

*Fig. 4*

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
1 April 2010 (01.04.2010)

(10) International Publication Number  
**WO 2010/037082 A3**

- (51) International Patent Classification:  
*D04B 21/14* (2006.01)     *D03D 11/00* (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2009/058716
- (22) International Filing Date:  
29 September 2009 (29.09.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
61/101,049 29 September 2008 (29.09.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **SHEEX LLC** [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **WALVIUS, Susan, Katherine** [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US). **MARCINIAK, Michelle, Marie** [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US).
- (74) Agent: **SCHNEIDER, Ryan, A.**; Troutman Sanders LLP, Bank of America Plaza, 600 Peachtree Street, N.E., Suite 5200, Atlanta, GA 30308-2216 (US).

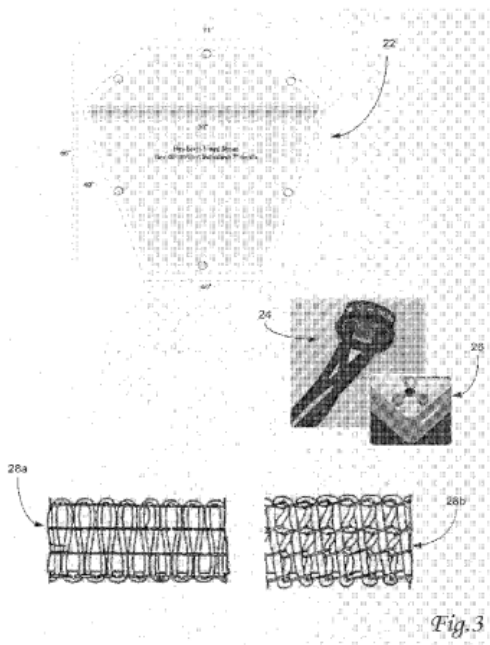
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,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

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

- Published:
- with international search report (Art. 21(3))
  - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

[Continued on next page]

(54) Title: FABRIC SYSTEM



(57) Abstract: Bedding material including a first fabric section manufactured from performance fabric and having a first and second side; and, a second fabric section attached to the first side of the first fabric section. Additionally, a third fabric section can be attached to the second side of the first fabric section. The first fabric section can be attached to the second fabric section through a flatlock stitch. The first fabric section can include a first zone and a second zone wherein the first zone contains different performance properties from the second zone and the first zone can have thermal or moisture wicking properties.



WO 2010/037082 A3

(88) Date of publication of the international search report:  
8 July 2010

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****D04B 21/14(2006.01)i, D03D 11/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

D04B 21/14; A47G 9/00; A47G 9/02; A61G 7/05; B32B 5/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models  
Japanese utility models and applications for utility models  
(Chinese Patents and application for patent)Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
eKOMPASS(KIPO internal)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-309183 A (MORIUCHI KYU KK) 09 November 1999 See paragraphs [0001] and [0010]-[0013]	1-17
X	US 6381779 B1 (THOMPSON; THOMAS L.) 07 May 2002 See claim 1 and figures 4-6	1
A	US 5817391 A1 (ROCK; MOSHE et al.) 06 October 1998 See column 1, line 66 - column 3, line 19	1-17
A	US 5765241 A1 (MACDONALD; ROBERT) 16 June 1998 See the whole document	1-17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 APRIL 2010 (28.04.2010)

Date of mailing of the international search report

**29 APRIL 2010 (29.04.2010)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-  
gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

KIM, Jong Kyoo

Telephone No. 82-42-481-5593



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2009/058716**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 11-309183 A	09.11.1999	None	
US 6381779 B1	07.05.2002	US 6678906 B1 WO 0309-2452A1	20.01.2004 13.11.2003
US 5817391 A1	06.10.1998	None	
US 5765241 A1	16.06.1998	AU 1997-12445 B2 EP 0787451 A2 EP 0787451 A3 EP 0787451 B1 GB 2309638 A	27.05.1999 06.08.1997 13.10.1999 04.06.2003 06.08.1997

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
1 April 2010 (01.04.2010)

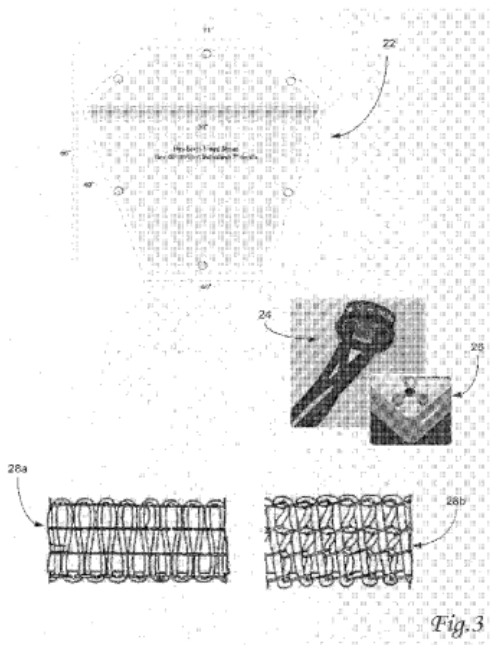
(10) International Publication Number  
**WO 2010/037082 A2**

- (51) International Patent Classification:  
*D04B 21/14* (2006.01)     *D03D 11/00* (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2009/058716
- (22) International Filing Date:  
29 September 2009 (29.09.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
61/101,049 29 September 2008 (29.09.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **SHEEX LLC** [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **WALVIUS, Susan, Katherine** [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US). **MARCINIAK, Michelle, Marie** [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US).
- (74) Agent: **SCHNEIDER, Ryan, A.**; Troutman Sanders LLP, Bank of America Plaza, 600 Peachtree Street, N.E., Suite 5200, Atlanta, GA 30308-2216 (US).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Published:**  
— without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))

(54) Title: FABRIC SYSTEM



(57) Abstract: Bedding material including a first fabric section manufactured from performance fabric and having a first and second side; and, a second fabric section attached to the first side of the first fabric section. Additionally, a third fabric section can be attached to the second side of the first fabric section. The first fabric section can be attached to the second fabric section through a flatlock stitch. The first fabric section can include a first zone and a second zone wherein the first zone contains different performance properties from the second zone and the first zone can have thermal or moisture wicking properties.

WO 2010/037082 A2

## FABRIC SYSTEM

### BACKGROUND OF THE INVENTION

#### 1. Field of the Invention

The present invention relates generally to fabric systems, and more specifically to bed coverings constructed of high gauge circular knitted fabrics that accommodate and maintain optimum thermal conditions for sleep, which in turn can lead to faster sleep initiation and deeper, more restorative sleep.

#### 2. Description of Related Art

Sleep problems in the United States are remarkably widespread, affecting roughly three out of four American adults, according to research by the National Sleep Foundation (NSF). Consequently, a great deal of attention has been paid to the circumstances surrounding poor sleep, along with strategies for how to improve it.

The implications are not merely academic. Sleep – not only the right amount of it but also the right quality – impacts not just day-to-day performance, but also “the overall quality of our lives,” according to the NSF. Addressing the causes of poor quality sleep, therefore, has ramifications for millions.

Though many factors contribute to sleep quality, the sleep environment itself plays a critical role, and sleep researchers routinely highlight temperature as one of the most important components in creating an environment for optimal sleep. As advised by the University of Maryland Medical Center, “a cool (not cold) bedroom is often the most conducive to sleep.” The National Sleep Foundation further notes that “temperatures above 75 degrees Fahrenheit and below 54 degrees will disrupt sleep,” with 65 degrees being the ideal sleep temperature for most individuals, according to the NSF.

A lower environmental temperature is not the only thermal factor associated with improved sleep. Researchers have noted a nightly drop in body temperature among healthy, normal adults during sleep. This natural cycle, when inhibited or not functioning properly, can disrupt sleep and delay sleep onset, according to medical researchers at Cornell University. Conversely, the researchers noted, a rapid decline in body temperature not only accelerates sleep onset but also “may facilitate an entry into the deeper stages of sleep.”

Therefore, maintaining an appropriately cool sleep environment and accommodating the body's natural tendency to cool itself at night should be a top priority for individuals interested in optimizing their sleep quality. Performance fabrics crafted into bedding applications would be uniquely capable of promoting cool, comfortable – and therefore better – sleep, as these advanced fabrics maximize breathability and heat transfer. Performance fabrics are made for a variety of end-use applications, and can provide multiple functional qualities, such as moisture management, UV protection, anti-microbial, thermo-regulation, and wind/water resistance.

There has been a long felt need in several industries to provide improved bedding to help individuals get better sleep. Such improved bedding would include beneficial wicking among other properties. For example, in marine, boating and recreational vehicle applications, bedding should resist moisture, fit odd-shaped mattresses and beds, and reduce mildew. Particularly with watercraft, there is a need to protect bedding, and specifically sheets, from moisture and mildew accumulation.

An additional problem with bedding, not just with marine and recreational vehicles, is the sticky, wet feeling that can occur when the bedding sheets are wet due to body sweat, environmental moisture, or other bodily fluids. In particular, when bedding is used during hot weather, or is continuously used for a long time by a person suffering from an illness, problems can arise in that the conventional bed sheet of cotton fiber or the like cannot sufficiently absorb the moisture. All of these issues lead to poor sleep.

To date, performance fabric bedding products are not known. There are width limitations in the manufacturing of high gauge circular knit fabrics, because the finished width of bedding fabrics are dictated by the machine used in its construction. At present, performance fabrics are manufactured with a maximum width of under 90 inches wide, given present manufacturing and technical limitations, along with the inability of alternate manufacturing processes to produce a fabric with identical performance attributes. Yet, normal bed sheet panels can be 102 by 91 inches or larger. Thus, performance fabrics cannot yet be used for bed sheets.

Some conventional solutions for the above issues that hinder a good night's sleep include United States Patent 4,648,186, which discloses an absorbent wood pulp cellulose fiber that is provided in a variety of sizes and is placed under a mattress. The wood pulp is water absorbent and acts to capture moisture to prevent such moisture from being retained by the bedding or the



bedding sheets. However, this proposed solution does not interact with the bedding or the bedding sheets, but merely acts as a sponge for moisture that is in proximity to the target bedding.

United States Patent 5,092,088 discloses a sheet-like mat comprised of a mat cover, the inside of which is divided into a plurality of bag-like spaces, and a drying agent packed into a bag and contained in the bag-like spaces in such a manner that the drying agent cannot fall out of the bag-like spaces. A magnesium sulfate, a high polymer absorbent, a silica gel or the like can be used as the drying agent. As can be seen, this proposed solution to moisture in bedding is cumbersome and chemically-based.

In the athletic apparel industry, moisture wicking fabric has been used to construct athletic apparel. For example, United States Patent 5,636,380 discloses a base fabric of CoolmaxQ high moisture evaporation fabric having one or more insulating panels of ThermaxB or ThermastatQ hollow core fiber fabric having moisture wicking capability and applied to the inner side of the garment for skin contact at selected areas of the body where muscle protection is desired. However, this application cannot be applied to bedding sheets due to the limitations of the size of the performance fabrics manufactured. Further, performance fabric such as this type cannot be easily stitched together as the denier is so fine that stitching this fabric results in the stitching simply falling apart.

Circular knitting is typically used for athletic apparel. The process includes circularly knitting yarns into fabrics. Circular knitting is a form of weft knitting where the knitting needles are organized into a circular knitting bed. A cylinder rotates and interacts with a cam to move the needles reciprocally for knitting action. The yarns to be knitted are fed from packages to a carrier plate that directs the yarn strands to the needles. The circular fabric emerges from the knitting needles in a tubular form through the center of the cylinder. This process is described in United States Patent 7,117,695. However, the machinery presently available for this method of manufacture can only produce a fabric with a maximum width of approximately 90 inches. Therefore, this process has not been known to manufacture sheets, since sheets can have dimensions of 91 inches by 102 inches or greater.

Further, the machinery that is used for bedding is very different than for athletic wear. For example, bedding manufacturing equipment is not equipped to sew flatlock stitching or to provide circular knitting. Bed sheets typically are knit using a process known as warp knitting, a

process capable of producing finished fabrics in the widths required for bedding. This method, however, cannot be employed to produce high-quality performance fabrics. Warp knitting is not capable of reproducing these fabrics' fine tactile qualities nor their omni-direction stretch properties, for example.

Circular knitting must be employed to produce a performance fabric that retains these fabric's full range of benefits and advantages. However, in order to produce a fabric of the proper width for bedding applications, a circular knit machine of at least 48 inches in diameter would be necessary. Manufacturing limitations therefore preclude the construction of performance fabrics at proper widths for bedding. The industry is unsure if it could actually knit and then finish performance fabrics at these large sizes, even if the machinery were readily available.

Further, athletic sewing factories are typically not equipped to sew and handle large pieces of fabrics so that equipment limitations do not allow for the manufacture of bedding sheets.

What is needed, therefore, is a bedding system that utilizes performance fabrics and their beneficial properties, the design of which acknowledges and addresses limitations in the manufacture of these fabrics. It is to such a system that the present invention is primarily directed.

### **BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION**

Briefly described, in preferred form, the present invention is a high gauge circular knit fabric for use in bedding, and a method for manufacturing such bedding. The bedding fabric has superior performance properties, while allowing for manufacture by machinery presently available and in use. In order to achieve a finished width of the size needed to create sheet-sized performance fabric, a high gauge circular knit machine of at least 48 inches in diameter is necessary. And while warp knitting machines are available that can produce wider fabrics, this method will not provide a fabric with the tactile qualities required, nor provide a fabric with omni-directional stretch.

In an exemplary embodiment, the present invention is a method of making a finished fabric comprising at least two discrete performance fabric portions, and joining at least two

discrete performance fabric portions to form the finished fabric. Forming the at least two discrete performance fabric portions can comprise knitting at least two discrete performance fabric portions, and more preferably, circular knitting at least two discrete performance fabric portions. Joining the at least two discrete performance fabric portions to form the finished fabric can comprise stitching at least two discrete performance fabric portions together to form the finished fabric.

The at least two discrete performance fabric portions can have different fabric characteristics. Fabric characteristics as used herein include, among other things, moisture management, UV protection, anti-microbial, thermo-regulation, wind resistance and water resistance.

The finished fabric can be used in, among other applications, residential settings, or in marine, boating and recreational vehicle environments.

The present sheets offer enhanced drape and comfort compared to traditional cotton bedding, and are as fine as silk, yet provide the benefits of high elasticity and recovery along with superior breathability, body-heat transport, and moisture management as compared to traditional cotton bedding.

Conventional fitted sheets can bunch and slide on standard mattress sizes. Furthermore, if the fitted bed sheets do not fit properly, they do not provide a smooth surface to lie on. The present invention overcomes these issues.

The present high gauge circular knit fabrics stretch to fit and offer superior recovery on the mattress allowing the fabric to conform to fit the mattress without popping off the corners of the mattress or billowing. The performance fabric can include spandex, offers a better fit than conventional bedding products, can accommodate larger or smaller mattress sizes with a single size sheet, and can conform to mattresses with various odd dimensions.

Spandex - or elastane - is a synthetic fiber known for its exceptional elasticity. It is stronger and more durable than rubber, its major non-synthetic competitor. It is a polyurethane-polyurea copolymer that was invented by DuPont. "Spandex" is a generic name, and an anagram of the word "expands." "Spandex" is the preferred name in North America; elsewhere it is

referred to as “elastane.” The most famous brand name associated with spandex is Lycra, a trademark of Invista.

The present high gauge circular knit fabric offers durability in reduced pilling and pulling when compared to other knit technologies, and offer reduced wrinkles and enhanced color steadfastness

In a preferred embodiment, the present performance fabric can allow for a one-size fitted sheet that can actually fit two different size mattresses. For example, the full fitted sheet of the present invention can fit on both the full and queen size bed. The twin fitted sheet of the present invention will also fit an XL twin. In a boating application, the present invention can be produced to fit almost every custom boat mattress.

Testing of the present invention conducted at the North Carolina State University (NCSU) Center for Research on Textile Protection and Comfort confirms that the present performance fabrics provide a cooler sleeping environment than cotton. Performance bedding was tested side-by-side with commercially available cotton bed sheets in a series of procedures designed to measure each product’s heat- and moisture-transport properties, as well as warm/cool-to-touch thermal transport capabilities.

Across all tests, the present performance fabrics in bedding outperformed cotton, demonstrating the performance fabric’s superiority in establishing and maintaining thermal comfort during sleep. This advantage is evident to users from the very onset, as NCSU testing indicates that, on average, performance bedding of the present invention offers improved heat transfer upon initial contact with the skin, resulting in a cooler-to-the-touch feeling.

During sleep, high gauge circular knit performance bedding of the present invention helps to maintain thermal comfort by trapping less body heat and breathing better than cotton. Testing has demonstrated that performance bedding made out of performance fabrics transfers heat away from the body up to two times more effectively than cotton. This is critically important not only for sustained comfort during sleep, but also in terms of enabling the body to cool itself as rapidly as possible to facilitate sleep onset. In addition to trapping less heat, performance bedding breathes better than cotton – up to 50% better, giving performance bedding a strong advantage in terms of ventilation and heat and moisture transfer.

The performance advantage over cotton holds true for simulated dry and wet skin conditions, confirming that certain performance fabrics in bedding are better suited than cotton at managing moisture (e.g., sweat) to maintain thermal comfort. In addition to wicking moisture away from the skin through capillary action, the performance fabric's advanced breathability further enables heat and moisture transfer through evaporative cooling. As a result, the user is kept cooler, drier and more comfortable than with cotton.

The present performance bedding holds a distinct advantage over cotton in enabling, accommodating and maintaining optimum thermal conditions for sleep, which in turn can lead to faster sleep initiation and deeper, more restorative sleep.

These and other objects, features and advantages of the present invention will become more apparent upon reading the following specification in conjunction with the accompanying drawings.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES**

**Fig. 1** illustrates a preferred embodiment of the present invention.

**Fig. 2** illustrates another preferred embodiment of the present invention.

**Fig. 3** illustrates a further preferred embodiment of the present invention.

**Fig. 4** illustrates another preferred embodiment of the present invention.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF PREFERRED EMBODIMENTS**

Although preferred embodiments of the invention are explained in detail, it is to be understood that other embodiments are contemplated. Accordingly, it is not intended that the invention is limited in its scope to the details of construction and arrangement of components set forth in the following description or illustrated in the drawings. The invention is capable of other embodiments and of being practiced or carried out in various ways. Also, in describing the preferred embodiments, specific terminology will be resorted to for the sake of clarity.

It must also be noted that, as used in the specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. For example, reference to a sheet or portion is intended also to include the

manufacturing of a plurality of sheets or portions. References to a sheet containing “a” constituent is intended to include other constituents in addition to the one named.

Also, in describing the preferred embodiments, terminology will be resorted to for the sake of clarity. It is intended that each term contemplates its broadest meaning as understood by those skilled in the art and includes all technical equivalents which operate in a similar manner to accomplish a similar purpose.

Ranges may be expressed herein as from “about” or “approximately” one particular value and/or to “about” or “approximately” another particular value. When such a range is expressed, another embodiment includes from the one particular value and/or to the other particular value.

By “comprising” or “containing” or “including” is meant that at least the named compound, element, particle, or method step is present in the composition or article or method, but does not exclude the presence of other compounds, materials, particles, method steps, even if the other such compounds, material, particles, method steps have the same function as what is named.

