bt* con sitios de fijación diferentes en insectos sensibles relevantes son muy valiosas para reemplazar toxinas *Bt* conocidas a las cuales pueden haber desarrollado resistencia los insectos, o para ser utilizadas en combinación con toxinas *Bt* que tengan un modo de acción diferente a fin de impedir o retardar el desarrollo de resistencia por los insectos frente a las toxinas *Bt*, particularmente cuando se expresan en una planta. Debido a las características de la toxina *Bt* recién aislada, es extremadamente útil para la transformación de plantas, v.g. monocotiledóneas tales como maíz o arroz y hortalizas tales como plantas de especies de *Crucíferas*, proteger estas plantas contra el daño causado por los insectos.

La parte del gen *cry* eficaz como insecticida o su equivalente, preferiblemente el gen Cry quimérico, que codifica una porción eficaz como insecticida de la protoxina Cry, puede insertarse establemente de manera convencional en el genoma nuclear de una célula simple de la planta, y la célula así transformada de la planta puede utilizarse de manera convencional para producir una planta transformada que es resistente a los insectos. A este respecto, un plásmido Ti desarmado, que contiene la parte del gen *cry* eficaz como insecticida en *Agrobacterium tumefaciens*, puede utilizarse a fin de transformar la célula de la planta, y después de ello, puede regenerarse una planta transformada a partir de la célula transformada de la planta utilizando los procedimientos descritos, por ejemplo, en EP 0 116 718, EP 0 270 822, en la publicación PCT WO 84/02913 y en la solicitud de Patente Europea publicada ("EP") 0 242 246, y en Gould *et al.* (1991). Vectores de plásmido Ti preferidos contienen cada uno la parte del gen *cry* eficaz como insecticida entre las secuencias de borde, o al menos localizadas a la izquierda o a la derecha de la secuencia de borde, del T-DNA del plásmido Ti. Por supuesto, pueden utilizarse otros tipos de vectores para transformar la célula vegetal, utilizando procedimientos tales como transferencia directa de genes (como se describe, por ejemplo, en EP 0 233 247, transformación mediada por polen (como se describe, por ejemplo, en EP 0 270 356, publicación PCT WO 85/01856, y patente U.S. 4.684.611), transformación de plantas mediadas por virus de RNA (como se describe, por ejemplo, en EP 0 067 553 y en la patente U.S. 4.447.956), transformación mediada por liposomas (como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. 4.536.475), y otros métodos tales como los métodos recién descritos para transformación de ciertas líneas de maíz (Fromm *et al.*, 1990; Gordon-Kamm *et al.*, 1990) y arroz (Shimamoto *et al.*, 1989; Datta *et al.*, 1990) y el método recién descrito para transformación de monocotiledóneas en general (publicación PCT WO 92/09696).

La planta transformada resultante puede utilizarse en un esquema convencional de mejora genética de plantas para producir más plantas transformadas con las mismas características o para introducir la parte del gen *cry* eficaz como insecticida en otras variedades de la misma especie o de especies de plantas afines. Las semillas que se obtienen a partir de las plantas transformadas contienen la parte del gen *cry* eficaz como insecticida como inserción genómica estable. Las células de la planta transformada pueden cultivarse de manera convencional para producir la porción eficaz como insecticida de la protoxina Cry, preferiblemente la toxina Cry, que puede recuperarse para uso en composiciones insecticidas convencionales contra Lepidópteros (Patente U.S. 5.254.799). De acuerdo con esta invención, pueden utilizarse plantas o semillas de la invención para obtener resistencia a los insectos, v.g. por siembra o plantación de dichas semillas o plantas en un campo en el que usualmente existen insectos dañinos. Métodos para la obtención de resistencia a los insectos y métodos para obtención de rendimiento mejorado o deterioro reducido por los insectos se proporcionan por consiguiente de acuerdo con la invención por plantación o siembra en un campo, preferiblemente un campo en el cual existen habitualmente insectos dañinos que se alimentan de dichas plantas, ocurren usualmente o debe esperarse que ocurran a niveles que ocasionen daños económicos a las plantas, de las plantas o semillas de la invención que producen la proteína Cry de la invención.

La parte del gen *cry* eficaz como insecticida, preferiblemente el gen *cry* truncado, se inserta en el genoma de una célula vegetal de tal manera que el gen insertado se encuentra aguas abajo (es decir, 3') de, y bajo el control de, un promotor que puede dirigir la expresión de la parte del gen en la célula vegetal. Esto se realiza preferiblemente por inserción del gen quimérico *cry* en el genoma de la célula vegetal, particularmente en el genoma nuclear o del cloroplasto. Promotores preferidos incluyen: los promotores 35S constitutivos fuertes (los "promotores 35S") del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) de aislados CM 1841 (Gardner *et al.*, 1981), CabbB-S (Franck *et al.*, 1980) y CabbB-JI (Hull y Howell, 1987); promotores de la familia de la ubiquitina (v.g. el promotor ubiquitina del maíz de Christensen *et al.*, 1992, véase también Cornejo *et al.*, 1993), el promotor *gos2* (de Pater *et al.*, 1992), el promotor *emu* (Last *et al.*, 1990), los promotores actina del arroz tales como el promotor descrito por Zhang *et al.* (1991); y el promotor TR1' y el promotor TR2' (el "promotor TR1'" y el "promotor TR2'", respectivamente), que dirigen la expresión de los genes 1' y 2', respectivamente, del T-DNA (Velten *et al.*, 1984). Alternativamente, puede utilizarse un promotor que no es constitutivo pero que es más bien específico para uno o más tejidos u órganos de la planta (v.g. hojas y/o raíces) con lo cual la parte del gen *cry* insertada se expresa únicamente en células de los tejidos u órganos específicos. Por ejemplo, la parte del gen *cry* eficaz como insecticida podría expresarse selectivamente en las hojas de una planta (v.g., maíz, algodón) por introducción de la parte del gen eficaz como insecticida bajo el control de un promotor inducible por la luz tal como el promotor del gen de la subunidad pequeña de ribulosa-1,5-bisfosfato-

carboxilasa de la planta propiamente dicha o de otra planta tal como un guisante como se describe en la Patente U.S. 5.254.799. Otra alternativa consiste en utilizar un promotor cuya expresión sea inducible (v.g., por temperatura, lesión o factores químicos).

5 La parte del gen *cry* eficaz como insecticida se inserta en el genoma de la planta de tal manera que la parte insertada del gen se encuentra aguas arriba (es decir, 5') respecto a señales adecuadas de regulación de la transcripción del extremo 3' (es decir, formación de transcritos y señales de poliadenilación). Esto se realiza preferiblemente por inserción del gen *cry* quimérico en el genoma de la célula vegetal. Señales preferidas de poliadenilación y formación de transcritos incluyen las del gen de octopina-sintasa (Gielen *et al.*, 1984) y el gen 7 del T-DNA (Velten y Schell, 10 1985), que actúan como secuencias de DNA 3' sin traducir en las células vegetales transformadas.