It is also to be understood that the mention of one or more method steps does not preclude the presence of additional method steps or intervening method steps between those steps expressly identified. Similarly, it is also to be understood that the mention of one or more components in a fabric or system does not preclude the presence of additional components or intervening components between those components expressly identified.

Referring now in detail to the drawing figures, wherein like reference numerals represent like parts throughout the several views, the present invention of **Figs. 1 and 4** provides a sheet **10** shown having dimensions of 102 inches in length and 91 inches in width. The material is manufactured from performance fabric, which can include, for example, varying amounts of one or more of Lycra, Coolmax, Thermax and Thermastat. In a preferred embodiment, the fabric is treated so that the fabric has antimicrobial properties. By using circular-knit performance fabric, the fabric is able to provide elasticity in all four directions. This property allows for the sheet to fit extraordinary mattress, cushion and bedding shapes, as well as providing better fits for traditional rectangular sheets. By using performance fabrics, the sheet has elastic properties that allow stretching in the directions shown as **30**. In addition, by using circular-knit performance

fabric, the resulting bedding retains an exceptionally fine tactile quality critical for providing maximum levels of enhanced comfort.

An alternative to circular knitting is non-circular knitting – for example, warp knitting. This method can achieve widths greater than circular knitting. Industrial warp knit machines, for example, can produce tricote warp knit fabrics up to 130-140 inches in width. Circular knitting, however, is less expensive, as it requires less set-up time. Circular knitting also provides greater multidirectional stretch.

In order to provide a sheet that exceeds the maximum dimensions of fabric that can be produced by available circular knitting machines, flat lock stitching **12** is used to join a plurality of portions resulting in a sheet that is 91 inches wide (as shown). In an exemplary embodiment, piping **11** can be included in close proximity to the stitching. The stitching can be the same color as the fabric of the sheet portions, or different color(s). The piping can be 3/4 inch straight piping without a cord or other filler. In one preferred embodiment, the stitching is 16 stitches per inch. Piping **11** can be included at one end of the sheet and can be the same or a different color as the sheet fabric.

For a fitted sheet, the sheet can include an elastic portion surrounding the edge of the fitted sheet to better keep the fitted sheet in place when placed on a mattress or other sleeping surface. A cord can be sewn into the edge of the fitted sheet and cinched around the mattress or other sleeping surface to better hold the fitted sheet in place.

Referring to **Fig. 2**, a sheet is shown having dimensions of 91 inches wide and 102 inches in length. In this embodiment, stitching **14** is shown 34 inches from an interior edge **18** of a main portion **16** and another stitch **14** at edge **20** of the sewn-on portion. Flat lock stitching can be used for the stitching. Piping can be applied at or in proximity to the stitching.

Referring to **Fig. 3**, a non-rectangular shaped sheet is shown. In this exemplary embodiment, elastic can be included around the edge of the fitted sheet to better maintain the fitted sheet in position when placed on a sleeping surface. In one embodiment, pull ties **24** can be installed at various locations around the edge of the fitted sheet in order to assist in maintaining the fitted sheet secured to the sleeping surface. The pull tie can be cinched to increase tension around the edge of the fitted sheet as shown by **26**.

Stitching used for securing the portions of the sheet together can include that shown as **28a**. In another embodiment, the stitching used for securing the portion of fabric together is shown as **28b**.

Referring to **Fig. 4**, yet another preferred embodiment of the invention is shown. In this embodiment, the sheet can be assembled through stitching of differing fabrics for generating performance zones in the sheet. For example, zone **32** can have higher wicking properties than the other zones since this area is where the majority of the individual body rests. Areas **34a** through **34d** can have higher spandex or other elastic fabric properties so that the fit around a sleeping surface is improved. Area **36** may have thermal properties such as increased cooling since this area is generally where the individual's head lies. In an exemplary embodiment, the pillow covers of pillows used by the individual also have differing properties from the remainder of the sheet, e.g., thermal properties.

The present invention encompasses the construction of bedding materials that have superior performance properties while allowing for manufacture by machinery presently available and in use. More specifically, the invention is related to a new method for fabricating a covering and or sheets in bedding. When using the circular knitting machine, the high gauge performance fabrics can only be made to a maximum size of 72.5 inches without losing the integrity of the spandex in the fabric. Yet, normal sheet panels are 102 x 91 inches. This presents problems when manufacturing sheets from performance fabrics.

Additionally, special stitching techniques must be used given the thread density of the fabric. Using this special stitching, panels are sewn together to produce bedding or a sheet that is the proper size for standard bed sheets. Because discrete portions/panels are used in the manufacture of the present fabrics, panels can be selected that provide different properties for different areas of the bedding (**Fig. 4**). Stitching or seams on the sheet can also allow for the ease of making the bed. Because the bedding is made from performance fabric with spandex, it stretches to permit multiple and custom sizing for applications in cribs, recreational vehicles and boats.

Circular knitting machines used for high gauge performance bedding fabrics are called high-gauge circular knitting machines, because of dense knitting with thin yarn. High gauge generally denotes 17 gauges or more. Seventeen gauges indicate that 17 or more cylinder



needles are contained in one inch. Circular knitting machines of less than 17 gauges are referred to as low-gauge circular knitting machines. The low-gauge circular knitting machines are often used to knit outerwear.

“Yarn count” indicates the linear density (yarn diameter or fineness) to which that particular yarn has been spun. The choice of yarn count is restricted by the type of knitting machine employed and the knitting construction. The yarn count, in turn, influences the cost, weight, opacity, hand and drape of the resulting knitted structure. In general, staple spun yarns tend to be comparatively more expensive the finer their count, because finer fibers and a more exacting spinning process are necessary in order to prevent the yarn from showing an irregular appearance.

A top width in the 90-inch range is currently possible using a circular knit fabric formed on a 36-38-inch diameter machine, although higher levels of spandex in the performance fabric tend to pull the width in. In just one example, on a 30-inch diameter machine, the spandex can reduce an otherwise 94-inch circumference fabric tube to one with a 60-65 inch finished width.

A major limitation in finished width is not strictly a knitting concern but also concerns finishing. With performance fabric, it tends to sag in the middle – increasingly so with greater widths – making finishing difficult to impossible above a certain threshold. A possible 90-inch finished width is contingent upon having a good finishing set-up capable of handling the present performance fabric. This potential for difficulties would only become compounded at the larger widths required for bed sheets.

In a preferred process, the present fabric undergoes a heat setting finishing process. Applying a moisture-wicking finish to another fabric – like cotton – that can be produced at larger widths appears unlikely to match the moisture-control properties of the present fabric, as polyester itself is naturally moisture-resistant and there are physical actions (e.g. capillary action) at play. Further, the use of cotton comes at the expense of breathability and heat-transfer capabilities (as confirmed by laboratory testing) and stretchability.

Numerous characteristics and advantages have been set forth in the foregoing description, together with details of structure and function. While the invention has been disclosed in several forms, it will be apparent to those skilled in the art that many modifications, additions, and deletions, especially in matters of shape, size, and arrangement of parts, can be made therein

without departing from the spirit and scope of the invention and its equivalents as set forth in the following claims. Therefore, other modifications or embodiments as may be suggested by the teachings herein are particularly reserved as they fall within the breadth and scope of the claims here appended.

## CLAIMS

What is claimed is:

1. A method of making a finished fabric at least 90 inches wide comprising:  
forming at least two discrete performance fabric portions; and  
joining at least two discrete performance fabric portions to form the finished fabric.
2. The method according to Claim 1, wherein forming at least two discrete performance fabric portions comprises knitting at least two discrete performance fabric portions.
3. The method according to Claim 1, wherein forming at least two discrete performance fabric portions comprises circular knitting at least two discrete performance fabric portions.
4. The method according to Claim 1, wherein joining at least two discrete performance fabric portions to form the finished fabric comprises stitching at least two discrete performance fabric portions together to form the finished fabric.
5. A method of making a finished fabric at least 90 inches wide comprising:  
circular knitting at least two discrete performance fabric portions; and  
stitching at least two discrete performance fabric portions together to form the finished fabric.
6. The method according to Claim 5, wherein the finished fabric comprises a bed sheet.
7. The method according to Claim 5, further comprising heat setting finishing the finished fabric.
8. The method according to Claim 5, further comprising providing piping to the finished fabric.
9. A method of making a bed sheet at least 90 inches wide from performance fabric comprising:  
circular knitting at least two discrete performance fabric portions;  
stitching at least two discrete performance fabric portions together; and

heat setting finishing the stitched at least two discrete performance fabric portions to form the finished bed sheet.

10. The method according to Claim 9, further comprising providing piping to the finished bed sheet.

11. The method according to Claim 9, wherein the at least two discrete performance fabric portions have different fabric characteristics.

12. The method according to Claim 11, wherein fabric characteristics are selected from the group consisting of moisture management, UV protection, anti-microbial, thermo-regulation, wind resistance and water resistance.

13. A finished fabric at least 90 inches wide comprising:

a first circular knitted performance fabric; and

a second circular knitted performance fabric;

wherein the first and second performance fabrics are discrete; and

wherein the first and second performance fabrics are joined to form the finished fabric.

14. The finished fabric of Claim 13, wherein the finished fabric comprises a bed sheet.

15. The finished fabric of Claim 13, further comprising piping.

16. The finished fabric of Claim 13, wherein the first and second performance fabrics have different fabric characteristics.

17. The finished fabric of Claim 16, wherein fabric characteristics are selected from the group consisting of moisture management, UV protection, anti-microbial, thermo-regulation, wind resistance and water resistance.

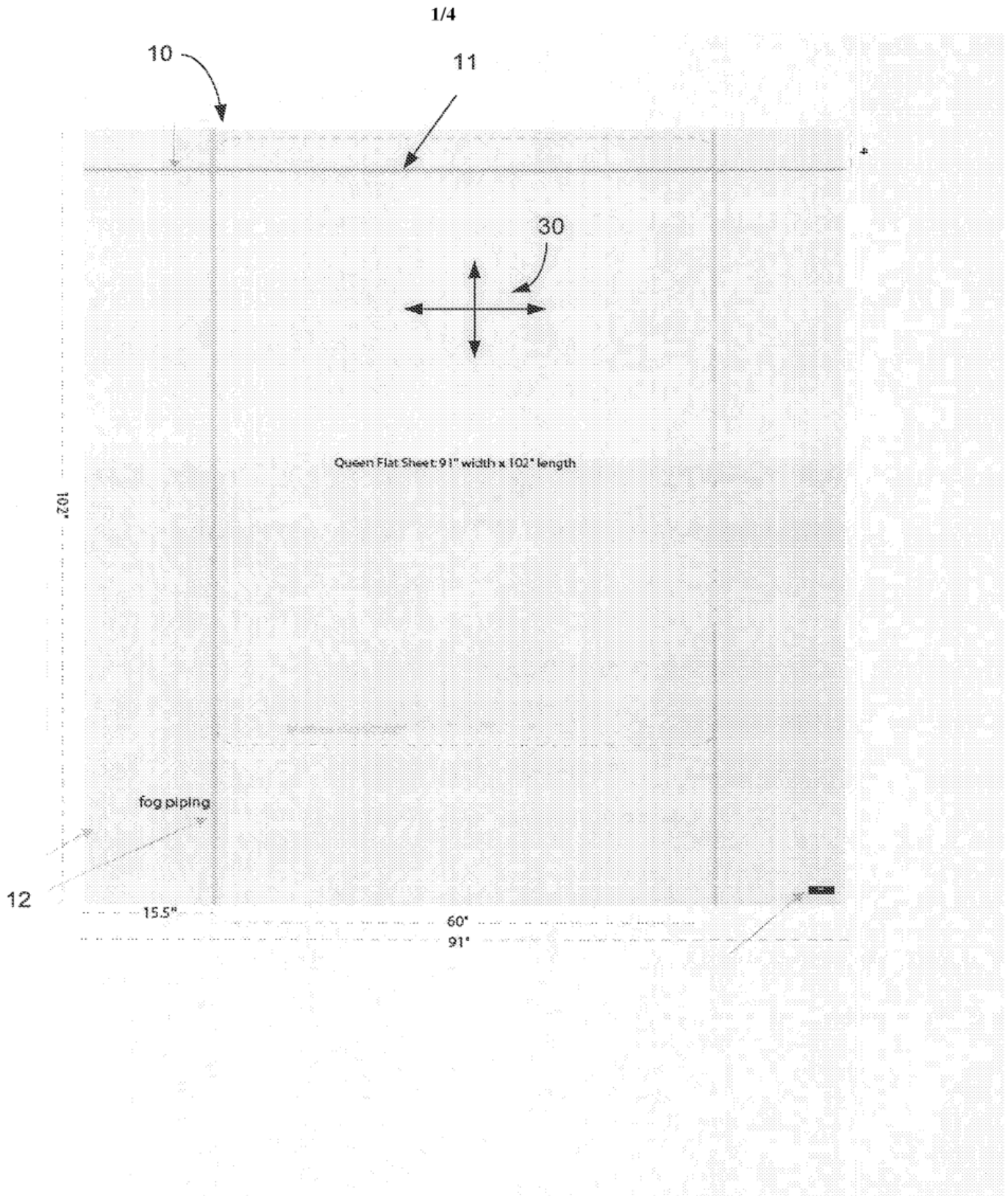
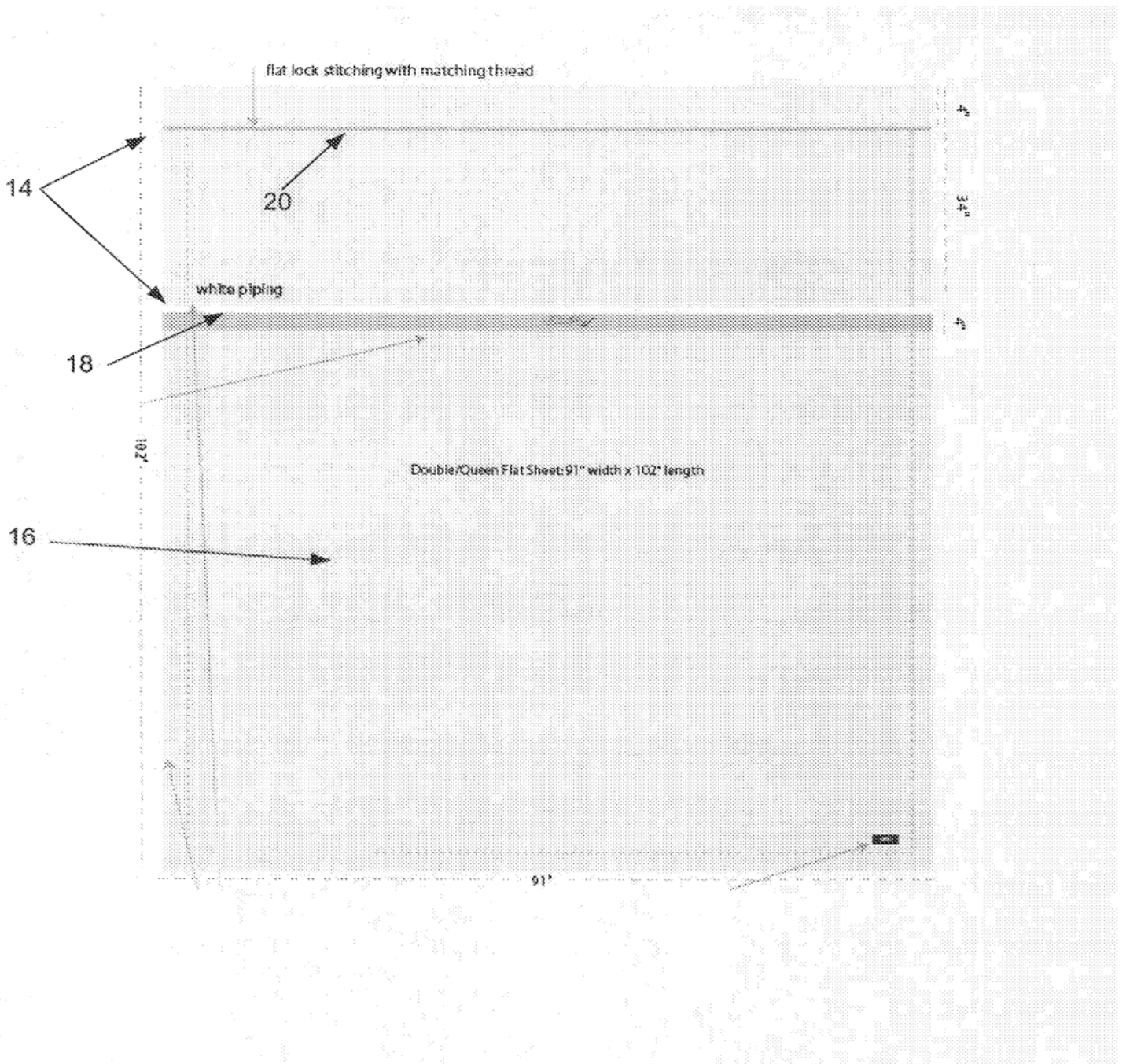


Fig. 1



*Fig. 2*

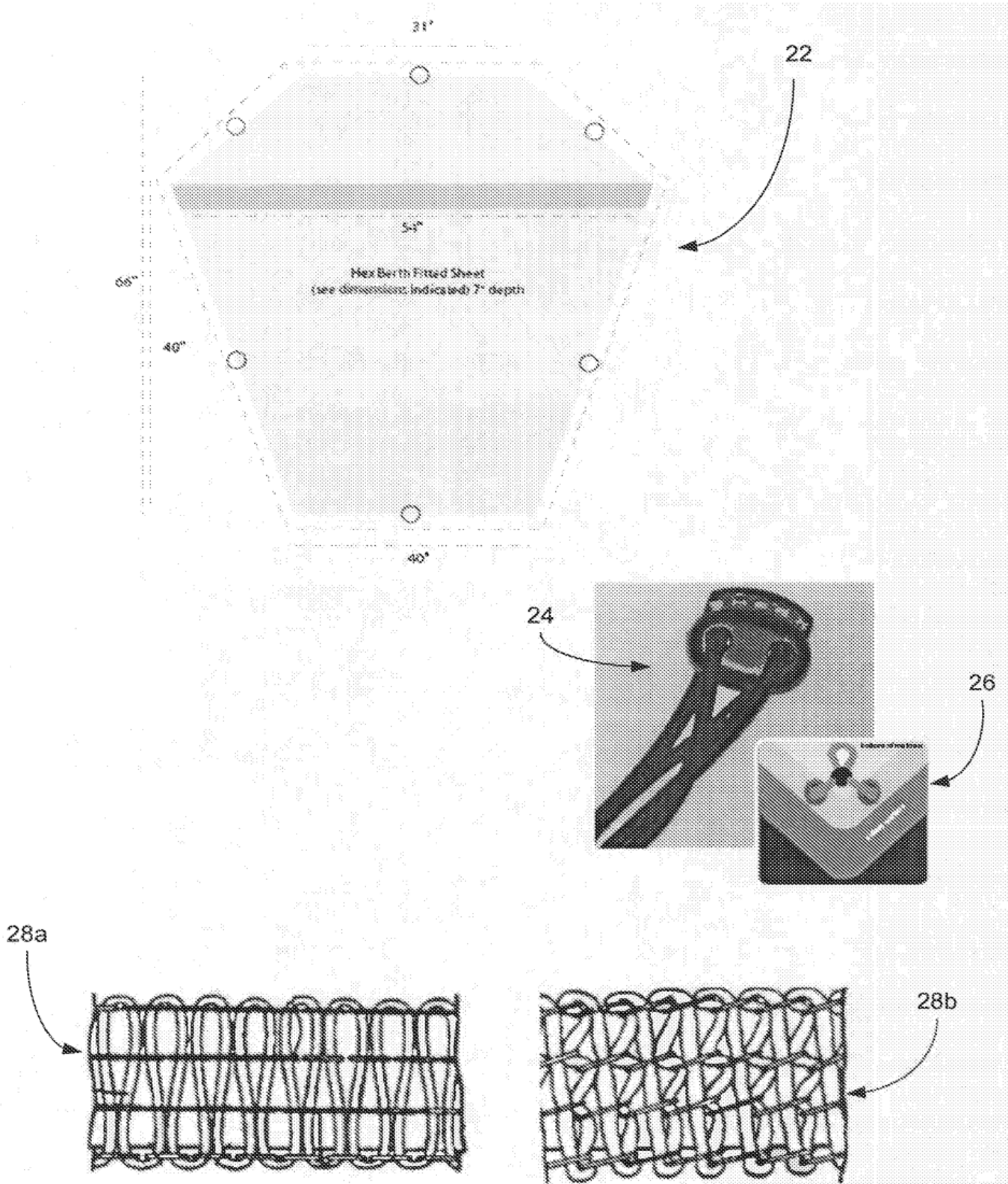
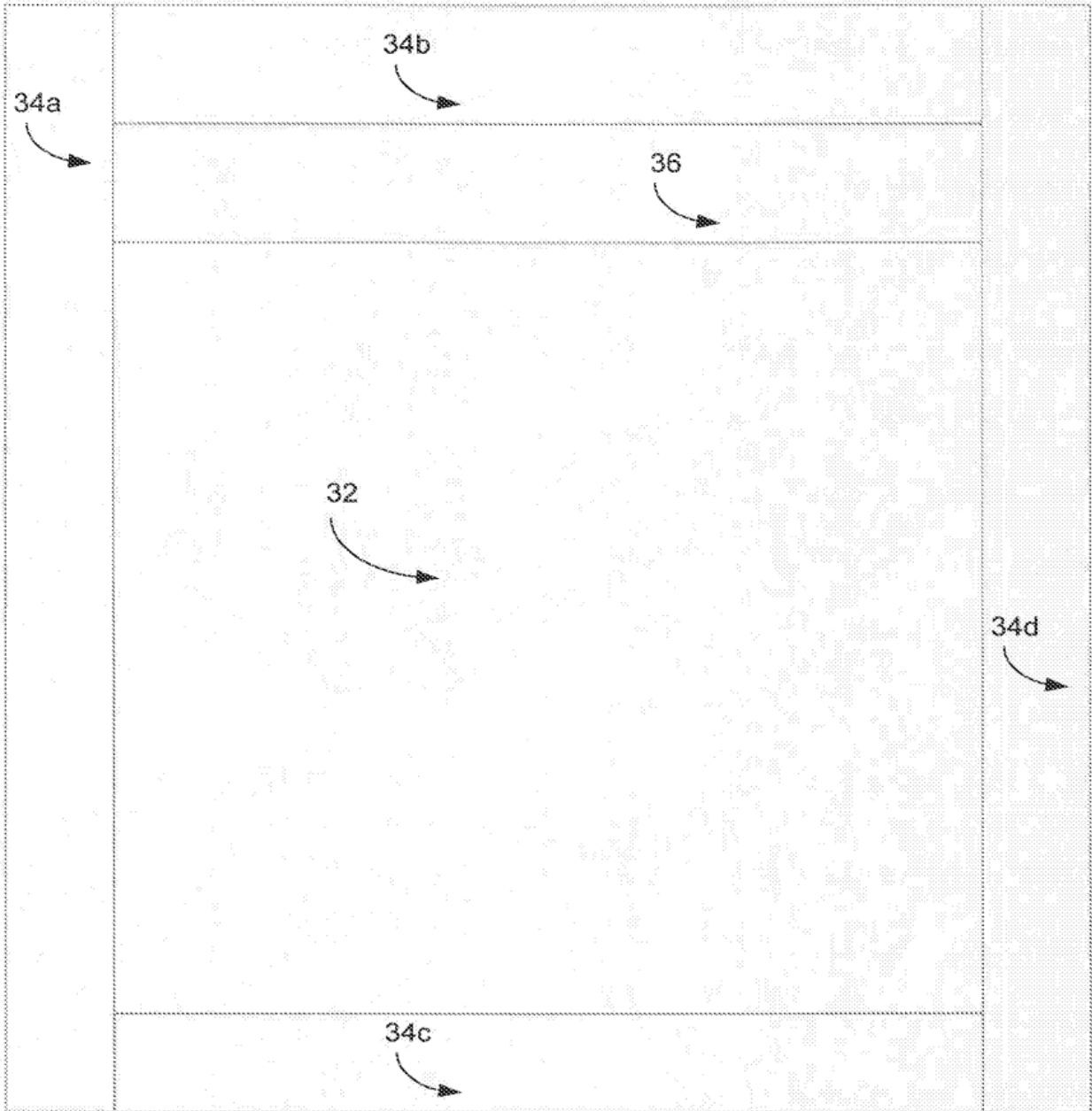


Fig. 3



*Fig. 4*



(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
1 April 2010 (01.04.2010)

(10) International Publication Number  
**WO 2010/037082 A3**

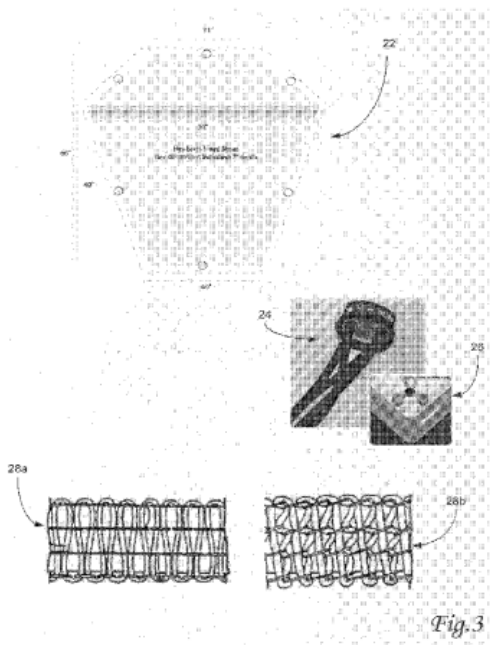
- (51) International Patent Classification:  
D04B 21/14 (2006.01) D03D 11/00 (2006.01)
- (21) International Application Number:  
PCT/US2009/058716
- (22) International Filing Date:  
29 September 2009 (29.09.2009)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
61/101,049 29 September 2008 (29.09.2008) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): SHEEX LLC [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): WALVIUS, Susan, Katherine [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US). MARCINIAK, Michelle, Marie [US/US]; 169 Captain Lowman Road, Chapin, SC 29036 (US).
- (74) Agent: SCHNEIDER, Ryan, A.; Troutman Sanders LLP, Bank of America Plaza, 600 Peachtree Street, N.E., Suite 5200, Atlanta, GA 30308-2216 (US).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- Published:
- with international search report (Art. 21(3))
  - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

[Continued on next page]

(54) Title: FABRIC SYSTEM



(57) Abstract: Bedding material including a first fabric section manufactured from performance fabric and having a first and second side; and, a second fabric section attached to the first side of the first fabric section. Additionally, a third fabric section can be attached to the second side of the first fabric section. The first fabric section can be attached to the second fabric section through a flatlock stitch. The first fabric section can include a first zone and a second zone wherein the first zone contains different performance properties from the second zone and the first zone can have thermal or moisture wicking properties.



WO 2010/037082 A3

(88) Date of publication of the international search report:  
8 July 2010

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****D04B 21/14(2006.01)i, D03D 11/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

D04B 21/14; A47G 9/00; A47G 9/02; A61G 7/05; B32B 5/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models  
Japanese utility models and applications for utility models  
(Chinese Patents and application for patent)Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
eKOMPASS(KIPO internal)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-309183 A (MORIUCHI KYU KK) 09 November 1999 See paragraphs [0001] and [0010]-[0013]	1-17
X	US 6381779 B1 (THOMPSON; THOMAS L.) 07 May 2002 See claim 1 and figures 4-6	1
A	US 5817391 A1 (ROCK; MOSHE et al.) 06 October 1998 See column 1, line 66 - column 3, line 19	1-17
A	US 5765241 A1 (MACDONALD; ROBERT) 16 June 1998 See the whole document	1-17

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 APRIL 2010 (28.04.2010)

Date of mailing of the international search report

**29 APRIL 2010 (29.04.2010)**

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-  
gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

KIM, Jong Kyoo

Telephone No. 82-42-481-5593



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2009/058716**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 11-309183 A	09.11.1999	None	
US 6381779 B1	07.05.2002	US 6678906 B1 WO 0309-2452A1	20.01.2004 13.11.2003
US 5817391 A1	06.10.1998	None	
US 5765241 A1	16.06.1998	AU 1997-12445 B2 EP 0787451 A2 EP 0787451 A3 EP 0787451 B1 GB 2309638 A	27.05.1999 06.08.1997 13.10.1999 04.06.2003 06.08.1997

Search → Results → ES2368481 (T1)

ES2368481 (T1)

**Bibliographic data**

- Description
- Claims
- Abstract
- Original document
- Cited documents
- Citing documents
- INPADOC legal status
- INPADOC patent family

**Bibliographic data: ES2368481 (T1) – 2011-11-17**

★ In my patents list ✕ Register → Report data error

Print

**FABRIC SYSTEM**

**Page bookmark** [ES2368481 \(T1\) - FABRIC SYSTEM](#)

**Inventor(s):** WALVIUS SUSAN; MARCINIAK MICHELLE ±

**Applicant(s):** SHEEX INC [US] ±

**Classification:**  
- international: D03D11/00; D04B21/14  
- European: D04B1/18

**Application number:** ~~ES~~20090817024T 20090929

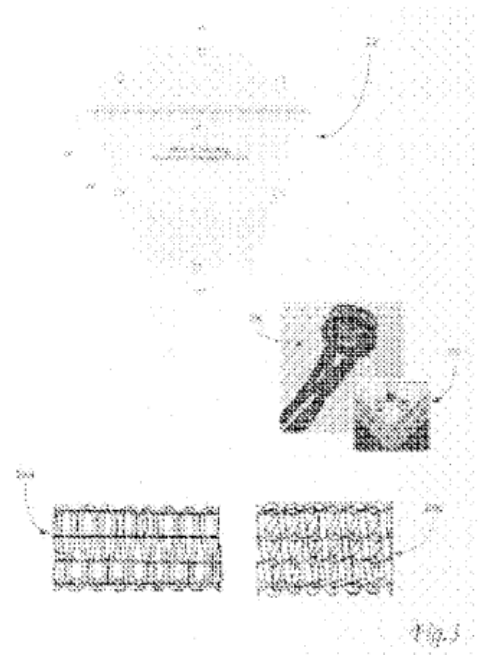
**Priority number(s):** US20080101049P 20080929

**Also published as:** [WO2010037082 \(A2\)](#) [WO2010037082 \(A3\)](#) [US2011000020 \(A1\)](#) [EP2344691 \(A2\)](#) → [CN102245822 \(A\)](#) → more

**Abstract not available for ES2368481 (T1)**  
**Abstract of corresponding document:**  
**WO2010037082 (A2)**

[Translate this text](#)

Bedding material including a first fabric section manufactured from performance fabric and having a first and second side; and, a second fabric section attached to the first side of the first fabric section. Additionally, a third fabric section can be attached to the second side of the first fabric section. The first fabric section can be attached to the second fabric section through a flatlock stitch. The first fabric section can include a first zone and a second zone wherein the first zone contains different performance properties from the second zone and the first zone can have thermal or moisture wicking properties.



**Quick help**

- [What does A1, A2, A3 and B stand for after a publication number?](#)
- [What happens if I click on "in my patents list"?](#)
- [What happens if I click on the "Register" button?](#)
- [Why are some sidebar options deactivated for certain documents?](#)
- [How can I bookmark this page?](#)
- [Why does a list of documents with the heading "Also published as" sometimes appear, and what are these documents?](#)
- [What is a cited document?](#)
- [What are citing documents?](#)
- [What information will I find if I click on the link "View all"?](#)
- [Why do I sometimes find the abstract of a corresponding document?](#)
- [What happens if I click on the button "Translate this text?"](#)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 344 691**

⑤① Int. Cl.:

<b>A01H 5/00</b> (2006.01)	<b>A01H 5/10</b> (2006.01)
<b>C12N 1/21</b> (2006.01)	<b>C12N 5/04</b> (2006.01)
<b>C12N 15/31</b> (2006.01)	<b>C12N 15/62</b> (2006.01)
<b>C12N 15/82</b> (2006.01)	<b>C07K 14/32</b> (2006.01)
<b>C07K 19/00</b> (2006.01)	<b>A01N 63/02</b> (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **03716053 .8**

⑨⑥ Fecha de presentación : **20.02.2003**

⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1499176**

⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

⑤④ Título: **Nuevas toxinas Vip3 y sus métodos de uso.**

③⑩ Prioridad: **06.03.2002 US 362250 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.09.2010**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.09.2010**

⑦③ Titular/es: **Syngenta Participations AG.**  
**Schwarzwaldallee 215**  
**4058 Basel, CH**

⑦② Inventor/es: **Shen, Zhicheng;**  
**Warren, Gregory W.;**  
**Shotkoski, Frank y**  
**Kramer, Vance**

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

ES 2 344 691 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

Nuevas toxinas Vip3 y sus métodos de uso.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevas toxinas Vip3 de *Bacillus thuringiensis*, a secuencias de ácido nucleico cuya expresión origina dichas toxinas, y a métodos de preparación y métodos de uso de dichas toxinas y de las secuencias de ácido nucleico correspondientes para controlar insectos.

10

**Antecedentes de la invención**

Las plagas vegetales son el principal factor de pérdida mundial de cultivos agrícolas importantes. Aproximadamente 8 mil millones de dólares se pierden cada año sólo en los EE.UU. debido a infecciones de plagas no mamíferas incluidos los insectos. Además de las pérdidas en las cosechas, las plagas de insectos son también una carga económica para los cultivadores de frutas y vegetales, para los productores de flores ornamentales y para los jardineros residenciales.

15

Las plagas de insectos son controladas principalmente mediante aplicaciones intensivas de plaguicidas químicos, que actúan inhibiendo el crecimiento de los insectos, evitando que los insectos se alimenten o se reproduzcan o causándoles la muerte. Se puede lograr un buen control de los insectos, pero estos químicos pueden afectar a veces a otros insectos beneficiosos. Otro problema que resulta del amplio uso de plaguicidas químicos es la aparición de variedades de insectos resistentes. Esto ha sido parcialmente paliado mediante diversas prácticas de manejo de la resistencia, pero existe una necesidad creciente de agentes alternativos para el control de plagas. Los agentes biológicos para el control de plagas, como las cepas de *Bacillus thuringiensis* que expresan toxinas plaguicidas como  $\delta$ -endotoxinas, también han sido aplicados a plantas de cultivo con resultados satisfactorios, ofreciendo una alternativa o complemento a los plaguicidas químicos. Se han aislado los genes que codifican algunas de esas  $\delta$ -endotoxinas y su expresión en huéspedes heterólogos ha demostrado que proporcionan otra herramienta para el control de plagas de insectos importantes desde el punto de vista económico. En particular, la expresión de toxinas insecticidas en plantas transgénicas, como las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, ha proporcionado una protección eficaz contra determinadas plagas de insectos, y las plantas transgénicas que expresan dichas toxinas se han comercializado permitiendo a los granjeros reducir las aplicaciones de agentes químicos para el control de insectos.

20

25

30

35

40

45

En la actualidad, se han identificado otros genes que no son de endotoxinas y se identificaron las proteínas que ellos codifican. Las patentes 5,877,012, 6,107,279, 6,137,033 y 6,291,156 así como Estruch *et al.* (1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-5394) y Yu *et al.* (1997, Appl. Environ. Microbiol. 63:532-536), incorporados en este documento por referencia, describen una nueva clase de proteínas insecticidas denominadas Vip3. Los genes *vip3* codifican proteínas de aproximadamente 88 kDa que son producidas y secretadas por el *Bacillus* durante sus estadios vegetativos de crecimiento (proteínas insecticidas vegetativas, VIP, por sus siglas en inglés). La proteína Vip3 A posee actividad insecticida contra un amplio espectro de plagas lepidópteras, incluidas, pero no exclusivamente, gusano cortador grisiento (BCW, *Agrotis ipsilon*), gusano cogollero (FAW, *Spodoptera frugiperda*), gusano cogollero del tabaco (TBW, *Heliothis virescens*), y gusano elotero (CEW, *Helicoverpa zea*). Más recientemente, se encontró que plantas que expresan la proteína Vip3A son resistentes al daño por alimentación causado por plagas de insectos hemípteros. Por lo tanto, la proteína Vip3A exhibe un espectro de actividades insecticidas inigualable. Otras divulgaciones, WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546 y WO 99/57282, también identificaron actualmente homólogos de la clase de proteínas Vip3.

50

El uso continuo de agentes químicos y biológicos para controlar plagas de insectos aumenta la probabilidad de que éstos desarrollen resistencia a dichas medidas de control. Asimismo, sólo unas pocas plagas específicas de insectos son controlables con cada agente de control.

55

Por consiguiente, sigue siendo una necesidad descubrir agentes de control de plagas nuevos y eficaces que proporcionen un beneficio económico a los granjeros y que sean aceptables para el medio ambiente. Son particularmente necesarios agentes de control que estén dirigidos a un amplio espectro de plagas importantes desde el punto de vista económico, agentes de control que controlen eficazmente cepas de insectos que son o podrían tornarse resistentes a los agentes de control de insectos existentes, y aquellos con mayor potencia en comparación con los agentes de control actuales. Además, también son deseables agentes cuya aplicación reduzca al mínimo la carga sobre el ambiente.

**Resumen**

60

La presente invención apunta a la necesidad de nuevos agentes de control de plagas proporcionando nuevos genes y toxinas que son diferentes de los divulgados en las patentes de los Estados Unidos 5,877,012, 6,107,279 y 6,137,033, y en Estruch *et al.* (1996), y Yu *et al.* (1997), así como en WO 98/18932, WO 99/33991, WO 99/5782 y WO 98/00546.

65

En la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos para controlar plagas vegetales. En particular, se proporcionan nuevas secuencias de ácido nucleico *vip3* aisladas de *Bacillus thuringiensis* y secuencias sustancialmente idénticas a éstas, cuya expresión origina toxinas plaguicidas con toxicidad para plagas de insectos importantes desde el punto de vista económico, particularmente plagas de insectos que infectan plantas. La invención apunta además a nuevas toxinas plaguicidas resultantes de la expresión de las secuencias de ácido nucleico, y a composiciones y

## ES 2 344 691 T3

formulaciones que contengan toxinas plaguicidas, que sean capaces de inhibir la capacidad de las plagas de insectos para sobrevivir, crecer y reproducirse, o de limitar el daño relacionado con los insectos o la pérdida de las plantas de cultivo.

5 La invención se dirige además a métodos de uso de las secuencias de ácido nucleico en plantas transgénicas para conferir protección contra el daño causado por insectos, y a un método de uso de las toxinas plaguicidas y composiciones y formulaciones que comprenden las toxinas plaguicidas, por ejemplo mediante la aplicación de las toxinas plaguicidas o las composiciones o formulaciones para tratar profilácticamente áreas o plantas sensibles a los insectos, a fin de conferirles protección contra las plagas de insectos.