La parte del gen *cry* eficaz como insecticida puede insertarse opcionalmente en el genoma de la planta como un gen híbrido (patente U.S. 5.254.799; Vaeck *et al.*, 1987) bajo el control del mismo promotor como un gen marcador seleccionable, tal como el gen *neo* (EP 0 242 236) que codifica resistencia a la kanamicina, con lo que la planta expresa 15 una proteína de fusión.

La totalidad o parte del gen *cry* que codifica una proteína anti-lepidópteros puede utilizarse también para transformar otras bacterias, tales como una *B. thuringiensis* que tiene actividad insecticida contra Lepidoptera o Coleoptera. De este modo, puede producirse una cepa de *Bt* transformada que es útil para combatir un amplio espectro de plagas de 20 insectos lepidópteros y coleópteros o para combatir plagas de insectos lepidópteros adicionales. La transformación de bacterias, tales como bacterias del género *Agrobacterium*, *Bacillus* o *Escherichia*, con la totalidad o parte del gen *cry* de esta invención, incorporado en un vehículo de clonación adecuado, puede llevarse a cabo de manera convencional, utilizando preferiblemente técnicas convencionales de electroporación como se describe en Mahillon *et al.* (1989) y en la Publicación de Patente PCT WO 90/06999.

25 Cepas transformadas de especies de *Bacillus* que contienen el gen *cry* de esta invención pueden fermentarse por métodos convencionales (Dulmage, 1981; Bernhard y Utz, 1993) para proporcionar rendimientos de células altos. En condiciones apropiadas que son bien conocidas (Dulmage, 1981) todas estas cepas esporulan para producir proteínas cristalinas que contienen la protoxina Cry con rendimientos altos.

30 Una composición insecticida, particularmente anti-lepidópteros, de esta invención puede formularse de manera convencional utilizando los microorganismos transformados con el gen *cry*, o preferiblemente su proteína Cry respectiva o la protoxina, toxina o porción de protoxina Cry eficaz como insecticida como ingrediente activo, junto con vehículos, diluyentes, emulsionantes y/o dispersantes adecuados (v.g. como se describe en Bernhard y Utz, 1993). 35 Esta composición insecticida puede formularse como un polvo humectable, pelets, gránulos o polvo o como una formulación líquida con disolventes acuosos o no acuosos formando una espuma, gel, suspensión, concentrado, etc.

Un método para reprimir los insectos, particularmente Lepidópteros de acuerdo con esta invención puede comprender aplicar, v.g. (aplicar por pulverización), a un lugar (área) a proteger, una cantidad insecticida de la proteína Cry o 40 células hospedadoras transformadas con el gen *cry* de esta invención. El locus a proteger puede incluir, por ejemplo, el hábitat de las plagas de insectos o el crecimiento de vegetación o un área en la que va a cultivarse vegetación.

Para obtener la protoxina o toxina Cry, células de los hospedadores recombinantes que expresan la proteína Cry pueden cultivarse de manera convencional en un medio de cultivo adecuado y lisarse luego utilizando medios convencionales tales como degradación enzimática, detergentes o análogos. La protoxina puede separarse luego y purificarse 45 por técnicas estándar tales como cromatografía, extracción, electroforesis, o análogos. La toxina puede obtenerse luego por digestión con tripsina de la protoxina.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, y no se aportan con carácter limitante de la invención o la protección 50 buscada. El listado de secuencias al que se hace referencia en los ejemplos, las reivindicaciones y la descripción es como sigue:

Listado de Secuencias

55 SEQ ID No. 1 - Secuencia de aminoácidos y DNA de la proteína y el DNA Cry1Bf

SEQ ID No. 2 - Secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Bf

60 SEQ ID No. 3 - Secuencia de DNA para el iniciador Cry1B.fw.

SEQ ID No. 4 - Secuencia de DNA para el iniciador B.R.

SEQ ID No. 5 - Secuencia de DNA para el iniciador B.F.

65 A no ser que se indique otra cosa en los ejemplos, todos los procedimientos para la producción y manipulación de DNA recombinante se llevan a cabo por los procedimientos estándar descritos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Segunda Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY (1989), y en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, EE.UU. Materiales y métodos

ES 2 321 375 T3

estándar para trabajos de biología molecular en plantas se describen en Plant Molecular Biology Labfax (1993) por R.R.D. Croy, publicado conjuntamente por BIOS Scientific Publications Ltd (Reino Unido) y Blackwell Scientific Publications (Reino Unido). Procedimientos para la tecnología PCR pueden encontrarse en "PCR protocols: a guide to methods and applications", recopilado por M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White (Academic Press, Inc., 1990).

Ejemplos

10 Ejemplo 1

Caracterización de las cepas

15 La cepa BtS02072BG se aisló a partir de una muestra de polvo de cereales recogida en Santo Tomás la Unión, Ilocos, Filipinas.

La cepa puede cultivarse en medios estándar convencionales, preferiblemente medio T₃ (triptona 3 g/l, triptosa 2 g/l, extracto de levadura 1,5 g/l, 5 mg MnCl₂, Na₂HPO₄·2H₂O 0,05 M, NaH₂PO₄·H₂O 0,05 M, pH 6,8 y 1,5% agar), preferiblemente a 28°C. Para almacenamiento a largo plazo, se prefiere mezclar un volumen igual de una suspensión esporas-cristales con un volumen igual de glicerol al 50% y almacenarlo a -70°C o liofilizar una suspensión esporas-cristales. Para la esporulación, se prefiere el cultivo en medio T₃ durante 72 horas a 28°C, seguido por almacenamiento a 4°C. Las proteínas cristalinas producidas por las cepas durante la esporulación se empaquetan en cristales.

25 Ejemplo 2

Actividad insecticida de la cepa BtS02072BG contra especies de insectos lepidópteros seleccionadas

30 Se realizaron ensayos de toxicidad sobre larvas recién nacidas de *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Ostrinia nubilalis*, *Spodoptera frugiperda* y *Sesamia nonagrioides* alimentadas con una dieta artificial estratificada con mezclas esporas-cristales de BtS02072BG, a razón de aproximadamente 10⁹ esporas-cristales por ml.

La dieta artificial (Vanderzant, 1962), se dosificó en los pocillos de placas Costar de 24 pocillos para los tests en *H. Zea*, *H. virescens* y *O. nubilalis*. Se aplicaron 50 microlitros de la mezcla esporas-cristales en la superficie de la dieta y se secaron en una corriente laminar de aire. Para los tests en *H. Zea* y *H. virescens*, se puso una larva en cada pocillo y se utilizaron 20 larvas por muestra. Para los tests con *O. nubilalis*, se pusieron dos larvas en cada pocillo y se utilizaron 24 larvas por muestra. La dieta artificial se dosificó en los pocillos de placas Costar de 48 pocillos para los tests con *S. frugiperda* y *S. nonagrioides*. Se aplicaron 25 microlitros de la mezcla esporas-cristales en la superficie de la dieta y se secaron en una corriente laminar de aire. Se puso una larva en cada pocillo y se utilizaron 18 larvas por muestra. Se contaron las larvas muertas y supervivientes el séptimo día. El porcentaje de larvas muertas se muestra a continuación en la Tabla I.

TABLA I

45 Porcentaje de larvas muestras después de aplicación de la mezcla esporas-cristales a los insectos

	BTS02072BG
50 <i>H. zea</i>	70
<i>H. virescens</i>	85-50
<i>O. nubilalis</i>	92
55 <i>S. frugiperda</i>	6
<i>S. nonagrioides</i>	100

60 Ejemplo 3

Caracterización del nuevo gen cry

65 El gen BtS02072BG se detectó como sigue. Se realizó en primer lugar una PCR utilizando iniciadores génicos degenerados de proteínas cristalinas en la cepa BtS02419J. El producto de amplificación resultante se utilizó como molde en una PCR secundaria utilizando iniciadores degenerados de proteínas cristalinas.

ES 2 321 375 T3

El producto de amplificación resultante se purificó utilizando el sistema de purificación Wizard PCR preps (Promega), y se ligó al vector pGEM-T (Promega). La mezcla de ligación se sometió a electroporación en *E. coli* XL1 Blue. Se realizó una minipreparación de transformantes que contenían al menos 40 inserciones, y se realizaron digestiones con enzimas de restricción seleccionadas. Después de la electroforesis del DNA de la minipreparación digerido, pudieron observarse diferentes patrones de fragmentos de DNA. Para cada patrón se seleccionó al menos una colonia. Se realizó una preparación de DNA apropiada con objeto de determinar la secuencia de la inserción del plásmido presente en cada colonia seleccionada.

A partir de los productos de amplificación clonados de la cepa BtS02419J, se encontró una secuencia que era idéntica al fragmento correspondiente de *cry1Be1*, excepto por la diferencia de un solo nucleótido. En primer lugar, se seleccionaron iniciadores para evaluar la presencia de una secuencia *cry* similar a la del fragmento del gen *cry* secuenciado a partir de BtS02419J en cierto número de cepas Bt, una de las cuales era la cepa BtS02072BG. Estos iniciadores tenían la secuencia siguiente (5' a 3'):

Iniciador directo: cry1B.fw: CAG TCC AAA CGG GTA TAA AC

Iniciador inverso: B.R: CTG CTT CGA AGG TTG CAG TA

La alineación de las secuencias determinadas a partir de los productos de amplificación con secuencias *cry* disponibles públicamente demuestra que la cepa BtS02072BG contiene un nuevo gen de tipo *cry1B*.

Ejemplo 4

Clonación y expresión de los genes *Cry*

Con objeto de aislar el gen de longitud total de tipo *cry1B* a partir de BtS02072BG, se preparó el DNA total de esta cepa y se digirió parcialmente con Sau3A. El DNA digerido se fraccionó por tamaños en un gradiente de sacarosa y los fragmentos que tenían una longitud de 5 Kb a 10 Kb se ligaron al vector de clonación pUC10 digerido con BamH1 y tratado con TsAP (fosfatasa alcalina termosensible) (Yannisch-Perron *et al*, 1985). La mezcla de ligación se sometió a electroporación en células *E. coli* XL1-Blue o *E. coli* JM109. Los transformantes se extendieron en placas LB-triacilina que contenían Xgal e IPTG y se seleccionaron las colonias blancas para utilización en experimentos de hibridación en filtro. Los clones recombinantes de *E. coli* que contenían el vector se cribaron luego con las sondas apropiadas marcadas con DIG. Estas sondas se prepararon como sigue. En primer lugar, se realizó una PCR utilizando como molde células de un clon recombinante de *E. coli* que contenían un plásmido que albergaba el fragmento del gen *cry* particular, amplificado previamente utilizando iniciadores apropiados que se muestran en la Tabla II.

TABLA II

Iniciadores utilizados para aislar secuencias nuevas de DNA de *Bt* ($Y = C$ o T , $S = G$ o C)

Cepa	Gen	Iniciador	Longitud del fragmento amplificado	Secuencia iniciadora
2072BG	Tipo <i>cry1B</i>	B.F	922	CAG CGT ATT AAG TCG ATG GA
		B.R		CTG CTT CGA AGG TTG CAG TA

El producto de amplificación resultante se purificó en gel y se utilizó como molde en una reacción PCR secundaria utilizando dNTPs marcados con DIG. Una cantidad apropiada de este producto de amplificación se utilizó en reacciones de hibridación.

La hibridación de colonias para la cepa BtS02072BG se realizó con la sonda de tipo *cry1B*. Después de la identificación de una colonia positiva que contenía un plásmido que albergaba el gen *cry* de longitud total, se determinó la secuencia del gen *cry* utilizando el método de marcación con terminador de tinte y un secuenciador de DNA Perkin Elmer ABI Prism-377 para ambas cadenas. Después de la secuenciación de DNA, el gen tipo *cry1B* de BtS02072BG se designó *cry1Bf*. La secuencia genómica del gen *cry1Bf* aislado, así como la proteína que codifica el mismo, se muestran en el Listado de Secuencias incluido en esta solicitud. La comparación de las secuencias con secuencias conocidas de DNA o proteína *Cry* demostró que las secuencias son nuevas y difieren en un número sustancial de nucleótidos o aminoácidos respecto de los genes y proteínas *Bt* conocidos. La Tabla III proporciona una revisión de la identidad de secuencia con respecto a las regiones codificantes de la mayoría de los genes y proteínas similares (formas tanto de protoxina como de toxina) como se determina utilizando el programa GAP del paquete Wisconsin de GCG (Madison, Wisconsin, EE.UU.), versión 10.0. Se utilizaron los defectos de GCG con el programa GAP. Para comparación de secuencias de ácido nucleico, se utilizó la matriz de registro nwsgapdna, y para la comparación de

ES 2 321 375 T3

secuencias de aminoácidos, la matriz de registro blosum62. La forma de toxina, tal como se utiliza en la Tabla III, hace referencia a la proteína que comienza en el primer aminoácido y termina dos aminoácidos más allá del último aminoácido (usualmente una prolina) del bloque 5 de la secuencia conservada, como se define en Schnepf *et al.* (1998). La forma de protoxina hace referencia a la proteína entera o la región codificante de la proteína/gen *Bt*.