10 Las secuencias de nucleótidos de la presente invención se pueden modificar genéticamente usando métodos conocidos en el área a fin de alterar dichas secuencias de nucleótidos para una diversidad de propósitos que incluyen, pero no exclusivamente, ampliar el espectro de la actividad plaguicida o aumentar la actividad específica contra una plaga específica. Se pueden usar barajado del ADN (transposición de secuencias de ADN por fragmentación aleatoria) y reagrupación por PCR de los fragmentos de genes y oligonucleótidos sintéticos para modificar genéticamente las secuencias de nucleótidos.

15 Las nuevas toxinas plaguicidas descritas en este documento son sumamente activas contra insectos. Por ejemplo, una cantidad de plagas de insectos económicamente importantes, como los lepidópteros *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Diatraea grandiosella* (barrenador del maíz del sudoeste), *Diatraea saccharalis* (barrenador de la caña de azúcar), *Helicoverpa punctigera* (gusano nativo) y *Helicoverpa armigera* (gusano de la cápsula del algodón) se pueden controlar con toxinas plaguicidas. Las toxinas plaguicidas se pueden usar solas o en combinación con otras estrategias de control de insectos para conferir máxima eficacia de control de plagas con mínimo impacto sobre el ambiente.

20 De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina que es activa contra insectos, donde la secuencia de nucleótidos: (a) tiene un complemento que se hibrida con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C; o (b) es isocodificante con la secuencia de nucleótidos de (a); o (c) tiene al menos 95% de identidad con SEC. ID. N°: 1; o (d) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 2.

25 En una realización de este aspecto, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene un complemento que se hibrida con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C.

30 En otra realización de este aspecto, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que es isocodificante con una secuencia de nucleótidos que tiene un complemento que se hibrida con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C.

35 En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Más preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Aún más preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Muy preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 o SEC. ID. N°: 3.

40 En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 3, SEC. ID. N°: 10, SEC. ID. N°: 31 o SEC. ID. N°: 33.

45 En una realización de la presente invención, la molécula de ácido nucleico aislada codifica la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 11 o SEC. ID. N°: 32. Muy preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada codifica una toxina que comprende los aminoácidos 661-788 de SEC. ID. N°: 2.

50 De acuerdo con una realización de la invención, la molécula de ácido nucleico aislada codifica una toxina que es activa contra insectos lepidópteros. Preferentemente, de acuerdo con esta realización, la toxina tiene actividad contra *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol), y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).



## ES 2 344 691 T3

La presente invención también proporciona un gen quimérico que comprende una secuencia promotora heteróloga unida operativamente a la molécula de ácido nucleico de la invención. Además, la presente invención proporciona un vector recombinante que comprende dicho gen quimérico. Aún además, la presente invención proporciona una célula huésped transgénica que comprende dicho gen quimérico. Una célula huésped transgénica de acuerdo con este aspecto de la invención puede ser una célula animal, un virus animal, un virus vegetal, una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula vegetal, preferentemente, una célula vegetal. Incluso además, la presente invención proporciona una planta transgénica que comprende dicha célula vegetal. Una planta transgénica de acuerdo con este aspecto de la invención puede ser sorgo, trigo, girasol, tomate, hortalizas del grupo de las coles, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa o maíz, preferentemente maíz y algodón. Aún además, la presente invención proporciona semillas del grupo de las plantas transgénicas que consisten en sorgo, trigo, girasol, tomate, hortalizas del grupo de las coles, algodón, arroz, soja, remolacha azucarera, caña de azúcar, tabaco, cebada, colza oleaginosa y maíz. En una realización particularmente preferida, la semilla es de una planta de maíz transgénico o de una planta de algodón transgénico.

La invención también proporciona plantas transgénicas de la invención que comprenden además una segunda secuencia de ácido nucleico o grupos de secuencias de ácido nucleico que codifican un segundo principio activo plaguicida. Las segundas secuencias de ácido nucleico particularmente preferidas son las que codifican una  $\delta$ -endotoxina, las que codifican otra toxina VIP (proteína insecticida vegetativa) o las que codifican una ruta para la producción de un principio activo plaguicida no proteico.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona toxinas aisladas activas contra el barrenador del maíz europeo producidas por la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

En otra realización, las toxinas de la invención son activas contra insectos lepidópteros, preferentemente contra *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol), y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).

En una realización, las toxinas de la presente invención son producidas por un aislado de *Bacillus thuringiensis* seleccionado el grupo que consiste en C1674, designado como el registro NRRL B-30556; y C536, designado como el registro NRRL B-30557.

En otra realización, las toxinas son producidas por un clon de *E. coli* seleccionado del grupo que consiste en pNOV3910, designado como el registro NRRL B-30553; pNOV3911, designado como el registro NRRL B-30552; pNOV3906, designado como el registro NRRL B-30555; pNOV3905, designado como el registro NRRL B-30554; y pNOV3912, designado como el registro NRRL B-30551.

En otra realización, una toxina aislada de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2. Preferentemente, la toxina aislada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2. Más preferentemente, la toxina aislada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2. Muy preferentemente, la toxina aislada comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 11 o SEC. ID. N°: 32.

La presente invención también proporciona una composición que contiene una cantidad eficaz para el control de insectos de una toxina de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una toxina activa contra insectos, que comprende: (a) obtener una célula huésped transgénica que comprenda un gen quimérico, el cual a su vez comprenda una secuencia promotora heteróloga unida operativamente a la molécula de ácido nucleico de la invención; y (b) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula transgénica, lo que resulta en al menos una toxina activa contra insectos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica resistente a los insectos, que comprende introducir una molécula de ácido nucleico de la invención en la planta transgénica, donde la molécula de ácido nucleico se puede expresar en la planta transgénica en una cantidad eficaz para controlar insectos. De acuerdo con una realización, los insectos son insectos lepidópteros, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en: *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar insectos que comprende suministrar a los insectos una cantidad eficaz de una toxina de la presente invención. De acuerdo con una realización, los insectos son insectos lepidópteros, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en: *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero),

## ES 2 344 691 T3

*Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol). Preferentemente, la toxina se suministra a los insectos oralmente. En una realización preferida, la toxina se suministra oralmente a través de una planta transgénica que comprende la secuencia de ácido nucleico que expresa una toxina de la presente invención.

La presente invención también proporciona toxinas híbridas activas contra insectos, donde las toxinas híbridas son codificadas por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención.

En una realización, las toxinas híbridas de la invención son activas contra insectos lepidópteros, preferentemente contra *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).

En otra realización, la toxina híbrida es codificada por el fragmento de ADN de aproximadamente 2.4 kb comprendido en el clon de *E. coli* pNOV3912, designado como el registro NRRL B-30551. En una realización preferida, la toxina híbrida es codificada por la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC. ID. N°: 10.

La presente invención también proporciona una composición que comprende una cantidad insecticidamente eficaz de una toxina híbrida de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una toxina híbrida que es activa contra insectos, que comprende: (a) obtener una célula huésped transgénica que comprenda un gen quimérico, el cual a su vez comprenda una secuencia promotora heteróloga unida operativamente a la molécula de ácido nucleico de la invención; y (b) expresar la molécula de ácido nucleico en la célula transgénica, lo que resulta en al menos una toxina híbrida que activa contra insectos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica resistente a los insectos, que comprende introducir una molécula de ácido nucleico de la invención en la planta, donde la molécula de ácido nucleico codifica una toxina híbrida y donde la toxina híbrida se puede expresar en la planta transgénica en una cantidad eficaz para controlar un insecto. De acuerdo con una realización, los insectos son insectos lepidópteros, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para controlar un insecto que comprende suministrar a los insectos una cantidad eficaz de una toxina híbrida de la presente invención. De acuerdo con una realización, los insectos son insectos lepidópteros, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol). Preferentemente la toxina híbrida se suministra a los insectos oralmente. En una realización preferida, la toxina híbrida se suministra oralmente a través de una planta transgénica que comprende una secuencia de ácido nucleico que expresa una toxina híbrida de la presente invención.

La presente invención también proporciona una toxina híbrida activa contra el barrenador del maíz europeo que comprende una región carboxi-terminal de una toxina Vip3 unida en la dirección de amino a carboxi a una región amino-terminal de una toxina Vip3 diferente, donde la región carboxi-terminal comprende los aminoácidos 661-788 de la SEC. ID. N°: 2; y donde la región amino-terminal tiene al menos 85% de identidad, más preferentemente al menos 95% de identidad, muy preferentemente al menos 99% de identidad con los aminoácidos 1-660 de SEC. ID. N°: 7. En una realización preferida, la región carboxi-terminal comprende los aminoácidos 661-788 de SEC. ID. N°: 2, y la región amino-terminal comprende los aminoácidos 1-660 de SEC. ID. N°: 5. En una realización muy preferida, la toxina híbrida comprende los aminoácidos 1-788 de SEC. ID. N°: 11.

La toxina híbrida, de acuerdo con este aspecto de la invención, es preferentemente activa contra insectos lepidópteros, más preferentemente contra insectos lepidópteros seleccionados del grupo que consiste en *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).

## ES 2 344 691 T3

Este aspecto de la invención también abarca una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la toxina híbrida de este aspecto.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se tomarán evidentes para los expertos a partir del estudio de la descripción siguiente de la invención y de los ejemplos no limitantes.

### Breve descripción de las secuencias de la lista de secuencias

- SEC. ID. Nº: 1 es una secuencia de nucleótidos de *vip3C* nativa.
- SEC. ID. Nº: 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC. ID. Nº: 1.
- SEC. ID. Nº: 3 es una secuencia de nucleótidos de *vip3C* optimizada para maíz.
- SEC. ID. Nº: 4 es una secuencia de nucleótidos de *vip3A(a)* nativa.
- SEC. ID. Nº: 5 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC. ID. Nº: 4.
- SEC. ID. Nº: 6 es una secuencia de nucleótidos de *vip3B* nativa.
- SEC. ID. Nº: 7 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC. ID. Nº: 6.
- SEC. ID. Nº: 8 es una secuencia de nucleótidos de *vip3Z* nativa.
- SEC. ID. Nº: 9 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC. ID. Nº: 8.
- SEC. ID. Nº: 10 es una secuencia de nucleótidos de *vip3A(a)* híbrida.
- SEC. ID. Nº: 11 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC. ID. Nº: 10.
- SEC. ID. Nº: 12-29 son secuencias cebadoras (primers) útiles para practicar la invención.
- SEC. ID. Nº: 30 es la secuencia de nucleótidos del vector pNOV2149.
- SEC. ID. Nº: 31 es la secuencia de nucleótidos de *vip3C*-12168.
- SEC. ID. Nº: 32 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEC. ID. Nº: 31.
- SEC. ID. Nº: 33 es la secuencia de nucleótidos de *vip3C*-12168 optimizada para maíz.

### Depósitos

El material siguiente se depositó en la colección de cultivos a los fines del procedimiento en materia de patentes, Agricultural Research Service, Patent Culture Collection (NRRL), 1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, bajo los términos del tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes. Todas las restricciones sobre la disponibilidad del material depositado serán irrevocablemente eliminadas una vez otorgada la patente.

Aislado/clon	Número de registro	Fecha de depósito
<i>B. t.</i> cepa C1674	NRRL B-30556	7 febrero de 2002
<i>B. t.</i> cepa C536	NRRL B-30557	7 febrero de 2002
<i>E. coli</i> BL21 (pNOV3906)	NRRL B-30555	7 febrero de 2002
<i>E. coli</i> BL21 (pNOV3905)	NRRL B-30554	7 febrero de 2002
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pNOV3910)	NRRL B-30553	7 febrero de 2002
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pNOV3911)	NRRL B-30552	7 febrero de 2002
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pNOV3912)	NRRL B-30551	7 febrero de 2002

**Definiciones**

“Actividad” de las toxinas de la invención significa que las toxinas actúan como agentes de control de insectos activos por vía oral, tienen un efecto tóxico, o son capaces de interrumpir o impedir que los insectos se alimenten, lo que puede causar, o no, la muerte de los mismos. Cuando una toxina de la invención se suministra al insecto, el resultado es habitualmente la muerte del insecto, o que el insecto no se alimente de la fuente que hace que la toxina esté a su disposición.

“Asociada a/unida operativamente a” se refiere a dos secuencias de ácido nucleico que están relacionadas física o funcionalmente. Por ejemplo, se dice que una secuencia de ADN promotora o reguladora está “asociada a” una secuencia de ADN que codifica un ARN o una proteína, si las dos secuencias están unidas operativamente, o situadas de modo que la secuencia de ADN reguladora afectará el nivel de expresión de la secuencia de ADN codificante o estructural.

Un “gen quimérico” es una secuencia de ácido nucleico recombinante en la cual una secuencia de ácido nucleico promotora o reguladora está unida operativamente, o asociada a, una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARNm o que se expresa como una proteína, de modo que la secuencia de ácido nucleico reguladora sea capaz de regular la transcripción o la expresión de la secuencia de ácido nucleico asociada. La secuencia de ácido nucleico reguladora del gen quimérico no está normalmente unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico asociada como se encuentra en la naturaleza.

Una “secuencia codificante” es una secuencia de ácido nucleico que se transcribe en ARN como ARNm, ARN r, ARNt, ARNsn, ARN sentido o ARN antisentido. Preferentemente el ARN se traduce después en un organismo para producir una proteína.

“Controlar” insectos significa inhibir, a través de un efecto tóxico, la capacidad de las plagas de insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse, o limitar el daño o las pérdidas, relacionados con los insectos, en las plantas de cultivo. “Controlar” insectos puede significar, o no, matar los insectos, aunque es preferible que signifique matar los insectos.

Correspondiente a: en el contexto de la presente invención, “correspondiente a” o “corresponde a” significa que cuando las secuencias codificantes de ácido nucleico o las secuencias de aminoácidos de genes o proteínas Vip3 están alineadas unas con otras, el ácido nucleico o los aminoácidos que “corresponden a” determinadas posiciones enumeradas son los que se alinean con esas posiciones pero que no están necesariamente en esas exactas posiciones numéricas en relación con la respectiva secuencia codificante de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de la Vip3 particular. Análogamente, cuando la secuencia codificante o secuencia de aminoácidos de una Vip3 particular (por ejemplo, Vip3Z) se alinea con la secuencia codificante o secuencia de aminoácidos de una Vip3 de referencia (por ejemplo, Vip3C), los ácidos nucleicos o aminoácidos en la secuencia Vip3Z que “corresponden a” determinadas posiciones enumeradas de la secuencia Vip3C son los que se alinean con esas posiciones de la secuencia Vip3C, pero no están necesariamente en esas exactas posiciones numéricas en la respectiva secuencia codificante de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de la proteína Vip3Z.

“Suministrar” una toxina significa que la toxina entra en contacto con un insecto, produciendo un efecto tóxico y el control del insecto. La toxina se puede suministrar de muchas maneras conocidas, p. ej., oralmente mediante ingestión por el insecto o mediante contacto con el insecto a través de: la expresión en una planta transgénica, composiciones de proteínas formuladas, composiciones de proteínas pulverizables, una matriz de cebo, o cualquier otro sistema de suministro de toxinas conocido en el área.

“Cantidad eficaz para controlar insectos” significa esa concentración de toxina que inhibe, a través de un efecto tóxico, la capacidad de los insectos para sobrevivir, crecer, alimentarse y/o reproducirse, o que limita el daño o la pérdida, relacionados con los insectos, en las plantas de cultivo. “Cantidad eficaz para controlar insectos” puede significar, o no, matar los insectos, aunque es preferible que signifique matar los insectos.

“Casete de expresión” como se usa en este documento significa una secuencia de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula huésped adecuada, que comprende un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés la cual está unida operativamente a las señales de terminación. También comprende habitualmente las secuencias requeridas para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos. El casete de expresión que comprende las secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión puede también ser de origen natural pero que haya sido obtenido en forma recombinante útil para la expresión de heterólogos. Habitualmente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al huésped, es decir, la secuencia de ácido nucleico particular del casete de expresión no se encuentra naturalmente en la célula huésped y debe ser introducida en la célula huésped o en un ancestro de la célula huésped mediante un fenómeno de transformación. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicie la transcripción sólo cuando la célula huésped es expuesta a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, como una planta, el promotor también puede ser específico para un tejido, órgano o etapa del desarrollo particulares.

## ES 2 344 691 T3

Un “gen” es una región definida que está ubicada dentro de un genoma y que, además de la secuencia de ácido nucleico codificante mencionada antes, comprende otras secuencias de ácido nucleico, principalmente reguladoras, responsables del control de la expresión, es decir la transcripción y la traducción, de la porción codificante. Un gen también puede comprender otras secuencias 5’ y 3’ sin traducir y secuencias de terminación. Otros elementos que pueden estar presentes son, por ejemplo, los intrones.

“Gen de interés” se refiere a cualquier gen que, cuando es transferido a una planta, le confiere a la planta una característica deseada como resistencia a los antibióticos, resistencia a los virus, resistencia a los insectos, resistencia a la enfermedad o resistencia a otras plagas, tolerancia a herbicidas, mayor valor nutricional, mayor rendimiento en un proceso industrial o capacidad reproductiva alterada. El “gen de interés” puede también ser un gen que se transfiera a las plantas para producir en la planta enzimas o metabolitos comercialmente valiosos.

Una secuencia de ácido nucleico “heteróloga” es una secuencia de ácido nucleico que no está naturalmente asociada a la célula huésped en la cual es introducida, inclusive las múltiples copias que no son de origen natural de una secuencia de ácido nucleico que es de origen natural.

Una secuencia de ácido nucleico “homóloga” es una secuencia de ácido nucleico asociada naturalmente a la célula huésped en la cual es introducida.

“Recombinación homóloga” es el intercambio recíproco de fragmentos de ácido nucleico entre moléculas de ácido nucleico homólogas.

“Toxina híbrida” como se usa en este documento es una toxina insecticida elaborada por el hombre que comprende regiones de aminoácidos o fragmentos de una toxina unidas con regiones de aminoácidos o fragmentos de otra toxina diferente. Por ejemplo, pero no exclusivamente, unir la región C-terminal de Vip3C, desde los aminoácidos 661 a 788 de SEC. ID. N°: 2, con la región N-terminal de Vip3A, desde los aminoácidos 1 a 660 de SEC. ID. N°: 5, crea una toxina híbrida con una secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 11.

“Insecticida” se define como una actividad biológica tóxica capaz de controlar insectos, preferentemente matándolos.

Una secuencia de ácido nucleico es “isocodificante con” una secuencia de ácido nucleico de referencia cuando la secuencia de ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de referencia.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” o una proteína o toxina aislada es una molécula de ácido nucleico o proteína o toxina que, por la acción del hombre, existe aparte de su entorno natural y por lo tanto no es un producto de la naturaleza. Una molécula de ácido nucleico o proteína o toxina aislada puede existir en forma purificada o puede existir en un entorno no natural como, por ejemplo, una célula huésped recombinante o una planta transgénica.

Nativo: se refiere a un gen que está presente en el genoma de una célula sin transformar.

De origen natural: la expresión “de origen natural” se usa para describir un objeto que se puede encontrar en la naturaleza en vez de ser producido artificialmente por el hombre. Por ejemplo, una proteína o secuencia de nucleótidos presente en un organismo (inclusive un virus), que se puede aislar de una fuente de la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificada por el hombre en el laboratorio, es de origen natural.