TABLA III

Identities de secuencia para cry1Bf/Cry1Bf

DNA	<i>cry1Ba1</i>	<i>cry1Bb1</i>	<i>cry1Bc1</i>	<i>cry1Bd1</i>	<i>cry1Be1</i>
Protoxina	91.912	83.890	77.207	83.565	93.774
Toxina	86.562	74.922	74.922	75.342	89.220
Proteína	Cry1 Ba1	Cry1 Bb1	Cry1 Bc1	Cry1 Bd1	Cry1 Be1
Protoxina	89.869	80.193	75.795	80.933	92.170
Toxina	82.520	67.868	67.868	70.142	86.499

Clones genómicos del gen recién aislado han sido depositados en la BCCM™-LMBP (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms - Laboratorium voor Moleculaire Biologie-Plasmidencollectie, Universidad de Gante, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gante, Bélgica) bajo el número de acceso siguiente:

LMBP 3986 para *E. coli* XL1-Blue que contiene el plásmido pUC2072BG/1BF1 que comprende el gen *cry1Bf*, depositado el 25 de noviembre de 1999 (este gen puede aislarse de este plásmido en un fragmento de DNA de aproximadamente 7 Kb por escisión con SacI y SalI).

Ejemplo 5

Actividad insecticida del gen cry

La inserción que contenía el gen *cry1Bf* se subclonó en un vector lanzadera adecuado y el plásmido resultante pSL2072BG/1Bf se introdujo por procedimientos rutinarios en una cepa *Bt* cristal-menos. La proteína cristalina producida por un cultivo esporulado de esta cepa *Bt* recombinante se testó sobre larvas de *Sesamia nonagrioides*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* y *O. nubilalis*, a concentraciones diferentes. Se observó una mortalidad alta significativa de la toxina *Cry1Bf* sobre *H. virescens*, *Ostrinia nubilalis* y *Sesamia nonagrioides*, encontrándose en cambio una menor toxicidad sobre *Helicoverpa zea*. Después de tratamiento con la cepa de control cristal-menos, sobrevivían todas las larvas.

Ejemplo 6

Producción de la nueva proteína Cry en plantas transformadas

Genes quiméricos que codifican las formas truncadas de la proteína *Cry1Bf* se producen como se describe en EP 0 193 259 y la Solicitud de Patente PCT publicada WO 94/12264, utilizando los promotores CaMV 35S (Hull y Howell, 1987) y ubiquitina (Christensen *et al.*, 1992). Preferiblemente, el uso de codones del marco de lectura abierto se adapta al de la planta hospedadora a fin de optimizar la eficiencia de expresión, como se describe en la Solicitud de Patente PCT publicada WO 94/12264. Se transforman células de arroz, algodón y maíz con los genes quiméricos resultantes.

Las células de maíz se transforman establemente mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (Ishida *et al.*, 1996, y Patente U.S. No. 5.591.616) o por electroporación utilizando callo embriogénico lesionado y degradado con enzimas, como se describe en WO 92/09696 o la patente US 5.641.664 (incorporada en esta memoria por referencia).

Las células de algodón se transforman establemente mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (Umbeck *et al.*, 1987, *Bio/Technology* 5, 263-266; patente U.S. No. 5.004.863, que se incorpora en esta memoria por referencia).

Las células de arroz se transforman establemente con el método descrito en la Solicitud de Patente PCT publicada WO 92/09696.

Las plantas transformadas y regeneradas de maíz, algodón y arroz se seleccionan por ELISA, transferencia Northern y Southern y efecto insecticida. Las plantas quiméricas de la progenie que contienen el gen exhiben una resistencia incrementada frente a los insectos en comparación con las plantas de control no transformadas con segregación apropiada de resistencia a los insectos y el fenotipo transformado. Las medidas de proteínas y RNA demuestran que la resistencia incrementada a los insectos está asociada con una mayor expresión de la nueva proteína Cry en las plantas.

Referencias citadas

- Adang *et al.* (1985). *Gene* 36, 289,
- Bennetzen & Hall. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3026-3031.
- Berhard, K. and Utz, R., "Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses", In *Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice*, pp. 255-267. eds. Entwistle, P.F.,
- Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S., *John Wiley and Sons, New York* (1993).
- Christensen *et al.* (1992) *Plant mol. Biol* 18,675-689
- Cornejo *et al.* (1993) *Plant Mol Biol.* 23, 567-581
- Crickmore *et al.* (1998) *Microbiol Mol. Biol Rev.* 62(3), 807-13.
- Datta S., Peterhans A., Datta K. and Potrykus I., *Bio/Technology* 8, 738-740 (1990)
- Dulmage, H. T., "Production of Bacteria for Biological Control of Insects" in *Biological Control in Crop Production*, Ed. Papparizas, D.C., *Osrnun Publishers*, Totowa, NJ., USA, pp. 129-141 (1981).
- Finney, Probit Analysis, 3rd Edition, *Cambridge University Press* (1971)
- Franck, Guilley, Jonard, Richards and Hirth, *Cell* 21, 285-294 (1980)
- French, B. T., Maul, H. N. and Maul, G. G., *Anal. Biochem* 156, 417-423 (1986)
- Fromm M., Morrish F., Armstrong C., Williams R., Thomas J. and Klein T., *Bio/Technology* 8, 833-839 (1990).
- Gardner, Howarth, Hahn, Brown-Luedi, Shepard and Messing, *Nucleic Acids Research* 9, 2871-2887 (1981)
- Ge A., Rivers D., Milne R. and Dean D., *J. Biol. Chem.* 266, 17954-17958 (1991)
- Gielen, J., De Beukeleer, M., Seurinck, J., Deboeck, F., De Greve, H., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J., *EMBO J.* 3, 835-845 (1984)
- Gordon-Kamm W., Spencer M., Mangano M., Adams T., Daines R., Start W., O'Brien J., Chambers S., Adams W., Willets N., Rice T., Mackey C., Krueger R., Kausch A. and Lemaux P., *The Plant Cell* 2, 603-618 (1990).
- Gould, J., Devey, M., Hasegawa, O., Ulian, E. G., Peterson, G. and Smith. R. H., *Plant Physiol.* 95, 420-434 (1991).
- Ho *et al.* (1989). *Gene* 77, 51-59.
- Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S., Van Houtven. A., Verbruggen, H. and Vaeck, M., *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2010-2017 (1988)
- Höfte H. and Whiteley H. R., *Microbiological Review* 53, 242-255 (1989).
- Hull and Howell, *Virology* 86, 482-493 (1987).
- Ishida *et al.*, 1996, *Nature Biotechnology* 14, 745-750.

ES 2 321 375 T3

Itakura et al (1977). *Science* 198, 1056-1063.

Jansens et al. (1997) *Crop Science* 37, 1616-1624.

Last et al (1990) *Theor Appl. Genet* 81, 581-588.

Lereclus, D.; Vallade, M.; Chaufaux, J.; Arantes, O. & Rambaud, S., *Bio/Technology* 10, 418 (1992).

Mahillon et al, *FEMS Microbiol. Letters* 60, 205-210 (1989).

Maxam, A. M. and Gilbert, W., *Methods in Enzymol.* 65. 499-560 (1980).

McBride et al., 1995, *Bio/Technology* 13, 362.

Murray, E., Lotzer, J. and Eberle, M., *Nucleic Acids Research* 17(2), 477-498 (1989).

Sanger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 74(12), 5463-5467 (1977).

Schnepf et al. (1985). *Journal of Biological Chemistry* 260, 6264.

Schnepf et al. (1998). *Microbiol Mol. Biol. Rev* 62(3), 775-806.

Shimamoto K., Terada R., Izawa T. and Fujimoto H., *Nature* 338, 274-276 (1989).

Stanssens P. Opsomer C., McKeown Y., Kramer W. Zabeau M. and Fritz H. J., *Nucleic Acids Research* 12, 4441-4454 (1989).

Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean. C , Zabeau, M., Vanderzant, J., *Econ Entomol* 55.p. 140 (1962).

Van Montagu, M. and Leemahs, J., *Nature* 327, 33-37 (1987).

Van Rie et al., *Science* 247, 72 (1990).

Velten, J., Velten, L., Hain, R. and Schell, J., *EMBO J.* 3, 2723-2730 (1984).

Velten, J., and Schell, J. *Nucleic Acids Research* 13, 6981-6998 (1985).

Visser, B., Bosch, D. and Honée, G., “Domain-Structure Studies of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins: A Genetic Approach”, In *Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, pp.71-88.eds. Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S., *John Wiley and Sons*, New York (1993).

Wada et al. (1990). *Nucl. Acids Res.* 18, 2367-1411.

White et al. (1989). *Trends in Genet.* 5, 185-189.

Yannisch-Perron, C., Vierra. J. and Messing, J., *Gene* 33, 103-119 (1985).

Zhang et al. (1991) *The Plant Cell* 3, 1155-1165.

REIVINDICACIONES

1. Un DNA que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del fragmento insecticida de digestión con tripsina de la proteína codificada por el gen *cry1Bf* depositado en la BCCM-LMBP bajo el número de acceso LMBP 3986.
2. Un DNA que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento insecticida de la proteína de SEQ ID No. 2.
3. El DNA de la reivindicación 2, que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 desde el aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 640.
4. El DNA de la reivindicación 3, que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2.
5. El DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende la secuencia de DNA de SEQ ID No. 1.
6. El DNA de la reivindicación 5, que comprende una secuencia artificial de DNA que tiene un uso de codones diferente comparada con la secuencia de DNA existente naturalmente, pero que codifica la misma proteína o su fragmento insecticida.
7. El DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una secuencia artificial de DNA que tiene un uso de codones diferente comparada con la secuencia de DNA existente naturalmente, pero que codifica la misma proteína o el fragmento insecticida de la misma.
8. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos del fragmento insecticida de digestión con tripsina de la proteína codificada por el gen *cry1Bf* depositado en la BCCM-LMBP bajo el número de acceso LMBP 3986.
9. Una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de un fragmento insecticida de la proteína de SEQ ID No. 2.
10. La proteína de la reivindicación 9, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2 desde el aminoácido de la posición 1 al aminoácido de la posición 640.
11. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2.
12. Un gen quimérico que comprende el DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 bajo el control de un promotor expresable en plantas.
13. Una célula vegetal transformada que contiene el gen quimérico de la reivindicación 12.
14. Una planta o una semilla, que comprende el gen quimérico de la reivindicación 12 integrado en sus células.
15. La planta o semilla, que comprende el gen quimérico de la reivindicación 12 integrado en el DNA nuclear o de los cloroplastos de sus células.
16. La planta o semilla de la reivindicación 14, que se selecciona del grupo constituido por: maíz, algodón, arroz, colza oleaginosa, especies de Crucíferas, berenjena, soja, patata, girasol, tomate, caña de azúcar, té, habichuelas, tabaco, fresa, trébol, pepino, sandía, pimiento, avena, cebada, trigo, dalia, gladiolo, crisantemo, remolacha azucarera, sorgo, alfalfa, y cacahuete.
17. Un microorganismo transformado que contiene el DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
18. El microorganismo de la reivindicación 17, que se selecciona del género *Agrobacterium*, *Escherichia*, o *Bacillus*.
19. Un proceso para reprimir los insectos, que comprende expresar el DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una célula hospedadora, y poner en contacto los insectos con dichas células hospedadoras.
20. Un proceso para obtener una planta con resistencia a los insectos, que comprende transformar células de la planta con el DNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o con el gen quimérico de la reivindicación 12, y regenerar plantas transformadas a partir de dichas células que son resistentes a los insectos.
21. El proceso de la reivindicación 20, que comprende adicionalmente obtener semillas a partir de dichas plantas que comprenden dicho DNA.

ES 2 321 375 T3

22. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el cual dicho insecto se selecciona de: *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea*, *O. nubilalis*, o *Sesamia nonagrioides*.

23. El proceso de la reivindicación 22, en el cual dicho insecto es *Sesamia nonagrioides*.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 321 375 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Bayes Bio-Science N. V.

5 <120> Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*.

<130> NEWBTSWO

10 <140>

<141>

<150> 60/173387

15 <151> 1999-12-28

<160> 5

20 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3687

25 <212> DNA

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

30 <221> CDS

<222> (1)..(3687)

35 <400> 1

	ttg act tca aat agg aaa aat gag aat gaa att ata aat gct tta tcg	48
40	Leu Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser	
	1 5 10 15	
	att cca gct gta tcg aat cat tcc aca caa atg gat cta tca cca gat	96
45	Ile Pro Ala Val Ser Asn His Ser Thr Gln Met Asp Leu Ser Pro Asp	
	20 25 30	
	gct cgt att gag gat tct ttg tgt ata gcc gag ggg aat aat atc aat	144
50	Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Ile Ala Glu Gly Asn Asn Ile Asn	
	35 40 45	
	cca ctt gtt agc gca tca aca gtc caa acg ggt att aac ata gct ggt	192
55	Pro Leu Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala Gly	
	50 55 60	
	aga ata cta ggt gta tta ggc gta ccg ttt gct gga caa ata gct agt	240
60	Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Ile Ala Ser	
	65 70 75 80	