Una “molécula de ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico” es un segmento lineal de ADN o ARN monocatenario o bicatenario que se puede aislar de cualquier fuente. En el contexto de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es preferentemente un segmento de ADN.

Una “planta” es cualquier planta en cualquier etapa del desarrollo, particularmente una planta de semilla.

Una “célula vegetal” es una unidad estructural y fisiológica de una planta, que comprende un protoplasto y una pared celular. La célula vegetal puede estar en forma de una única célula aislada o de una célula cultivada, o como parte de una unidad organizada mayor como, por ejemplo, el tejido de una planta, el órgano de una planta o una planta entera.

“Cultivo celular vegetal” significa cultivos de unidades vegetales, por ejemplo, protoplastos, células de cultivo celular, células de tejidos de plantas, polen, tubos de polen, óvulos, sacos embrionarios, cigotos y embriones en diversas etapas del desarrollo.

“Material vegetal” se refiere a hojas, tallos, raíces, flores o partes de flores, frutas, polen, células huevo, cigotos, semillas, gajos, cultivos celulares o tisulares, o cualquier otra parte o producto de una planta.

Un “órgano de una planta” es una parte definida y visiblemente estructurada y diferenciada de una planta como una raíz, un tallo, una hoja, un botón de una flor o un embrión.

## ES 2 344 691 T3

“Tejido vegetal” como se usa en este documento significa un grupo de células vegetales organizado en una unidad estructural y funcional. Se incluye cualquier tejido vegetal en una planta o en cultivo. Este término incluye, pero no exclusivamente, la planta entera, los órganos de la planta, las semillas de la planta, el cultivo tisular y todos los grupos de células vegetales organizadas en unidades estructurales y funcionales. El uso de este término junto con, o en ausencia de, cualquier tipo específico de tejido vegetal como los indicados antes o que de otra manera esté comprendido por esta definición, no pretende ser exclusivo de ningún otro tipo de tejido vegetal.

Un “promotor” es una secuencia ADN sin traducir secuencia arriba de la región codificante que contiene el sitio de unión para la ARN polimerasa 11 y que inicia la transcripción del ADN. La región del promotor también puede incluir otros elementos que actúan como reguladores de la expresión de los genes.

Un “protoplasto” es una célula vegetal aislada sin pared celular o sólo con partes de la pared celular.

“Elementos reguladores” se refiere a las secuencias que participan en el control de la expresión de una secuencia de nucleótidos. Los elementos reguladores comprenden un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés y a las señales de terminación. También comprenden típicamente las secuencias requeridas para la traducción adecuada de la secuencia de nucleótidos.

Sustancialmente idénticas: la frase “sustancialmente idénticas”, en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o proteínas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 60%, preferentemente 80%, más preferentemente 90%, aún más preferentemente 95%, y muy preferentemente al menos 99% de identidad en los residuos de nucleótidos o aminoácidos, cuando se los compara y alinea para máxima correspondencia, según se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias siguientes o mediante inspección visual. Preferentemente, la identidad sustancial existe en una región de las secuencias que es de al menos aproximadamente 50 residuos de longitud, más preferentemente en una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y muy preferentemente las secuencias son sustancialmente idénticas en al menos aproximadamente 150 residuos. En una realización especialmente preferida, las secuencias son sustancialmente idénticas en toda la longitud de las regiones codificantes. Además, las secuencias de ácido nucleico o proteínas sustancialmente idénticas realizan prácticamente la misma función.

Para la comparación de secuencias, habitualmente una secuencia actúa como secuencia de referencia respecto a la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan coordenadas de subsecuencias si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Después el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de las secuencias para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros designados del programa.

El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda de similitud por el método de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de esos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de programas informáticos de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (consulte en general, Ausubel *et al.*, más adelante).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible para el público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias con puntajes altos (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de interrogación, con un puntaje umbral T de correspondencia exacta o algo positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud de una secuencia de una base de datos. T es el puntaje umbral de las palabras del vecindario (Altschul *et al.*, 1990). Estas secuencias similares (hits) iniciales del vecindario actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar pares de segmentos de alto puntaje (HSP) más largos que las contengan. Las secuencias similares (hits) de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como se pueda incrementar el puntaje de alineamiento acumulado. Los puntajes acumulados se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos que se aparean; siempre > 0) y N (puntaje de penalización para residuos que no se aparean; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos se usa una matriz de puntuación para calcular el puntaje acumulado. La extensión de los hits de palabras en cada dirección se detiene cuando el puntaje de alineación acumulado cae fuera en la cantidad X de su máximo valor alcanzado, el puntaje acumulado tiende a cero o por debajo debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntuación negativa, o cuando se alcanza el extremo de alguna de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un corte de 100, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para la secuencia de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (consulte Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:10915 (1989)).

## ES 2 344 691 T3

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (consulte, por ej., Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de la similitud provista por el algoritmo BLAST es la menor suma de probabilidades (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual ocurriría un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos al azar. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de prueba se considera similar a una secuencia de referencia si la menor suma de probabilidades en una comparación de la secuencia de ácido nucleico de prueba con la secuencia de ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.1, más preferentemente menor de aproximadamente 0.01 y muy preferentemente menor de aproximadamente 0.001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibriden entre sí en condiciones restrictivas. La frase "se hibrida específicamente con" se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula sólo con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones restrictivas, cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (p. ej., celular total) de ADN o ARN "Se une sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico blanco y abarca los apareamientos erróneos menores que se pueden acomodar reduciendo la restricción del medio de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico blanco.

Las "condiciones de hibridación restrictivas" y "condiciones de lavado de hibridación restrictivas" en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico como las hibridaciones Southern y Northern son dependientes de la secuencia y son diferentes bajo parámetros ambientales diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. Una guía extensa para la hibridación de ácido nucleico se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I, capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays" Elsevier, Nueva York. Generalmente, se seleccionan las condiciones de hibridación y de lavado muy restrictivas para que sean aproximadamente 5°C por debajo del punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Típicamente, una sonda "en condiciones restrictivas" se hibridará con su subsecuencia blanco, pero no con otras secuencias.

La  $T_m$  es la temperatura (en las condiciones de fuerza iónica y pH definidas) a la cual 50% de la secuencia blanco se hibrida con una sonda que corresponde perfectamente. Las condiciones muy restrictivas se seleccionan para que sean igual a la  $T_m$  para una sonda en particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación restrictivas para la hibridación en un filtro de ácidos nucleicos complementarios que tengan más de 100 residuos complementarios, en una transferencia Southern o Northern, es 50% de formamida con 1 mg de heparina a 42°C, donde la hibridación se lleva a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy restrictivas es NaCl 0.15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado restrictivas es un lavado con 0.2 x SSC a 65°C durante 15 minutos (consulte, Sambrook, más adelante, por una descripción del tampón SSC). A menudo, un lavado muy restrictivo es precedido por un lavado de baja restricción para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de lavado con restricción media para un dúplex de, por ej., más de 100 nucleótidos, es 1 x SSC a 45°C durante 15 minutos. Un ejemplo de lavado con baja restricción para un dúplex de, por ej., más de 100 nucleótidos, es 4 a 6 x SSC a 40°C durante 15 minutos. Para sondas cortas (p. ej., de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones restrictivas implican concentraciones de sal menores de aproximadamente 1.0 M de ión Na, típicamente una concentración entre aproximadamente 0.01 y 1.0 M de ión Na (u otras sales) a pH entre 7.0 y 8.3, y la temperatura es típicamente al menos aproximadamente 30°C. También se pueden lograr las condiciones restrictivas agregando agentes desestabilizantes como formamida. En general, una relación señal ruido de 2 x (o superior) a la observada para una sonda no relacionada con el ensayo de hibridación particular, indica detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones restrictivas son aún sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, por ej., cuando una copia de un ácido nucleico se crea usando la máxima degeneración de codón permitida por el código genético.

Los siguientes son ejemplos de conjuntos de condiciones de hibridación/lavado que se pueden usar para clonar secuencias de nucleótidos homólogas que son sustancialmente idénticas a las secuencias de nucleótidos de referencia de la presente invención: una secuencia de nucleótidos de referencia se hibrida preferentemente con la secuencia de nucleótidos de referencia en solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 2 X SSC, SDS al 0.1% a 50°C, más deseablemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 1 X SSC, SDS al 0.1% a 50°C, aún más deseablemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.5 X SSC, SDS al 0.1% a 50°C, preferentemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 50°C, más preferentemente en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico o proteínas son sustancialmente idénticas es que la proteína codificada por el primer ácido nucleico tenga reactividad inmunológica cruzada con, o se una específicamente a, la proteína codificada por el segundo ácido nucleico. Por lo tanto, una proteína es típicamente sustancialmente idéntica a una segunda proteína, por ejemplo, cuando las dos proteínas difieren sólo en sustituciones conservativas.

"Sintética" se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende caracteres estructurales que no están presentes en la secuencia natural. Por ejemplo, una secuencia artificial que se asemeja lo más posible al contenido de G+C y a la distribución normal de codones de los genes de dicotiledóneas y/o monocotiledóneas se dice que es sintética.

## ES 2 344 691 T3

“Transformación” es un proceso para introducir ácido nucleico heterólogo en una célula u organismo huésped. En particular, “transformación” significa la integración estable de una molécula de ADN en el genoma de un organismo de interés.

5 “Transformado/transgénico/recombinante” se refiere al organismo huésped como una bacteria o una planta en la cual se ha introducido una molécula de ácido nucleico heterólogo. La molécula de ácido nucleico puede estar integrada establemente en el genoma de un huésped o la molécula de ácido nucleico también puede estar presente como una molécula extracromosómica. Dicha molécula extracromosómica puede ser autorreplicativa. Se comprende que las células, los tejidos o las plantas transformados abarcan no sólo el producto final de un proceso de transformación, sino también su progenie transgénica. Un huésped “no transformado”, “no transgénico” o “no recombinante” se refiere a un organismo silvestre, p. ej., una bacteria o planta, que no contiene la molécula de ácido nucleico heterólogo.

La “clase de proteínas Vip3” comprende Vip3A(a), Vip3A(b), Vip3A(c), Vip3B, Vip3C(a), Vip3C(b), Vip3Z y sus homólogos. “Homólogo” se usa en todas partes con el significado de que la proteína o polipéptido indicado tiene una relación definida con otros miembros de la clase de proteínas Vip3. Esta relación definida incluye, pero no exclusivamente, 1) proteínas que son al menos 70%, más preferentemente al menos 80% y muy preferentemente al menos 90% idénticas a nivel de la secuencia con otros integrantes de la clase de proteínas Vip3 manteniendo simultáneamente la actividad plaguicida, 2) proteínas que tienen reactividad cruzada con anticuerpos que reconocen inmunológicamente otro integrante de la clase de proteínas Vip3, 3) proteínas que tienen reactividad cruzada con un receptor para otro integrante de la clase de proteínas Vip3 y que retienen la capacidad para inducir la muerte celular programada, y 4) proteínas que son al menos 70%, más preferentemente al menos 80% y muy preferentemente al menos 90% idénticas, a nivel de la secuencia, con la región central tóxica de otro integrante de la clase de proteínas Vip3 manteniendo simultáneamente la actividad plaguicida. Otros homólogos Vip3 se divulgaron en WO 98/18932, WO 98/33991, WO 98/00546 y WO 99/57282.

Los nucleótidos se indican por sus bases mediante las abreviaturas estándar siguientes: adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanina (G). De igual manera los aminoácidos se indican mediante las abreviaturas estándar siguientes: alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparragina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C), glutamina (Gln; Q), ácido glutámico (Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptofano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y) y valina (Val; V).

### Descripción detallada de la invención

35 Esta invención se refiere a secuencias de ácido nucleico cuya expresión produce nuevas toxinas, y a la preparación y uso de las toxinas para controlar plagas de insectos. Las secuencias de ácido nucleico derivan del *Bacillus*, un microorganismo grampositivo formador de esporas. En particular, se proporcionan nuevas proteínas Vip3, útiles como plaguicidas.

40 A los fines de la presente invención, las plagas de insectos incluyen insectos seleccionados de, por ejemplo, los órdenes Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera y Trichoptera, particularmente Lepidoptera.

Las tablas 1 a 7 proporcionan una lista de plagas asociadas con las plantas de cultivo principales. Dichas plagas están incluidas en el campo de acción de la invención.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65



ES 2 344 691 T3

TABLA 1

5	Lepidoptera	
	<i>Ostrinia nubilalis</i> , barrenador del maíz europeo	<i>Spodoptera exigua</i> , gusano soldado de la remolacha
10	<i>Agrotis ipsilon</i> , gusano cortador grasiento	<i>Pectinophora gossypiella</i> , lagarta rosada
15	<i>Helicoverpa zea</i> , gusano elotero	<i>Scirpophaga innotata</i> , barrenador blanco del tallo del arroz
20	<i>Spodoptera frugiperda</i> , gusano cogollero	<i>Cnaphalocrocis medinalis</i> , enrollador de las hojas del arroz
25	<i>Diatraea grandiosella</i> , barrenador del maíz del sudoeste	<i>Chilo plejadellus</i> , barrenador del tallo del arroz
30	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> , taladrador menor del tallo de maíz y arroz	<i>Nymphula depunctalis</i> , gusano envainado
35	<i>Diatraea saccharalis</i> , barrenador de la caña de azúcar	<i>Spodoptera litura</i> , gusano gris del tabaco
40	<i>Heliothis virescens</i> , oruga de la cápsula del algodón	<i>Spodoptera mauritia</i> , gusano soldado del arroz
45	<i>Scirpophaga incertulas</i> , taladrador del arroz amarillo	
50	<i>Chilo polychrysa</i> , chilo	

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 344 691 T3

Lepidoptera	
5 <i>Mythimna separata</i> , cuncunilla de las chacras	<i>Cochylis hospes</i> , polilla de bandas del girasol
10 <i>Chilo partellus</i> , barrenador manchado del tallo del sorgo	<i>Pseudaletia unipunctata</i> , gusano soldado
15 <i>Feltia subterranea</i> , cortador pequeño	<i>Agrotis orthogonia</i> , gusano cortador del oeste
20 <i>Homeosoma electellum</i> , polilla del girasol	<i>Pseudoplusia includens</i> , gusano de la soja
	<i>Anticarsia gemmatalis</i> , oruga azul del frijol
25	<i>Plathypena scabra</i> , gusano verde del trébol

TABLA 2

Coleoptera	
35 <i>Diabrotica virgifera</i> , gusano occidental de la raíz del maíz	<i>Phyllophaga crinita</i> , gusano blanco
40 <i>Diabrotica longicornis</i> , gusano norteño de la raíz del maíz	<i>Melanotus</i> spp., <i>Eleodes</i> , <i>Conoderus</i> , y <i>Aeolus</i> spp., gusanos de alambre
45 <i>Diabrotica undecimpunctata</i> , gusano sureño de la raíz del maíz	<i>Ouelma melanopus</i> , escarabajo del cereal
50 <i>Cyclocephala borealis</i> , escarabajo enmascarado norteño (white grub)	<i>Chaetocnema pulicaria</i> , escarabajo negro del maíz
55 <i>Cyclocephala borealis</i> , escarabajo enmascarado sureño (white grub)	<i>Oulema melanopus</i> , escarabajo del cereal
60 <i>Cyclocephala borealis</i> , escarabajo enmascarado sureño (white grub)	
65	

ES 2 344 691 T3

Coleoptera	
5	<i>Popillia japonica</i> , Hypera punctata, picudo de escarabajo japonés la hoja del trébol
10	<i>Chaetocnema pulicaria</i> , Anthonomus grandis, grillo escarabajo negro del maíz de la cápsula del algodonero
15	<i>Sphenophorus maidis</i> , gorgojo Colaspis brunnea, gusano de del maíz cuerno de la vid
20	<i>Lissorhoptrus oryzophilus</i> , gorgojo acuático del arroz
25	<i>Sitophilus oryzae</i> , gorgojo del arroz
30	<i>Epilachna varivestis</i> , escarabajo mexicano del frijol

TABLA 3

Homoptera	
40	<i>Rhopalosiphum maidis</i> , Pseudatomoscelis seriatus, pulgón del maíz pulga saltona
45	<i>Anuraphis maidiradicis</i> , Trialeurodes abutilonea, pulgón radicular del maíz mosca blanca bandeada
50	<i>Sipha flava</i> , pulgón Nephrotettix nigropictus, amarillo de la caña saltador de hojas del arroz
55	<i>Schizaphis graminum</i> , pulgón Myzus persicae, pulgón verde verde de los cereales del melocotonero
60	<i>Macrosiphum avenae</i> , pulgón Empoasca fabae, chicharrita de la espiga
65	<i>Aphis gossypii</i> , pulgón del algodón

ES 2 344 691 T3

TABLA 4

5	Hemiptera	
	<i>Blissus leucopterus</i>	<i>Acrosternum hilare</i> , chinche
10	<i>leucopterus</i> , chinche	verde hedionda
	<i>Lygus lineolaris</i> , chinche	<i>Euschistus servus</i> , chinche
15	<i>ligus</i> deslustrada	parda hedionda

TABLA 5

20	Orthoptera	
25	<i>Melanoplus femurrubrum</i> , saltamontes de patas rojas	
	<i>Melanoplus sanguinipes</i> , saltamontes migratorio	
30	<i>Melanoplus differentialis</i> , saltamontes diferencial	

TABLA 6

35	Diptera	
40	<i>Hylemya platura</i> , gusano de la semilla	<i>Meromyza americana</i> , gusano del tallo del trigo
45	<i>Agromyza parvicornis</i> , minador de hojas de maíz	<i>Hylemya coarctata</i> , mosca del bulbo del trigo
50	<i>Contarinia sorghicola</i> , mosquita del sorgo	<i>Neolasioptera murtfeldtiana</i> , mosquito de la semilla del girasol
55	<i>Mayetiola destructor</i> , mosca de Hess	
60	<i>Sitodiplosis mosellana</i> , mosquito rojo del trigo	

65

# ES 2 344 691 T3

TABLA 7

5	Thysanoptera
	<i>Anaphothrips obscurus</i> , trips de la hierba
10	<i>Frankliniella fusca</i> , trips del tabaco
	<i>Thrips tabaci</i> , trips de la cebolla
15	<i>Sericothrips variabilis</i> , trips de la soja

La expresión de las secuencias de ácido nucleico de la presente invención produce toxinas que se pueden usar contra insectos lepidópteros, por ejemplo, pero no exclusivamente contra *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).

En una realización preferida, la invención abarca una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que: (a) tiene un complemento que se hibrida con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C; o (b) es isocodificante con la secuencia de nucleótidos de (a); o (c) tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 1; o (d) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 2, donde la expresión de la molécula de ácido nucleico aislada produce actividad de control de insectos. Cuando se expresa en un huésped heterólogo, la molécula de ácido nucleico de SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 3, SEC. ID. N°: 10 y SEC. ID. N°: 31 da lugar a una actividad de control de insectos contra *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol), lo que demuestra que la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 3, SEC. ID. N°: 10 y SEC. ID. N°: 31 es suficiente para dicha actividad de control de insectos.

En una realización, la invención abarca una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Más preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Aún más preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1. Muy preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 o SEC. ID. N°: 3.

En otra realización, la invención abarca una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 1. Más preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 1. Muy preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 3, SEC. ID. N°: 10, SEC. ID. N°: 31 o SEC. ID. N°: 33.