65

ES 2 321 375 T3

5	ttt tat agt ttt ctt gtt ggt gaa tta tgg ccc cgc ggc aga gat cag	288
	Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Arg Gly Arg Asp Gln	
	85 90 95	
10	tgg gaa att ttc cta gaa cat gtc gaa caa ctt ata aat caa caa ata	336
	Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Ile Asn Gln Gln Ile	
	100 105 110	
15	aca gaa aat gct agg aat acg gca ctt gct cga tta caa ggt tta gga	384
	Thr Glu Asn Ala Arg Asn Thr Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Leu Gly	
	115 120 125	
20	gat tcc ttt aga gcc tat caa cag tca ctt gaa gat tgg cta gaa aac	432
	Asp Ser Phe Arg Ala Tyr Gln Gln Ser Leu Glu Asp Trp Leu Glu Asn	
	130 135 140	
25	cgt gat gat gca aga acg aga agt gtt ctt tat acc caa tat ata gcc	480
	Arg Asp Asp Ala Arg Thr Arg Ser Val Leu Tyr Thr Gln Tyr Ile Ala	
	145 150 155 160	
30	tta gaa ctt gat ttt ctt aat gcg atg ccg ctt ttc gca att aga aac	528
	Leu Glu Leu Asp Phe Leu Asn Ala Met Pro Leu Phe Ala Ile Arg Asn	
	165 170 175	
35	caa gaa gtt cca tta tta atg gta tat gct caa gct gca aat tta cac	576
	Gln Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His	
	180 185 190	
40	cta tta tta ttg aga gat gcc tct ctt ttt ggt agt gaa ttt ggg ctt	624
	Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Phe Gly Leu	
	195 200 205	
45	aca tcg cag gaa att caa cgt tat tat gag cgc caa gtg gaa caa acg	672
	Thr Ser Gln Glu Ile Gln Arg Tyr Tyr Glu Arg Gln Val Glu Gln Thr	
	210 215 220	
50	aga gat tat tcc gac tat tgc gta gaa tgg tat aat aca ggt cta aat	720
	Arg Asp Tyr Ser Asp Tyr Cys Val Glu Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn	
	225 230 235 240	
55	agc ttg aga ggg aca aat gcc gca agt tgg gtg cgt tat aat caa ttc	768
	Ser Leu Arg Gly Thr Asn Ala Ala Ser Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe	
	245 250 255	
60	cgt aga gat cta acg tta ggg gta tta gat cta gtg gca cta ttc cca	816
	Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro	
	260 265 270	
65		

ES 2 321 375 T3

agc tat gac act cgc act tat cca ata aat acg agt gct cag tta aca 864
 Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr
 275 280 285

agg gaa gtt tat aca gac gca att gga gca aca ggg gta aat atg gca 912
 Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly Ala Thr Gly Val Asn Met Ala
 290 295 300

agt atg aat tgg tat aat aat aat gca cct tcg ttt tcc gct ata gag 960
 Ser Met Asn Trp Tyr Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala Ile Glu
 305 310 315 320

act gcg gtt atc cga agc ccg cat cta ctt gat ttt cta gaa caa ctt 1008
 Thr Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu Leu Asp Phe Leu Glu Gln Leu
 325 330 335

aca att ttt agc act tca tca cga tgg agt gct act agg cat atg act 1056
 Thr Ile Phe Ser Thr Ser Ser Arg Trp Ser Ala Thr Arg His Met Thr
 340 345 350

tac tgg cgg ggg cac aca att caa tct cgg cca ata gga ggc gga tta 1104
 Tyr Trp Arg Gly His Thr Ile Gln Ser Arg Pro Ile Gly Gly Gly Leu
 355 360 365

aat acc tca acg cat ggg tct acc aat act tct att aat cct gta aga 1152
 Asn Thr Ser Thr His Gly Ser Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro Val Arg
 370 375 380

tta tca ttc ttc tct cga gac gta tat tgg act gaa tca tat gca gga 1200
 Leu Ser Phe Phe Ser Arg Asp Val Tyr Trp Thr Glu Ser Tyr Ala Gly
 385 390 395 400

gtg ctt cta tgg gga att tac ctt gaa cct att cat ggt gtc cct act 1248
 Val Leu Leu Trp Gly Ile Tyr Leu Glu Pro Ile His Gly Val Pro Thr
 405 410 415

gtt aga ttt aat ttt agg aac cct cag aat act ttt gaa aga ggt act 1296
 Val Arg Phe Asn Phe Arg Asn Pro Gln Asn Thr Phe Glu Arg Gly Thr
 420 425 430

gct aac tat agt caa ccc tat gag tca cct ggg ctt caa tta aaa gat 1344
 Ala Asn Tyr Ser Gln Pro Tyr Glu Ser Pro Gly Leu Gln Leu Lys Asp
 435 440 445

tca gaa act gaa tta cca cca gaa aca aca gaa cga cca aat tat gaa 1392
 Ser Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu
 450 455 460

ES 2 321 375 T3

tca tat agt cat agg tta tct cac ata ggg ctc att tca caa tct agg 1440
 Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ser Gln Ser Arg
 465 470 475 480

gtg cat gta cca gta tat tct tgg acg cac cgt agt gca gat cgt aca 1488
 Val His Val Pro Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr
 485 490 495

aat acc att agt tca gat agc ata aca caa ata cca ttg gta aaa tca 1536
 Asn Thr Ile Ser Ser Asp Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ser
 500 505 510

ttc aac ctt aat tca ggt acc tct gta gtc agt ggc cca gga ttt aca 1584
 Phe Asn Leu Asn Ser Gly Thr Ser Val Val Ser Gly Pro Gly Phe Thr
 515 520 525

gga ggg gat ata atc cga act aac gtt aat ggt agt gta cta agt atg 1632
 Gly Gly Asp Ile Ile Arg Thr Asn Val Asn Gly Ser Val Leu Ser Met
 530 535 540

ggt ctt aat ttt aat aat aca tca tta cag cgg tat cgc gtg aga gtt 1680
 Gly Leu Asn Phe Asn Asn Thr Ser Leu Gln Arg Tyr Arg Val Arg Val
 545 550 555 560

cgt tat gct gct tct caa aca atg gtc ctg agg gta act gtc gga ggg 1728
 Arg Tyr Ala Ala Ser Gln Thr Met Val Leu Arg Val Thr Val Gly Gly
 565 570 575

agt act act ttt gat caa gga ttc cct agt act atg agt gca aat gag 1776
 Ser Thr Thr Phe Asp Gln Gly Phe Pro Ser Thr Met Ser Ala Asn Glu
 580 585 590

tct ttg aca tct caa tca ttt aga ttt gca gaa ttt cct gta ggt att 1824
 Ser Leu Thr Ser Gln Ser Phe Arg Phe Ala Glu Phe Pro Val Gly Ile
 595 600 605

agt gca tct ggc agt caa act gct gga ata agt ata agt aat aat gca 1872
 Ser Ala Ser Gly Ser Gln Thr Ala Gly Ile Ser Ile Ser Asn Asn Ala
 610 615 620

ggt aga caa acg ttt cac ttt gat aaa att gaa ttc att cca att act 1920
 Gly Arg Gln Thr Phe His Phe Asp Lys Ile Glu Phe Ile Pro Ile Thr
 625 630 635 640

gca acc ttc gaa gca gaa tac gat tta gaa agg gcg caa gag gcg gtg 1968
 Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Glu Ala Val
 645 650 655