Aún en otra realización, la invención abarca una molécula de ácido nucleico comprendida en un aislado de *Bacillus thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste en C1674, designado como el registro NRRL B-30556; y C536, designado como el registro NRRL B-30557. En una realización preferida, la invención abarca una molécula de ácido nucleico comprendida en un clon de *E. coli* seleccionado del grupo que consiste en pNOV3910, designado como el registro NRRL B-30553; pNOV3911, designado como el registro NRRL B-30552; pNOV3906, designado como el registro NRRL B-30555; pNOV3905, designado como el registro NRRL B-30554; y pNOV3912, designado como el registro NRRL B-30551, cuya expresión produce una toxina insecticida.

La presente invención también abarca una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. NO: 11 o SEC. ID. N°: 32. Muy preferentemente, la molécula de ácido nucleico aislada codifica una toxina que comprende los aminoácidos 661-788 de la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N°: 2.

## ES 2 344 691 T3

La presente invención también abarca vectores recombinantes que comprenden las secuencias de ácido nucleico de la invención. En dichos vectores, las secuencias de ácido nucleico están preferentemente comprendidas en casetes de expresión que contienen elementos reguladores para la expresión de las secuencias de nucleótidos en una célula huésped transgénica capaz de expresar dichas secuencias de nucleótidos. Dichos elementos reguladores comprenden generalmente señales promotoras y de terminación y también comprenden preferentemente elementos que permiten una traducción eficaz de los polipéptidos codificados por las secuencias de ácido nucleico de la presente invención. Los vectores que comprenden las secuencias de ácido nucleico son generalmente capaces de replicarse en células huésped particulares, preferentemente como moléculas extracromosómicas, y se utilizan por consiguiente para amplificar las secuencias de ácido nucleico de esta invención en las células huésped. En una realización, las células huésped para dichos vectores son microorganismos, como bacterias, en particular *E. coli*. En otra realización, las células huéspedes para dichos vectores recombinantes son endófitos o epífitos. Una célula huésped preferida para dichos vectores es una célula eucariota, como una célula de levadura, una célula vegetal o una célula de un insecto. Las células vegetales como las células de maíz o algodón son células huésped muy preferidas. En otra realización preferida, dichos vectores son vectores virales y se usan para la replicación de las secuencias de nucleótidos en células huésped particulares, por ejemplo células de insectos o células vegetales. Los vectores recombinantes también se usan para la transformación de las secuencias de nucleótidos de esta invención en células huésped transgénicas, mediante lo cual las secuencias de nucleótidos se integran establemente en el ADN de dichas células huésped transgénicas. En una realización, dichas células huésped transgénicas son células procariotas. En una realización preferida, dichas células huésped transgénicas son células eucariotas, como células de levadura, células de insectos o células vegetales. En una realización muy preferida, las células huésped transgénicas son células vegetales, como células de maíz o de algodón.

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona toxinas aisladas activas contra el barrenador del maíz europeo producidas por la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención.

En realizaciones preferidas, las toxinas insecticidas de la invención comprenden un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos de la invención. En otra realización preferida, la toxina es producida por un aislado de *Bacillus thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste en C1674, designado como el registro NRRL B-30556; y C536, designado como el registro NRRL B-30557.

En otra realización, las toxinas son producidas por un clon de *E. coli* seleccionado del grupo que consiste en pNOV3910, designado como el registro NRRL B-30553; pNOV3911, designado como el registro NRRL B-30552; pNOV3906, designado como el registro NRRL B-30555; pNOV3905, designado como el registro NRRL B-30554; y pNOV3912, designado como el registro NRRL B-30551. En una realización preferida, la toxina se produce mediante la expresión de la molécula de ácido nucleico que comprende los nucleótidos 1-2367 de SEC. ID. N°: 1 o los nucleótidos 1-2367 de SEC. ID. N°: 3 o los nucleótidos 1-2367 de SEC. ID. N°: 10 o los nucleótidos 1-2367 de SEC. ID. N°: 31.

En otra realización preferida, una toxina aislada de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2. Preferentemente, la toxina aislada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2. Más preferentemente, la toxina aislada comprende una secuencia de aminoácidos con al menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2. Muy preferentemente, la toxina aislada comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 11 o SEC. ID. N°: 32.

Las toxinas de la presente invención tienen actividad de control de insectos cuando se las prueba contra plagas de insectos en bioensayos. En otra realización preferida, las toxinas de la invención son activas contra insectos lepidópteros, preferentemente contra *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol). Las propiedades de control de insectos de las toxinas insecticidas de la invención se ilustran en mayor profundidad en los ejemplos 6, 8, 9 y 13.

La presente invención también abarca toxinas híbridas que son activas contra insectos, donde dichas toxinas híbridas son codificadas por moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que: (a) tiene un complemento que se hibrida con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 en dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C; o (b) es isocodificante con la secuencia de nucleótidos de (a); o (c) comprende una porción de nucleótidos de 20 pares de bases consecutivas idéntica a una porción de nucleótidos de 20 pares de bases consecutivas de una secuencia de nucleótidos de (a) o (b), donde la expresión de la molécula de ácido nucleico da lugar a actividad de control de insectos. En una realización preferida, la toxina híbrida es codificada por el fragmento de ADN de aproximadamente 2.4 kb comprendido en pNOV3912, depositado en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  designada como el registro NRRL B-30551, cuya expresión produce una toxina híbrida insecticida. En este documento se ejemplifica específicamente una toxina híbrida que es codificada por la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC. ID. N°: 10. Cuando se expresa en un huésped heterólogo, la molécula de ácido nucleico de SEC. ID. N°: 10 da lugar a actividad de control de insectos contra *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo), *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora*

*gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol) y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol). Las propiedades de control de insectos de la toxina híbrida de la invención ejemplificada se ilustran en mayor profundidad en el ejemplo 9.

5 La presente invención también abarca toxinas híbridas activas contra insectos que comprenden una región carboxi-terminal de una toxina Vip3 unida en la dirección de amino a carboxi a una región amino-terminal de una toxina Vip3 diferente, donde la región carboxi-terminal comprende los aminoácidos 661-788 de la SEC. ID. N°: 2; y donde la región amino-terminal tiene al menos 85% de identidad, más preferentemente al menos 95% de identidad, muy preferentemente al menos 99% de identidad, con los aminoácidos 1-660 de SEC. ID. N°:7. En una realización preferida, la región carboxi-terminal comprende los aminoácidos 661-788 de SEC. ID. N°: 2, y la región amino-terminal  
10 comprende los aminoácidos 1-660 de SEC. ID. N°: 65. En una realización más preferida, la toxina híbrida comprende los aminoácidos 1-788 de SEC. ID. N°: 11.

#### 15 *Expresión de las secuencias de nucleótidos en huéspedes microbianos heterólogos*

Como agentes biológicos para el control de insectos, las toxinas insecticidas se producen mediante expresión de las secuencias de nucleótidos en células huésped heterólogas capaces de expresar las secuencias de nucleótidos. En una primera realización, se preparan células de *B. thuringiensis* que comprenden modificaciones de una secuencia de nucleótidos de esta invención. Dichas modificaciones abarcan mutaciones o deleciones de elementos reguladores  
20 existentes, conduciendo así a una expresión alterada de la secuencia de nucleótidos, o la incorporación de nuevos elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia de nucleótidos. En otra realización, se agregan otras copias de una o más de las secuencias de nucleótidos a las células de *Bacillus thuringiensis* mediante inserción en el cromosoma o mediante introducción de moléculas que se replican extracromosómicamente que contienen las secuencias de nucleótidos.

25 En otra realización, al menos una de las secuencias de nucleótidos de la invención es insertada en un casete de expresión adecuado, que comprende un promotor y señales de terminación. La expresión de la secuencia de nucleótidos es constitutiva, o utiliza un promotor inducible que responde a diversos tipos de estímulos para iniciar la transcripción. En una realización preferida, la célula en la cual se expresa la toxina es un microorganismo, como un virus, una bacteria o un hongo. En una realización preferida, un virus, como un baculovirus, contiene una secuencia de nucleótidos de la invención en su genoma y expresa grandes cantidades de la toxina insecticida correspondiente luego de la infección de células eucariotas apropiadas que son adecuadas para la replicación del virus y la expresión de la secuencia de nucleótidos. La toxina insecticida producida de esa manera se usa como un insecticida. Alternativamente, se usan baculovirus modificados genéticamente para incluir la secuencia de nucleótidos a fin de infectar insectos *in vivo* y  
30 matarlos mediante expresión de la toxina insecticida o mediante una combinación de infección viral y expresión de la toxina insecticida.

Las células bacterianas también son huéspedes para la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención. En una realización preferida, se usan bacterias simbióticas no patógenas, que son capaces de vivir y replicarse en tejidos vegetales, denominadas endófitos, o bacterias simbióticas no patógenas, que son capaces de colonizar la filosfera o la rizosfera, denominadas epífitos. Dichas bacterias incluyen bacterias de los géneros *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas*. Los hongos simbióticos como *Trichoderma* y *Gliocladium* también son huéspedes posibles para la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención a los mismos efectos.

45 Las técnicas para estas manipulaciones genéticas son específicas de los diferentes huéspedes disponibles y son conocidas en el área. Por ejemplo, los vectores de expresión pKK223-3 y pKK223-2 se pueden usar para expresar genes heterólogos en *E. coli*, ya sea en una fusión transcripcional o de traducción, detrás del promotor *tac* o *trc*. Para la expresión de los operones que codifican muchos ORF, el procedimiento más simple es insertar el operón en un vector como pKK223-3 en una fusión transcripcional, permitiendo la utilización del sitio de unión del ribosoma afín de los genes heterólogos. Las técnicas para la sobreexpresión en especies grampositivas como *Bacillus* también son conocidas en el área y se pueden usar en el contexto de esta invención (Quax *et al.* In: *Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics*, Eds. Baltz *et al.*, American Society for Microbiology, Washington (1993)). Sistemas alternativos para la sobreexpresión dependen por ejemplo, de vectores de levadura e incluyen el uso de *Pichia*, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Sreekrishna, In: *Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics*, Baltz, Hegeman, and Skatrud eds., American Society for Microbiology, Washington (1993); Dequin & Barre, *Biotechnology* L2:173-177 (1994); van den Berg *et al.*, *Biotechnology* 8:135-139 (1990)).

#### 60 *Transformación de plantas*

En una realización particularmente preferida, al menos una de las toxinas insecticidas de la invención se expresa en un organismo superior, por ejemplo una planta. En este caso, las plantas transgénicas que expresan cantidades eficaces de las toxinas se protegen a sí mismas de las plagas de insectos. Cuando el insecto comienza a alimentarse de dicha planta transgénica, también ingiere las toxinas expresadas. Por lo tanto esto impedirá que el insecto siga  
65 mordiendo el tejido vegetal o incluso lo dañará o matará. Una secuencia de nucleótidos de la presente invención se inserta en un casete de expresión, que luego es, preferentemente, integrado establemente en el genoma de dicha planta. En otra realización preferida, la secuencia de nucleótidos se incluye en un virus no patógeno autorreplicativo. Las plantas transformadas de conformidad con la presente invención pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas

e incluyen, pero no exclusivamente, maíz, trigo, cebada, centeno, batata, frijol, guisante, achicoria, lechuga, repollo, coliflor, brócoli, nabo, radicheta, espinaca, espárrago, cebolla, ajo, pimienta, apio, calabaza, zapallo, cáñamo, zucchini, manzana, pera, membrillo, melón, ciruela, cereza, durazno, nectarina, albaricoque, fresa, uva, frambuesa, mora, ananá, aguacate, papaya, mango, banana, soja, tomate, sorgo, caña de azúcar, remolacha azucarera, girasol, colza, clavo de olor, tabaco, zanahoria, algodón, alfalfa, arroz, patata, berenjena, pepino, arábidopsis, y plantas leñosas como coníferas y árboles de hojas caducas.

Una vez que una secuencia de nucleótidos deseada ha sido transformada en una especie particular de planta, se puede propagar en esa especie o se puede trasladar a otras variedades de la misma especie, particularmente comprendidas las variedades comerciales, usando técnicas de propagación convencionales.

Una secuencia de nucleótidos de esta invención se expresa preferentemente en plantas transgénicas, causando por lo tanto la biosíntesis de la toxina correspondiente en las plantas transgénicas. De esta manera, se generan plantas transgénicas con mayor resistencia a los insectos. Para su expresión en plantas transgénicas, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden requerir modificación y optimización. Aunque en muchos casos se pueden expresar en plantas, en altos niveles, genes de organismos microbianos sin modificación, puede darse una baja expresión en plantas transgénicas de secuencias de nucleótidos microbianos que tengan codones que no son los preferidos de las plantas. Se sabe en el área que todos los organismos tienen preferencias específicas por el uso de codones, y los codones de las secuencias de nucleótidos descritos en esta invención se pueden cambiar para que estén de acuerdo con las preferencias de la planta, manteniendo simultáneamente los aminoácidos codificados por ellos. Además, se logra mejor una alta expresión en las plantas, a partir de secuencias de codificación que tengan al menos 35% de contenido de GC, preferentemente más de aproximadamente 45%, más preferentemente más de aproximadamente 50%, y muy preferentemente más de aproximadamente 60%. Las secuencias de nucleótidos microbianas que tienen bajo contenido de GC se pueden expresar poco en plantas, debido a la existencia de motivos ATTTA que muchos desestabilizan los mensajes, y motivos AATAAA que pueden causar una poliadenilación inadecuada. Aunque las secuencias preferidas de genes se pueden expresar adecuadamente tanto en especies de plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, las secuencias se pueden modificar para que tengan en cuenta las preferencias específicas de codones y las preferencias de contenido de GC de las monocotiledóneas o dicotiledóneas ya que se ha observado que estas preferencias difieren (Murray *et al.* Nucl. Acids Res. 17:477-498 (1989)). Además, las secuencias de nucleótidos se analizan para determinar la existencia de sitios de empalme ilegítimos que puedan causar un corte del mensaje. Todos los cambios que se requiera hacer dentro de las secuencias de nucleótidos como los descritos antes, se hacen usando técnicas bien conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, PCR y construcción de genes sintéticos usando los métodos descritos en las solicitudes de patente publicadas EP 0 385 962 (para Monsanto), EP 0 359 472 (para Lubrizol, y WO 93/07278 (para Ciba-Geigy).

En una realización de la invención los genes sintéticos se preparan de acuerdo con el procedimiento divulgado en la patente de los Estados Unidos 5,625,136, que se incorpora en este documento por referencia. En este procedimiento, se usan los codones preferidos del maíz, es decir el codón único que codifica con mayor frecuencia ese aminoácido en el maíz. El codón preferido del maíz para un aminoácido particular se puede derivar, por ejemplo, de secuencias de genes conocidas del maíz. El uso del codón del maíz para 28 genes de plantas de maíz se encuentra en Murray *et al.*, Nucleic Acids Research 17:477-498 (1989), cuya divulgación se incorpora en este documento por referencia. Las secuencias sintéticas de la presente invención, específicamente ejemplificadas, preparadas con codones optimizados para maíz, se exponen en SEC. ID. N°: 3 y SEC. ID. N°: 33.

De esta manera, las secuencias de nucleótidos se pueden optimizar para su expresión en cualquier planta. Se reconoce que toda o cualquier parte de la secuencia de genes se puede optimizar o puede ser sintética. Es decir, también se pueden usar secuencias sintéticas o parcialmente optimizadas.

Para una iniciación eficaz de la traducción, las secuencias adyacentes a la metionina de iniciación pueden requerir modificación. Por ejemplo, pueden ser modificadas mediante inclusión de secuencias que se sabe que son eficaces en plantas. Joshi sugirió una secuencia consenso adecuada para plantas (NAR 15:6643-6653 (1987)) y Clonetech sugirió otra secuencia consenso iniciadora de la traducción (1993/1994 catálogo, página 210). Estas secuencias consenso son adecuadas para usar con las secuencias de nucleótidos de esta invención. Las secuencias se incorporan en construcciones que comprenden las secuencias de nucleótidos, hasta e incluido el ATG (dejando sin embargo el segundo aminoácido sin modificar), o alternativamente hasta e incluido el GTC subsiguiente al ATG (con la posibilidad de modificar el segundo aminoácido del transgén).

Los nuevos genes de toxinas *vip3* de la presente invención, ya sea en su secuencia nativa o como secuencias sintéticas optimizadas según se describió antes, pueden fusionarse operativamente a una diversidad de promotores para la expresión en plantas, incluidos los promotores constitutivos, inducibles, temporalmente regulados, desarrolladamente regulados, químicamente regulados, preferidos por el tejido y promotores específicos de tejido para preparar moléculas de ADN recombinante, es decir, genes quiméricos. La elección del promotor variará dependiendo de los requisitos temporales y espaciales para la expresión, y dependiendo también de las especies blanco. Por consiguiente, se prefiere la expresión de las secuencias de nucleótidos de esta invención en hojas, en pedúnculos o tallos, en panochas, en inflorescencias (por ejemplo espigas, panojas, mazorcas, etc.), en raíces y/o almácigos. En muchos casos, sin embargo, se procura la protección contra más de un tipo de plagas de insectos y por consiguiente es deseable la expresión en múltiples tejidos. Aunque muchos promotores de las dicotiledóneas han demostrado ser operativos en monocotiledóneas y viceversa, idealmente los promotores de las dicotiledóneas se seleccionan para la expresión en dicotiledóneas y



## ES 2 344 691 T3

los promotores de monocotiledóneas para la expresión en monocotiledóneas. Sin embargo, no existe restricción para la procedencia de los promotores seleccionados; es suficiente que sean operativos en la conducción de la expresión de las secuencias de nucleótidos en la célula deseada.

5 Los promotores constitutivos preferidos comprenden los promotores CaMV 35S y 19S (Fraley *et al.*, Patente de los Estados Unidos N° 5,352,605 emitida el 4 octubre de 1994). Otro promotor preferido deriva de cualquiera de los varios genes de la actina, que se expresan en la mayoría de los tipos celulares. Los casetes de expresión de promotores descritos por McElroy *et al.* (Mol. Gen. Genet. 231: 150-160 (1991)) se pueden modificar fácilmente para la expresión de los nuevos genes de toxina y son particularmente adecuados para usar en huéspedes monocotiledóneas.

10 Aún otro promotor constitutivo preferido se deriva de la ubiquitina, que es otro producto génico que se sabe que se acumula en muchos tipos de células. Se clonó un promotor de la ubiquitina de varias especies para usar en plantas transgénicas, por ejemplo, girasol (Binet *et al.*, 1991. Plant Science 79: 87-94), maíz (Christensen *et al.*, 1989. Plant Molec. Biol. 12: 619-632), y arábidopsis (Norris *et al.* 1993. Plant Molec. Biol. 21:895-906). El promotor de la ubiquitina de maíz se desarrolló en sistemas de monocotiledóneas transgénicos y su secuencia y los vectores construidos para la transformación de monocotiledóneas se divulgan en la publicación de patente EP 0 342 926. El promotor de la ubiquitina es adecuado para la expresión del nuevo gen de toxina en plantas transgénicas, especialmente en monocotiledóneas.