ES 2 321 375 T3

5	aat gct ctg ttt act aat acg aat cca aga aga ttg aaa aca gat gtg Asn Ala Leu Phe Thr Asn Thr Asn Pro Arg Arg Leu Lys Thr Asp Val 660 665 670	2016
10	aca gat tat cat att gat caa gta tcc aat tta gtg gcg tgt tta tcg Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Ala Cys Leu Ser 675 680 685	2064
15	gat gaa ttc tgc tta gat gaa aag aga gaa tta ctt gag aaa gtg aaa Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Glu Lys Val Lys 690 695 700	2112
20	tat gcg aaa cga ctc agt gat gaa aga aac tta ctc caa gat cca aac Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn 705 710 715 720	2160
25	ttc aca tcc atc aat aag caa cca gac ttc ata tct act aat gag caa Phe Thr Ser Ile Asn Lys Gln Pro Asp Phe Ile Ser Thr Asn Glu Gln 725 730 735	2208
30	tcg aat ttc aca tct atc cat gaa caa tct gaa cat gga tgg tgg gga Ser Asn Phe Thr Ser Ile His Glu Gln Ser Glu His Gly Trp Trp Gly 740 745 750	2256
35	agt gag aac att aca atc cag gaa gga aat gac gta ttt aaa gag aat Ser Glu Asn Ile Thr Ile Gln Glu Gly Asn Asp Val Phe Lys Glu Asn 755 760 765	2304
40	tac gtc aca cta ccg ggg act ttt aat gag tgt tat ccg acg tat tta Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asn Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu 770 775 780	2352
45	tat caa aaa ata gga gag tcg gaa tta aaa gct tat act cgc tac caa Tyr Gln Lys Ile Gly Glu Ser Glu Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln 785 790 795 800	2400
50	tta aga ggg tat att gaa gat agt caa gat tta gag ata tat ttg att Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile 805 810 815	2448
55	cgt tat aat gcg aaa cat gaa aca ttg gat gtt cca ggt acc gag tcc Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Leu Asp Val Pro Gly Thr Glu Ser 820 825 830	2496
60	gta tgg ccg ctt tca gtt gaa agc cca atc gga agg tgc gga gaa ccg Val Trp Pro Leu Ser Val Glu Ser Pro Ile Gly Arg Cys Gly Glu Pro 835 840 845	2544

ES 2 321 375 T3

aat cga tgc gca cca cat ttt gaa tgg aat cct gat cta gat tgt tcc 2592
 Asn Arg Cys Ala Pro His Phe Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser
 850 855 860

5

tgc aga gat gga gaa aaa tgt gcg cat cat tcc cat cat ttc tct ttg 2640
 Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu
 865 870 875 880

10

gat att gat att gga tgc aca gac ttg cat gag aat cta ggc gtg tgg 2688
 Asp Ile Asp Ile Gly Cys Thr Asp Leu His Glu Asn Leu Gly Val Trp
 885 890 895

15

gtg gta ttc aag att aag acg cag gaa ggt cat gca aga cta ggg aat 2736
 Val Val Phe Lys Ile Lys Thr Gln Glu Gly His Ala Arg Leu Gly Asn
 900 905 910

20

ctg gaa ttt att gaa gag aaa cca tta tta gga gaa gca ctg tct cgt 2784
 Leu Glu Phe Ile Glu Glu Lys Pro Leu Leu Gly Glu Ala Leu Ser Arg
 915 920 925

25

gtg aag aga gca gag aaa aaa tgg aga gac aaa cgt gaa aaa cta caa 2832
 Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Gln
 930 935 940

30

ttg gaa aca aaa cga gta tat aca gag gca aaa gaa gct gtg gat gct 2880
 Leu Glu Thr Lys Arg Val Tyr Thr Glu Ala Lys Glu Ala Val Asp Ala
 945 950 955 960

35

tta ttt gta gat tct caa tat aat aga tta caa gcg gat aca aac att 2928
 Leu Phe Val Asp Ser Gln Tyr Asn Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile
 965 970 975

40

ggc atg att cat gcg gca gat aaa ctt gtt cat cga att cga gag gct 2976
 Gly Met Ile His Ala Ala Asp Lys Leu Val His Arg Ile Arg Glu Ala
 980 985 990

45

tat ctg tca gaa tta tct gtt atc ccg ggt gta aat gcg gaa att ttt 3024
 Tyr Leu Ser Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Glu Ile Phe
 995 1000 1005

50

gaa gaa tta gaa ggt cgc att atc act gca atc tcc cta tac gat gcg 3072
 Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Ile Thr Ala Ile Ser Leu Tyr Asp Ala
 1010 1015 1020

55

aga aat gtc gtt aaa aat ggt gat ttt aat aat gga tta gca tgc tgg 3120
 Arg Asn Val Val Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ala Cys Trp
 1025 1030 1035 1040

60

65

ES 2 321 375 T3

aat gta aaa ggg cat gta gat gta caa cag agc cat cac cgt tct gtc 3168
 Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Gln Gln Ser His His Arg Ser Val
 1045 1050 1055
 5
 ctt gtt atc cca gaa tgg gaa gca gaa gtg tca caa gca gtt cgc gtc 3216
 Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Ala Val Arg Val
 1060 1065 1070
 10
 tgt ccg ggg cgt ggc tat atc ctc cgt gtc aca gcg tac aaa gag gga 3264
 Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly
 1075 1080 1085
 15
 tat gga gag ggt tgt gta acg atc cat gaa atc gag aac aat aca gac 3312
 Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp
 1090 1095 1100
 20
 gaa cta aaa ttt aaa aac tgt gaa gaa gag gaa gtg tat cca acg gat 3360
 Glu Leu Lys Phe Lys Asn Cys Glu Glu Glu Glu Val Tyr Pro Thr Asp
 1105 1110 1115 1120
 25
 aca gga acg tgt aat gat tat act gca cac caa ggt aca gca gta tgt 3408
 Thr Gly Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala His Gln Gly Thr Ala Val Cys
 1125 1130 1135
 30
 aat tcc cgt aat gct gga tat gag gat gca tat gaa gtt gat act aca 3456
 Asn Ser Arg Asn Ala Gly Tyr Glu Asp Ala Tyr Glu Val Asp Thr Thr
 1140 1145 1150
 35
 gca tct gtt aat tac aaa ccg act tat gaa gaa gaa acg tat aca gat 3504
 Ala Ser Val Asn Tyr Lys Pro Thr Tyr Glu Glu Glu Thr Tyr Thr Asp
 1155 1160 1165
 40
 gta cga aga gat aat cat tgt gaa tat gac aga ggg tat gtg aat tat 3552
 Val Arg Arg Asp Asn His Cys Glu Tyr Asp Arg Gly Tyr Val Asn Tyr
 1170 1175 1180
 45
 cca cca cta cca gct ggt tat atg aca aaa gaa tta gaa tac ttc cca 3600
 Pro Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Met Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro
 1185 1190 1195 1200
 50
 gaa acc gat aag gta tgg att gag att gga gaa acg gaa ggg aag ttt 3648
 Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Lys Phe
 1205 1210 1215
 55
 att gta gac agc gtg gaa tta ctc ctt atg gag gaa tag 3687
 Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1220 1225
 60
 <210> 2
 <211> 1228
 <212> PRT
 65 <213> *Bacillus thuringiensis*