20 Los promotores específicos de tejido o preferenciales de tejido, útiles para la expresión en plantas de los nuevos genes de toxina de la invención, particularmente maíz, son los que dirigen la expresión a la raíz, la médula, la hoja o el polen. Dichos promotores se divulgan en WO 93/07278, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad. Otros promotores específicos de tejido útiles en la presente invención, comprenden el promotor de la rubisco de algodón divulgado en la patente de los Estados Unidos 6,040,504; el promotor de la sacarosa sintasa del arroz divulgado en la patente de los Estados Unidos 5,604,121; y el promotor del virus del rizado de hoja amarilla de *Cestrum* divulgado en WO 01/73087, todas incorporadas en este documento por referencia. Promotores químicamente inducibles, útiles para dirigir la expresión en plantas del nuevo gen de toxina se divulgan la patente de los Estados Unidos 5,614,395 que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

30 Las secuencias de nucleótidos de esta invención también se pueden expresar bajo la regulación de promotores que son regulados químicamente. Esto permite que las toxinas Vip3 se sinteticen sólo cuando las plantas de cultivo se tratan con los productos químicos inductores. La tecnología preferida para la inducción química de la expresión de genes se detalla en la solicitud de patente publicada EP 0 332 104 (para Ciba-Geigy) y en la patente de los Estados Unidos 5,614,395. Un promotor preferido para la inducción química es el promotor PR-1a del tabaco.

35 Una categoría preferida de promotores es aquella que es inducible por lesión. Se han descrito muchos promotores que se expresan en sitios donde hay una lesión y también en sitios de infección por fitopatógenos. Idealmente, un promotor de ese tipo sólo se activará localmente en los sitios de infección, y de esa manera las toxinas insecticidas se acumularán únicamente en las células que necesiten sintetizar las toxinas insecticidas para matar la plaga de insectos invasora. Los promotores preferidos de este tipo abarcan los descritos por Stanford *et al.* Mol. Gen. Genet. 215:200-208 (1989), Xu *et al.* Plant Molec. Biol. 22:573-588 (1993), Logemann *et al.* Plant Cell 1:151-158 (1989), Rohrmeier & Lehle, Plant Molec. Biol. 22:783-792 (1993), Firek *et al.* Plant Molec. Biol. 22:129-142 (1993), y Warner *et al.* Plant J. 3:191-201 (1993).

45 Los patrones de expresión específica de tejido que se prefieren comprenden la expresión específica en el tejido verde, específica en la raíz, específica en el tallo y específica en las flores. Los promotores adecuados para la expresión en tejido verde comprenden muchos que regulan genes implicados en la fotosíntesis y muchos de éstos fueron clonados tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas. Un promotor preferido es el promotor PEPC del maíz del gen de la fosfoenol carboxilasa (Hudspeth & Grula, Plant Molec. Biol. 12:579-589 (1989)). Un promotor preferido para la expresión específica en raíz es el descrito por Framond (FEBS 290:103-106 (1991); EP 0 452 269 para Ciba-Geigy). Un promotor preferido específico del tallo es el descrito en la patente de los Estados Unidos 5,625,136 (para Ciba-Geigy) y que conduce la expresión del gen *trpA* del maíz.

55 Otras realizaciones preferidas son plantas transgénicas que expresan las secuencias de nucleótidos de manera inducible por una lesión o inducible por una infección por patógenos.

Además de la selección de un promotor adecuado, las construcciones para la expresión de una toxina insecticida en plantas requieren que un terminador de la transcripción adecuado se una secuencia abajo de la secuencia de nucleótidos heteróloga. Se dispone de varios de dichos terminadores y son conocidos en el área (p. ej. tml de CaMV, E9 de rbcS).  
60 Cualquier terminador disponible que se sepa que actúa en plantas se puede usar en el contexto de esta invención.

Se pueden incorporar otras varias secuencias en los casetes de expresión descritos en esta invención. Éstos incluyen secuencias que demostraron que aumentan la expresión como las secuencias de intrones (por ejemplo de *Adhl* y *bronzel*) y las secuencias líderes virales (por ejemplo de TMV, MCMV Y AMV).

65 Puede ser preferible dirigir la expresión de la secuencia de nucleótidos de la presente invención a diferentes localizaciones celulares en la planta. En algunos casos, puede ser deseable la localización en el citosol, en tanto que en

otros casos, puede ser preferible la localización en algún organelo subcelular. La localización subcelular de enzimas codificadas por el transgén se emprende usando técnicas bien conocidas en el área. Típicamente, el ADN que codifica el péptido blanco a partir de un producto genético conocido dirigido por un organelo se manipula y fusiona secuencia arriba de la secuencia de nucleótidos. Muchas de esas secuencias blanco se conocen a partir del cloroplasto y se ha demostrado su funcionamiento en construcciones heterólogas. La expresión de las secuencias de nucleótidos de la presente invención también es dirigida al retículo endoplasmático o a las vacuolas de las células huésped. Las técnicas para lograr esto son bien conocidas en el área.

Los expertos en el área de transformación de plantas conocen numerosos vectores de transformación disponibles para la transformación de plantas, y las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden usar conjuntamente con dichos vectores. La selección del vector dependerá de la técnica de transformación preferida y de la especie vegetal blanco de la transformación. Para determinadas especies blanco, pueden ser preferibles diferentes marcadores de selección antibióticos o herbicidas. Los marcadores de selección que se usan corrientemente incluyen el gen *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina y los antibióticos relacionados (Messing & Vierra., 1982. Gene 19: 259-268; y Bevan *et al.*, 1983. Nature 304:184-187), el gen *bar*, que confiere resistencia al herbicida fosfotricina (White *et al.*, 1990. Nucl. Acids Res 18: 1062, y Spencer *et al.*, 1990. Theor. Appl. Genet 79: 625-631), el gen *hph*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4: 2929-2931), y el gen *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Bourouis *et al.*, 1983. EMBO J. 2(7): 1099-1104), el gen EPSPS, que confiere resistencia al glifosato (patentes de los Estados Unidos N° 4,940,935 y 5,188,642) y el gen de la manosa-6-fosfato isomerasa, que proporciona la capacidad de metabolizar manosa (patentes de los Estados Unidos N° 5,767,378 y 5,994,629). La elección de los marcadores seleccionables no es, sin embargo, fundamental para la invención.

En otra realización preferida, una secuencia de nucleótidos de la presente invención es transformada directamente en el genoma del plástido. Una ventaja importante de la transformación del plástido es que los plástidos son capaces en general de expresar genes bacterianos sin una modificación sustancial, y los plástidos son capaces de expresar muchos marcos de lectura abiertos bajo el control de un solo promotor. La tecnología de transformación de plástidos se describe extensamente en la patente de los Estados Unidos N° 5,451,513, 5,545,817 y 5,545,818, en la solicitud PCT N° WO 95/16783, y en McBride *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 7301-7305. La técnica básica para la transformación de cloroplastos implica la introducción de regiones del ADN del plástido clonado que flanquean un marcador seleccionable junto con el gen de interés en un tejido blanco adecuado, por ejemplo, usando biobalística o transformación de protoplastos (p. ej., transformación mediada por cloruro de calcio o PEG). Las regiones flanqueantes de 1 a 1.5 kb, denominadas secuencias de acceso, facilitan la recombinación homóloga con el genoma del plástido y de esta manera permiten el reemplazo o la modificación de regiones específicas del plástido. Inicialmente, se utilizan mutaciones puntuales en los genes ARN r 16S y rps12 del cloroplasto que confieren resistencia a la espectinomomicina y/o estreptomomicina como marcadores seleccionables para la transformación (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., y Maliga, P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8526-8530; Staub, J. M., y Maliga, P. (1992) Plant Cell 4, 39-45). Esto da lugar a transformantes homoplásmicos estables a una frecuencia de aproximadamente una por 100 bombardeos de hojas blanco. La presencia de sitios de clonación entre esos marcadores permitió la creación de un vector dirigido del plástido para la introducción de genes extraños (Staub, J.M., and Maliga, P. (1993) EMBO J. 12, 601-606). Se obtienen aumentos sustanciales en la frecuencia de transformación mediante el reemplazo de los genes de resistencia a antibióticos recesivos del ARN r o proteína-r con un marcador seleccionable dominante, el gen bacteriano *aadA* que codifica la enzima desintoxicante de espectinomomicina aminoglucósido-3'-adeniltransferasa (Svab, Z., y Maliga, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90, 913-917). Previamente, este marcador fue utilizado con éxito para la transformación de alta frecuencia del genoma del plástido del alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Goldschmidt-Clermont, M. (1991) Nucl. Acids Res. 19:4083-4089). Otros marcadores seleccionables útiles para la transformación de plástidos son conocidos en el área y están comprendidos por el campo de acción de la invención. Típicamente, se requieren aproximadamente de 15 a 20 ciclos de división celular luego de la transformación para alcanzar el estado homoplásmico. La expresión del plástido, en el cual se insertan genes mediante recombinación homóloga en todas las miles de copias del genoma circular del plástido presente en cada célula vegetal, aprovecha la ventaja de la enorme cantidad de copias respecto a los genes expresados a nivel nuclear para permitir niveles de expresión que puedan exceder fácilmente el 10% de la proteína vegetal soluble total. En una realización preferida, una secuencia de nucleótidos de la presente invención se inserta en un vector de acceso de plástidos y se transforma en el genoma del plástido de una planta huésped deseada. Se obtienen plantas homoplásmicas para genomas del plástido que contienen una secuencia de nucleótidos de la presente invención, y son preferentemente capaces de una elevada expresión de la secuencia de nucleótidos.

#### *Combinaciones de principios activos para control de insectos*

Las toxinas plaguicidas de la invención se pueden usar en combinación con  $\delta$ -endotoxinas de Bt u otros principios activos plaguicidas, para aumentar el rango de plagas blanco. Por otra parte, el uso de las toxinas plaguicidas de la invención en combinación con  $\delta$ -endotoxinas de Bt u otros principios activos plaguicidas de distinta naturaleza, tiene una utilidad particular para la prevención y/o el manejo de la resistencia a los insectos.

Las diversas proteínas cristalinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* fueron clasificadas basándose en su espectro de actividad y similitud de secuencia. La clasificación propuesta por Hofte and Whiteley, Microbiol. Rev. 53: 242-255 (1989) colocó las proteínas cristalinas insecticidas conocidas en cuatro clases principales. Generalmente, las clases principales se definen por el espectro de actividad, siendo las proteínas Cry1 activas contra Lepidoptera, las proteínas

Cry2 activas contra Lepidoptera y Diptera, las proteínas Cry3 activas contra Coleoptera y las proteínas Cry4 activas contra Diptera.

Dentro de cada clase principal, las  $\delta$ -endotoxinas se agrupan de acuerdo con la similitud de secuencia. Las proteínas Cry1 son producidas típicamente como proteínas protoxina de 130-140 kDa que se escinden proteolíticamente para producir toxinas activas que son de aproximadamente 60-70 kDa. La porción activa de las  $\delta$ -endotoxinas reside en la porción NH<sub>2</sub>-terminal de la molécula completa. Hofte y Whiteley, mencionados antes, clasificaron las proteínas Cry1 que se conocían entonces en seis grupos, 1Aa, 1Ab, 1Ac, 1B, 1C y 1D. Desde entonces, las proteínas clasificadas como Cry1Ea, Cry1Fa, Cry9A, Cry9C y Cry9B, al igual que otras, también fueron caracterizadas.

El espectro de actividad insecticida de una  $\delta$ -endotoxina individual de *Bacillus thuringiensis* tiende a ser bastante estrecho, siendo una determinada  $\delta$ -endotoxina activa sólo contra unos pocos insectos. La especificidad es el resultado de la eficacia de los diversos pasos involucrados en la producción de una proteína toxina activa y su subsiguiente capacidad para interactuar con las células epiteliales del aparato digestivo del insecto. En una realización preferida, la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención en plantas transgénicas es acompañada por la expresión de una o más  $\delta$ -endotoxinas de Bt. Las  $\delta$ -endotoxinas de Bt particularmente preferidas son las que se divulgan en la patente de los Estados Unidos 5,625,136, que se incorpora en este documento por referencia.

Es bien sabido que muchas proteínas  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* se expresan en realidad como protoxinas. Estas protoxinas se solubilizan en el ambiente alcalino del intestino del insecto y son convertidas proteolíticamente por proteasas en un fragmento central tóxico (Hofte and Whiteley, Microbiol. Rev. 53: 242-255 (1989)). Para las proteínas  $\delta$ -endotoxinas de la clase Cry1, el fragmento central tóxico se ubica en la mitad N-terminal de la protoxina. Está comprendido por el campo de acción de la presente invención que genes que codifican la forma completa de la protoxina o el fragmento central tóxico truncado de las nuevas proteínas toxina se pueden usar en vectores de transformación de plantas para conferir a la planta huésped propiedades insecticidas.

Otros principios activos insecticidas incluyen inhibidores de la proteasa (tanto de los tipos serina como cisteína), lectinas,  $\alpha$ -amilasa, peroxidasa y colesterol oxidasa. Otros genes Vip, como *vip1A(a)* y *vip2A(a)* como los divulgados en la patente de los Estados Unidos N° 5,849,870 e incorporada en este documento por referencia, también son útiles en la presente invención.

Esta coexpresión de más de un principio activo insecticida en la misma planta transgénica se puede lograr modificando genéticamente una planta para que contenga y exprese todos los genes necesarios. Alternativamente, una planta, antecesor 1, puede ser modificada genéticamente para que exprese los genes de la presente invención. Una segunda planta, antecesor 2, se puede modificar genéticamente para que exprese un principio activo para el control de insectos complementario. Cruzando el antecesor 1 con el antecesor 2, se obtienen plantas de progenie que expresan todos los genes introducidos en los antecesores 1 y 2.

La presente invención abarca además variantes de las moléculas de ácido nucleico divulgadas. Las secuencias variantes naturales se pueden identificar y/o aislar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, como, por ejemplo, técnicas de PCR e hibridación como se ilustra a continuación.

Las secuencias de nucleótidos *vip3* variantes incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, como las generadas, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio o las preparadas mediante cambio del dominio entero, pero que igual presentan actividad plaguicida. Los métodos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en el área. Consulte, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) Methods in Enzymol. 154:367-382; patente de los Estados Unidos N° 4,873,192; Walker y Gaastra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, Nueva York) y las referencias citadas allí. Generalmente, una secuencia de nucleótidos de la invención tendrá al menos 80%, preferentemente 85%, 90%, 95%, hasta 98% o más de identidad de secuencia con su respectiva secuencia de nucleótidos *vip3* de referencia, y tendrá actividad plaguicida.

Las secuencias de nucleótidos *vip3* variantes también comprenden secuencias derivadas de un procedimiento mutagénico o de recombinación génica como barajado del ADN. Con dicho procedimiento, se pueden recombinar una o más secuencias *vip3* diferentes de la presente invención, por ejemplo, pero no exclusivamente, *vip3C(a)*, *vip3C(b)*, *vip3A-C* Y *vip3C-12168* juntas o con otras secuencias *vip3* o secuencias relacionadas, por ejemplo, pero no exclusivamente, *vip3A* (SEC. ID. N°: 4), *vip3B* (SEC. ID. N°: 6) y *vip3Z* (SEC. ID. N°: 8), para crear nuevas moléculas de ácido nucleico *vip3* que codifiquen toxinas Vip3 que posean las propiedades deseadas. De esta manera, se generan genotecas de polinucleótidos *vip3* recombinantes a partir de una población de polinucleótidos *vip3* relacionados por la secuencia, que comprenden regiones de la secuencia que tienen una identidad de secuencia sustancial y que pueden ser recombinadas homológamente *in vitro* o *in vivo*. Las estrategias para dicho barajado del ADN son bien conocidas en el área. Consulte, por ejemplo, Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751; Stemmer (1994) Nature 370:389-391; Cramer *et al.* (1997) Nature Biotech. 15:436-438; Moore *et al.* (1997) J. Mol. Biol. 272:336-347; Zhang *et al.* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 94:4504-4509; Cramer *et al.* (1998) Nature 391:288-291; solicitud de patente internacional WO 99/57128 y patentes de los Estados Unidos N° 5,605,793, 5,837,458 y 6,335,179.

Los métodos de mutagénesis como los divulgados en este documento se pueden combinar con métodos de cribado de alto rendimiento, para detectar la actividad plaguicida de polipéptidos Vip3 clonados sometidos a mutagénesis en

## ES 2 344 691 T3

células huésped. Las moléculas de ADN sometidas a mutagénesis que codifican polipéptidos Vip3 activos (p. ej., secretados y detectados por anticuerpos; o insecticidas en un bioensayo para insectos) se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando procedimientos estándar. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido Vip3 de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

Se criban las genotecas de genes *vip3* recombinantes que son producidas usando métodos de barajado del ADN para identificar aquellos que presentan mejores propiedades para usar en la protección de plantas contra plagas. Entre las propiedades por las cuales el barajado del ADN es útil para obtener mejores genes *vip3* de resistencia a las plagas son: mayor potencia contra una plaga blanco, mayor rango de plagas blanco, menor susceptibilidad al desarrollo de resistencia por parte de las plagas, mayor nivel de expresión, mayor resistencia a la degradación por proteasas, mayor estabilidad en condiciones ambientales y baja toxicidad para la planta huésped. Usando una estrategia de cribado adecuada, se pueden obtener simultáneamente o secuencialmente genes *vip3* que estén optimizados para más de una propiedad.

El barajado del ADN es útil para obtener genes *vip3* de resistencia a las plagas que codifiquen toxinas que tengan una mayor potencia contra una plaga blanco. Una vez que se completa el barajado del ADN, se criba la genoteca resultante de los genes *vip3* barajados, para identificar los que tienen una mayor actividad plaguicida. Una manera de realizar este cribado es clonar la región de los genes *vip3* barajados que codifica la proteína en un vector de expresión adecuado para expresar los genes en una célula huésped elegida como, por ejemplo, *E. coli* o una cepa menos cristalina de *Bacillus thuringiensis*. Un experto reconocerá las ventajas y desventajas de usar alguno de estos dos sistemas de expresión. Por ejemplo, el *Bacillus thuringiensis* será más deseable para producir proteínas Vip3 secretadas. Si se desea, los clones se pueden someter a un cribado preliminar, por ejemplo, mediante inmunoensayo, para identificar los que producen una proteína Vip3 del tamaño correcto. Los que son positivos en el cribado preliminar después se analizan en un cribado funcional para identificar los genes *vip3* barajados que codifican una toxina que tiene la actividad potenciada deseada.

Se puede usar un ensayo de insectos completo para determinar la toxicidad. En esos ensayos, las toxinas Vip3 expresadas a partir de genes *vip3* barajados se colocan en la dieta del insecto, por ejemplo, dieta artificial o tejido de la planta, y son consumidas por el insecto blanco. Los clones que provocan una inhibición del crecimiento o la mortalidad del insecto blanco pueden ser analizados en bioensayos posteriores para determinar la potencia. Los genes *vip3* barajados que codifican toxinas con mayor potencia pueden ser identificados como los que tienen una menor CE<sub>50</sub> (concentración de toxina necesaria para reducir el crecimiento del insecto en 50%) y/o CL<sub>50</sub> (concentración de toxina necesaria para causar un 50% de mortalidad).