ES 2 321 375 T3

<400> 2

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

ES 2 321 375 T3

	Arg Asp Tyr Ser Asp Tyr Cys Val Glu Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn	
	225	235 240
5	Ser Leu Arg Gly Thr Asn Ala Ala Ser Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe	
	245	250 255
10	Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro	
	260	265 270
15	Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr	
	275	280 285
	Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly Ala Thr Gly Val Asn Met Ala	
	290	295 300
20	Ser Met Asn Trp Tyr Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala Ile Glu	
	305	310 315 320
25	Thr Ala Val Ile Arg Ser Pro His Leu Leu Asp Phe Leu Glu Gln Leu	
	325	330 335
30	Thr Ile Phe Ser Thr Ser Ser Arg Trp Ser Ala Thr Arg His Met Thr	
	340	345 350
	Tyr Trp Arg Gly His Thr Ile Gln Ser Arg Pro Ile Gly Gly Gly Leu	
	355	360 365
35	Asn Thr Ser Thr His Gly Ser Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro Val Arg	
	370	375 380
40	Leu Ser Phe Phe Ser Arg Asp Val Tyr Trp Thr Glu Ser Tyr Ala Gly	
	385	390 395 400
45	Val Leu Leu Trp Gly Ile Tyr Leu Glu Pro Ile His Gly Val Pro Thr	
	405	410 415
	Val Arg Phe Asn Phe Arg Asn Pro Gln Asn Thr Phe Glu Arg Gly Thr	
	420	425 430
50	Ala Asn Tyr Ser Gln Pro Tyr Glu Ser Pro Gly Leu Gln Leu Lys Asp	
	435	440 445
55	Ser Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu	
	450	455 460
60	Ser Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ser Gln Ser Arg	
	465	470 475 480

ES 2 321 375 T3

	Val His Val Pro Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr	
	485	490 495
5	Asn Thr Ile Ser Ser Asp Ser Ile Thr Gln Ile Pro Leu Val Lys Ser	
	500	505 510
10	Phe Asn Leu Asn Ser Gly Thr Ser Val Val Ser Gly Pro Gly Phe Thr	
	515	520 525
15	Gly Gly Asp Ile Ile Arg Thr Asn Val Asn Gly Ser Val Leu Ser Met	
	530	535 540
	Gly Leu Asn Phe Asn Asn Thr Ser Leu Gln Arg Tyr Arg Val Arg Val	
	545	550 555 560
20	Arg Tyr Ala Ala Ser Gln Thr Met Val Leu Arg Val Thr Val Gly Gly	
	565	570 575
25	Ser Thr Thr Phe Asp Gln Gly Phe Pro Ser Thr Met Ser Ala Asn Glu	
	580	585 590
30	Ser Leu Thr Ser Gln Ser Phe Arg Phe Ala Glu Phe Pro Val Gly Ile	
	595	600 605
	Ser Ala Ser Gly Ser Gln Thr Ala Gly Ile Ser Ile Ser Asn Asn Ala	
	610	615 620
35	Gly Arg Gln Thr Phe His Phe Asp Lys Ile Glu Phe Ile Pro Ile Thr	
	625	630 635 640
40	Ala Thr Phe Glu Ala Glu Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Glu Ala Val	
	645	650 655
45	Asn Ala Leu Phe Thr Asn Thr Asn Pro Arg Arg Leu Lys Thr Asp Val	
	660	665 670
	Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Ala Cys Leu Ser	
	675	680 685
50	Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Leu Glu Lys Val Lys	
	690	695 700
55	Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn	
	705	710 715 720
60	Phe Thr Ser Ile Asn Lys Gln Pro Asp Phe Ile Ser Thr Asn Glu Gln	
	725	730 735

ES 2 321 375 T3

	Ser Asn Phe Thr Ser Ile His Glu Gln Ser Glu His Gly Trp Trp Gly	
	740	745 750
5	Ser Glu Asn Ile Thr Ile Gln Glu Gly Asn Asp Val Phe Lys Glu Asn	
	755	760 765
10	Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asn Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu	
	770	775 780
15	Tyr Gln Lys Ile Gly Glu Ser Glu Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln	
	785	790 795 800
	Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile	
	805	810 815
20	Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Leu Asp Val Pro Gly Thr Glu Ser	
	820	825 830
25	Val Trp Pro Leu Ser Val Glu Ser Pro Ile Gly Arg Cys Gly Glu Pro	
	835	840 845
30	Asn Arg Cys Ala Pro His Phe Glu Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys Ser	
	850	855 860
	Cys Arg Asp Gly Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Ser Leu	
	865	870 875 880
35	Asp Ile Asp Ile Gly Cys Thr Asp Leu His Glu Asn Leu Gly Val Trp	
	885	890 895
40	Val Val Phe Lys Ile Lys Thr Gln Glu Gly His Ala Arg Leu Gly Asn	
	900	905 910
45	Leu Glu Phe Ile Glu Glu Lys Pro Leu Leu Gly Glu Ala Leu Ser Arg	
	915	920 925
	Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu Gln	
	930	935 940
50	Leu Glu Thr Lys Arg Val Tyr Thr Glu Ala Lys Glu Ala Val Asp Ala	
	945	950 955 960
55	Leu Phe Val Asp Ser Gln Tyr Asn Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn Ile	
	965	970 975
60	Gly Met Ile His Ala Ala Asp Lys Leu Val His Arg Ile Arg Glu Ala	
	980	985 990

65

ES 2 321 375 T3

	Tyr Leu Ser Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Glu Ile Phe	
	995	1000 1005
5	Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Ile Thr Ala Ile Ser Leu Tyr Asp Ala	
	1010	1015 1020
10	Arg Asn Val Val Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ala Cys Trp	
	025	1030 1035 1040
15	Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Gln Gln Ser His His Arg Ser Val	
	1045	1050 1055
20	Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Ala Val Arg Val	
	1060	1065 1070
25	Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly	
	1075	1080 1085
30	Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp	
	1090	1095 1100
35	Glu Leu Lys Phe Lys Asn Cys Glu Glu Glu Glu Val Tyr Pro Thr Asp	
	1105	1110 1115 1120
40	Thr Gly Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala His Gln Gly Thr Ala Val Cys	
	1125	1130 1135
45	Asn Ser Arg Asn Ala Gly Tyr Glu Asp Ala Tyr Glu Val Asp Thr Thr	
	1140	1145 1150
50	Ala Ser Val Asn Tyr Lys Pro Thr Tyr Glu Glu Glu Thr Tyr Thr Asp	
	1155	1160 1165
55	Val Arg Arg Asp Asn His Cys Glu Tyr Asp Arg Gly Tyr Val Asn Tyr	
	1170	1175 1180
60	Pro Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Met Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro	
	1185	1190 1195 1200
65	Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Lys Phe	
	1205	1210 1215
	Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu	
	1220	1225