También se pueden usar ensayos *in vitro* para cribar genotecas de genes *vip3* barajados. Dichos ensayos implican típicamente el uso de células de insectos cultivadas que sean sensibles a las toxinas Vip3, y/o células que expresen un receptor para las toxinas Vip3, ya sea naturalmente o como resultado de la expresión de un gen heterólogo. Se pueden usar otros ensayos *in vitro*, por ejemplo, la detección de cambios morfológicos en las células, tinciones y etiquetas útiles para detectar la muerte celular, o detección de la liberación de ATPasa por las células. Un ejemplo de un ensayo *in vitro* adecuado usando células de insectos cultivadas para determinar la toxicidad Vip3 es con células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). Sf9 es muy que sensible a las toxinas Vip3. Cuando las toxinas Vip3 se mezclan con las células Sf9, la membrana celular se torna muy permeable a las moléculas pequeñas. Cuando se agrega un colorante como azul de tripano a la suspensión de células, las células que mata la toxina Vip3 se tiñen de azul. Por lo tanto, la toxicidad de la toxina Vip3 se puede determinar por análisis de imagenología.

Otros ensayos *in vitro* que implican el uso de receptores para las toxinas Vip3. Uno de dichos receptores se divulga en la patente de los Estados Unidos 6,291,156, incorporada en este documento por referencia. La proteína del receptor Vip3 se puede inmovilizar en una superficie receptora, por ejemplo, pero no exclusivamente, una placa de 96 pocillos con una membrana de nitrocelulosa y exponer a clones que comprendan los genes *vip3* barajados. Por lo tanto, los genes *vip3* barajados que codifican toxinas funcionales se pueden identificar basándose en la afinidad de unión al receptor Vip3. Además, el gen que codifica el receptor Vip3 se puede transformar en una línea celular que no sea sensible a Vip3, por ejemplo la línea celular Schneider 2 (S2) *Drosophila*, usando métodos conocidos en el área (consulte por ejemplo, Clem y Miller, 1194, Mol. Cel. Biol. 14:5212-522). Las células S2 transformadas se pueden exponer después a clones que comprenden los genes *vip3* barajados. Por lo tanto, los genes *vip3* barajados que codifican toxinas funcionales se pueden identificar basándose en la inducción de la muerte celular.

### Ejemplos

La invención se describirá en mayor profundidad por referencia a los ejemplos detallados siguientes. Las técnicas estándar de recombinación del ADN y clonación molecular utilizadas en este documento son bien conocidas en el área y son descritas por Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); J. Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> Ed, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001); y por T.J. Silhavy, M.L. Berman, y L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

## ES 2 344 691 T3

### Ejemplo 1

#### Identificación de aislados de *Bt* que albergan proteínas *Vip3* homólogas

5 Tres conjuntos de cebadores de PCR, cuyas secuencias se basan en el gen *vip3A* (SEC. ID. N°: 5), se usaron en una reacción de PCR para amplificar fragmentos de posibles genes *vip3* homólogos de aislados de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Los tres conjuntos de cebadores utilizados fueron:

10 1F: 5'-ATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGCACAAGAGCC-3' (SEC.  
ID. N°: 12)

15 1R: 5'-CTCAACATAGAGGTAATTTTAGGTAGATATAGCCG-3' (SEC.  
ID. N°: 13)

20 p3: 5'-GATGATGGGGTGTATATGCCGTTAG-3' (SEC. ID. N°:  
14)

25 p4: 5'-AATAAATTGTGAAATTCCTCCGTCC-3' (SEC. ID. N°:  
15)

30 4F: 5'-AGTCAAAATGGAGATCAAGGTTGGGGAGATAAC-3' (SEC.  
ID. N°: 16)

35 4R: 5'-TTACTTAATAGAGAGATCGTGGAAATGTACAATA-3' (SEC.  
ID. N°: 17)

40 Se esperaban tres productos de PCR si un aislado de *Bt* comprendía un gen idéntico al gen *vip3A* (SEC. ID. N°: 4). El tamaño del producto de PCR generado por los conjuntos de cebadores 1F/1R, p3/p4 y 4F/4R fue de 377 bp, 344 bp y 419 bp, respectivamente. Los aislados que produjeron sólo uno o dos productos de PCR, lo que indicaba que podían comprender un gen *vip3* con alguna diferencia en la secuencia con *vip3A*, fueron sometidos a otro análisis de secuencia.

### 45 Ejemplo 2

#### Clonación y secuenciación de productos de PCR para confirmar secuencias homólogas de *Vip3*

50 Los aislados de *Bt* identificados en el ejemplo 1 como productores de uno o dos productos de PCR se sometieron nuevamente a PCR con el conjunto de cebadores 1F/1R (SEC. ID. N°: 12/SEC. ID. N°: 13) así como con los dos cebadores siguientes:

55 p5: 5'- AATGGAGATGAAGCTTGGGGAGAT-3' (SEC. ID. N°:  
18)

60 p6: 5'-CGTGGAAATGTACAATAGGACCACC-3' (SEC. ID. N°:  
19)

65 Los productos de PCR se clonaron después en un vector pCR2.1-Topo (Invitrogen) y se secuenciaron usando procedimientos corrientes.

Se identificaron tres aislados de *Bt* que comprendían genes *vip3* homólogos, designados *vip3C*, con diferencias significativas en la secuencia respecto a *vip3A*. Estos aislados de *Bt* se designaron C536, C1674 y AB727.

## ES 2 344 691 T3

### Ejemplo 3

#### Clonación por PCR del gen *vip3C* completo

5 El extremo 3' del gen *vip3C* se obtuvo por PCR usando ADN plasmídico total aislado de *Bt* cepa C536 o C1674 como molde. Los cebadores utilizados fueron:

Vip3CF4: 5'-GTTTAGAAGATTTTCAAACCATTAC-3' (SEC. ID.  
10 N°: 20)

T7: 5'-TTAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC. ID. N°: 21)

15 El cebador T7 es un cebador que no es específico del gen que reconoce la secuencia de nucleótidos flanqueante 3' para el gen *vip3C*

20 Los productos de PCR se clonaron y secuenciaron usando procedimientos corrientes. El gen *vip3C* final completo se obtuvo por PCR usando dos cebadores ubicados en los extremos 3' y 5' de *vip3C*:

Vip3Cc: 5' TTTATTTAATAGAAACGTTTCAAATGATATATG-3'  
25 (SEC. ID. N°: 22)

Vip3Cn: 5'-CACCATGAACAAGAATAACTAAATTAAGCACAAAGAG-  
30 3' (SEC. ID. N°: 23)

35 Se obtuvieron dos genes *vip3C* completos. El gen *vip3C* del aislado de *Bt* C536 se designó *vip3C(a)*, y el gen *vip3C* aislado de C1674 se designó *vip3C(b)*. *Vip3C(a)* y *vip3C(b)* difieren en un nucleótido en la posición 2213 (véase SEC. ID. N°: 1), donde *vip3C(a)* comprende el nucleótido "a" en la posición 2213, codificando por lo tanto el aminoácido Glu en la posición 738 de SEC. ID. N°: 2, y donde *vip3C(b)* comprende el nucleótido "g" en la posición 2213, codificando por lo tanto Gly en la posición 738 de SEC. ID. N°: 2.

40 Los genes *vip3C(a)* y *vip3C(b)* se clonaron cada uno en los vectores de expresión pET101/D-Topo y se designaron pNOV3911 y pNOV3910, se depositaron en células DH5 $\alpha$  de *E. coli*, y obtuvieron los números de registro NRRL B-30552 y NRRL B-30553, respectivamente.

### Ejemplo 4

#### Clonación con cósmido del gen *vip3Z* completo

45 Se aisló el ADN total de AB727 tratando células recién cultivadas resuspendidas en Tris 100 mM de pH 8, EDTA 10 mM con 2 mg/ml de lisozima durante 30 minutos a 37°C. Se le agregó proteinasa K a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml en SDS al 1%, EDTA 50 mM, urea 1 M y se incubó 55°C. Se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La muestra se mezcló suavemente durante 5 minutos y se centrifugó a 3 K. Esto se  
50 repitió dos veces. Después la fase acuosa se mezcló con 0.7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó. El sedimento de ADN se lavó tres veces con etanol al 70% y se resuspendió suavemente en 0.5 X TE. Se trataron 12  $\mu$ g de ADN con 0.3 unidades de *Sau3A* por  $\mu$ g de ADN a 37°C en un volumen de 100  $\mu$ l. Se tomaron muestras a intervalos de 2 minutos durante 10 minutos. Después se agregó un volumen 1/10 de 10 X TE y las muestras se calentaron durante  
55 30 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Las muestras se sometieron a electroforesis para determinar qué fracción estaba en el rango de 40 kb y esta muestra se usó en la ligación.

60 El vector cósmido SuperCos (Stratagene, La Jolla, CA) se preparó según describe el fabricante utilizando el sitio de clonación *BamHI*. El SuperCos preparado a 100 ng/ml se ligó con el ADN AB727 previamente digerido con *Sau3A* en una proporción de 2:1 en un volumen de 5  $\mu$ l durante toda la noche a 6°C. La mezcla de ligación se empacó usando Gigapack XL III (Stratagene) según describe el fabricante. Los fagos empacados se infectaron en células de *E. coli* XL-1MR (Stratagene) según describe el fabricante. La genoteca de cósmidos se sembró en placas de L-agar con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina que se incubaron 16 horas a 37°C. Se repicaron 200 colonias y se cultivaron para detectar la presencia del gen *vip3Z*.

65 Los 200 clones de cósmido se analizaron por PCR para detectar la presencia del gen *vip3Z* usando el cebador Vip3ZA: 5'-GGCATTTATGGATTTGCCACTGGTATC-3' (SEC. ID. N°: 28) y el cebador Vip3ZB: 5'-TCCTTTGATACGCAGGTGTAATTCAG-3' (SEC. ID. N°: 29).

## ES 2 344 691 T3

Se demostró que un clon de cósmido, designado 5g, comprendía el gen *vip3Z* (SEC. ID. N°: 8) que codifica la proteína Vip3Z (SEC. ID. N°: 9).

### 5 Ejemplo 5

#### *Construcción del gen vip3C optimizado para maíz*

Se preparó un gen *vip3C* optimizado para maíz de acuerdo con el procedimiento divulgado en la patente de los Estados Unidos 5,625,136, incorporada en este documento por referencia. En este procedimiento, se usan los codones preferidos del maíz, es decir, el codón único que codifica con mayor frecuencia ese aminoácido en el maíz. El codón preferido del maíz para un aminoácido particular se deriva de secuencias de genes conocidas del maíz. El uso del codón del maíz para 28 genes de plantas de maíz se encuentra en Murray *et al.* (1989, Nucleic Acids Res. 17:477-498).

Se prepararon los genes *vip3C(a)* y *vip3C(b)* sintéticos que codifican la secuencia de aminoácidos descrita en SEC. ID. N°: 2. En las posiciones 2213 y 2214 de SEC. ID. N°: 3, el gen sintético *vip3C(a)* comprende nucleótidos “a” y “g”, respectivamente, que codifican el aminoácido Glu en la posición 738 de SEC. ID. N°: 2, y el gen sintético *vip3C(b)* comprende nucleótidos “g” y “a”, respectivamente, que codifican el aminoácido Gly en la posición 738 de SEC. ID. N°: 2. Los genes sintéticos *vip3C(a)* y *vip3C(b)* se clonaron por separado en los vectores de expresión pET101/D-Topo y los vectores resultantes se designaron pNOV3905, que se depositó en células BL21 de *E. coli* y obtuvo el número de registro NRRL B-30554, y pNOV3906, que se depositó en células BL21 de *E. coli* y obtuvo el número de registro NRRL B-30555.

### 25 Ejemplo 6

#### *Bioensayo de la proteína Vip3C*

Se vertió la dieta del gusano cortador grasiento (BioServ, Frenchtown, NJ) en placas de Petri de 50 mm. La dieta se dejó enfriar y se agregaron con pipeta 200 µl de suspensión de células de *E. coli* que comprendían pNOV3905, pNOV3906, pNOV3910 o pNOV3911 sobre la superficie de la dieta. La solución se dispersó uniformemente con un asa bacteriana de modo que la suspensión cubriera toda la superficie de la dieta. La superficie se dejó secar bien. Se colocaron larvas de primer instar de las especies de lepidópteros indicadas en la tabla siguiente con un cepillo de punta fina. Cada especie se analizó por separado. Se registró la mortalidad de las larvas, al igual que la ocurrencia de inhibición de la alimentación y el crecimiento, 3 días y 5 días después de la infección de la dieta con las larvas. Una muestra que contenía células de *E. coli* sin un vector de expresión actuó como control negativo. La proteína Vip3A también se puede analizar en el mismo bioensayo con fines comparativos o para este ejemplo, los datos de Vip3C se compararon con el espectro de actividad conocida de Vip3A.

Los resultados se muestran en la tabla 8. La actividad insecticida se observó cinco días después de que se infectaran las placas con los insectos. Los datos muestran que Vip3C(a) (de pNOV3911 y pNOV3905) y Vip3C(b) (de pNOV3910 y 3906) tienen un espectro de actividad más amplio que la toxina Vip3A. Las pruebas también indicaron que la toxina Vip3C no es activa contra el insecto beneficioso para el ambiente *Danaus plexippus*.

TABLA 8

Insecto probado	Mortalidad del insecto en %		Espectro de actividad
	Vip3C(a)	Vip3C(b)	Vip3A <sup>b</sup>
<i>Agrotis ipsilon</i>	100	100	+
<i>Helicoverpa zea</i>	75 <sup>a</sup>	75 <sup>a</sup>	+
<i>Heliothis virescens</i>	80	50	+
<i>Spodoptera exigua</i>	100	100	+
<i>Spodoptera</i>	70 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	+

ES 2 344 691 T3

Insecto probado	Mortalidad del insecto en %		Espectro de actividad de
	Vip3C (a)	Vip3C (b)	Vip3A <sup>b</sup>
<i>frugiperda</i>			
<i>Trichoplusia ni</i>	100	100	+
<i>Pectinophora gossypiella</i>	50 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	+
<i>Cochylis hospes</i>	90	90	+
<i>Homeosoma electellum</i>	40 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	+
<i>Ostrinia nubilalis</i>	100	100	-
<i>Plutella xylostella</i>	100	100	-

<sup>a</sup>Se observó que los insectos sobrevivientes tenían una severa inhibición de la alimentación y el crecimiento.  
<sup>b</sup>A "+" indica una especie de insecto que es sensible a Vip3A. A "-" indica una especie de insecto poco sensible o no sensible a Vip3A.

Ejemplo 7

Creación de plantas de maíz transgénico que contienen el gen *vip3C*

Se eligió *vip3C* optimizado para maíz (SEC. ID. N°: 3) para la transformación en plantas de maíz. Se transfirió un casete de expresión que contenía la secuencia *vip3C(a)* a un vector adecuado para la transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*. Para este ejemplo, un casete de expresión comprendió además del gen *vip3C(a)*, el promotor de la ubiquitina del maíz y el terminador nos que son conocidos en el área, al igual que el gen de la fosfomanosa isomerasa (PMI) para la selección de líneas transgénicas (Negrotto *et al.* (2000) Plant Cell Reports 19: 798-803). El vector resultante se designó pNOV2149 (SEC. ID. N°: 30).

La transformación de embriones de maíz inmaduros se realizó esencialmente según describen Negrotto *et al.*, 2000, Plant Cell Reports 19: 798-803. Para este ejemplo, todos los constituyentes de los medios fueron los descritos en Negrotto *et al.* mencionado antes. No obstante, se pueden sustituir diversos constituyentes de los medios por otros conocidos.

La cepa LBA4404 (pSB1) de *Agrobacterium* que contenía el plásmido de transformación de la planta se cultivó en medio sólido YEP (extracto de levadura (5 g/L), peptona (10 g/L), NaCl (5 g/L), agar 15 g/L, pH 6.8) durante 2-4 días a 28°C. Aproximadamente 0.8 X 10<sup>9</sup> *Agrobacterium* se suspendieron en medio LS-inf complementado con As 100 µM (Negrotto *et al.*, (2000) Plant Cell Rep 19: 798-803). Las bacterias se indujeron previamente en este medio durante 30-60 minutos.

Los embriones inmaduros del genotipo de maíz A188 se separaron de la espiga a los 8-12 días de vida y se colocaron en LS-inf + As 100 µM. Los embriones se enjuagaron con medio de infección recién preparado. Después se agregó solución de *Agrobacterium* y los embriones se agitaron por vórtice durante 30 segundos y se los dejó sedimentar con las bacterias durante 5 minutos. Los embriones se transfirieron después con el escudante hacia arriba



## ES 2 344 691 T3

a medio LSAs y se cultivaron en la oscuridad durante dos o tres días. A continuación, se transfirieron entre 20 y 25 embriones por placa de Petri a medio LSDc complementado con cefotaxima (250 mg/l) y nitrato de plata (1.6 mg/l) y se cultivaron en la oscuridad a 28°C durante 10 días.

5 Los embriones inmaduros que produjeron callos embriogénicos se transfirieron a medio LSD 1 M 0.5 S. Los cultivos se seleccionaron en este medio durante 6 semanas con un paso de subcultivo a las 3 semanas. Los callos sobrevivientes se transfirieron a medio Reg1 complementado con manosa. Después de cultivar en la luz (régimen de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad), se transfirieron los tejidos verdes a medio Reg2 sin reguladores del crecimiento y se incubaron durante 1 a 2 semanas. Se transfirieron las plántulas a cajas Magenta GA-7 (Magenta Corp, Chicago Ill.)  
 10 que contenían medio Reg3 y se cultivaron en la luz. Después de 2 a 3 semanas, se analizaron las plantas por PCR para determinar la presencia de genes PMI y del gen *vip3C(a)*. Las plantas positivas en el ensayo de PCR se transfirieron al invernadero y se les analizó la resistencia a las plagas de lepidópteros.

### 15 Ejemplo 8

#### *Análisis de plantas de maíz transgénico*

20 Las plantas se muestrearon a medida que eran trasplantadas desde las cajas Magenta GA-7 al suelo. El muestreo consistió en cortar dos pequeños trozos de hojas (aprox. 2-4 cm de longitud) y colocar cada trozo en una placa de Petri pequeña. Los controles negativos fueron o bien plantas transgénicas con resultado de PCR negativo para el gen *vip3C(a)* del mismo experimento, o plantas no transgénicas (de un tamaño similar al de las plantas de prueba) que estaban siendo cultivadas en el fitotrón.

25 Se inocularon muestras de hojas de cada planta con barrenador del maíz europeo (*Ostrinia nubilalis*) o con gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) colocando 10 larvas de primer instar en cada trozo de hoja. Luego las placas de Petri se sellaron ajustadamente.

30 A los 3-4 días de la inoculación se recogieron los datos. El porcentaje de mortalidad de las larvas se calculó junto con una evaluación visual del daño de las hojas. El daño por alimentación se calificó como alto, moderado, bajo o ausente y se le dio un valor numérico de 3, 2, 1 o 0, respectivamente.

35 Los resultados que se muestran en la tabla 9 indican que las plantas de maíz transgénico comprenden el gen *vip3C(a)* y expresan la proteína *Vip3C(a)*, son insecticidas para el barrenador del maíz europeo (ECB, por sus siglas en inglés) y para el gusano cogollero (FAW, por sus siglas en inglés).

TABLA 9

40	Suce	N° de	Mortalida	Clasificaci	Mortalidad	Clasificaci
	so	plant	d del ECB	ón del daño	del FAW	ón del daño
		a				
45	557	12A	80%	2	100%	0
	557	20B	100%	1	100%	0
	557	8A	80%	1	70%	0
50	557	11A	100%	2	100%	0
	557	16B	95%	2	95%	0
55	557	18B	90%	2	100%	0
	557	14B	100%	1	100%	0
60	556	1A	100%	1	100%	0
	556	3B	80%	1	100%	0
	556	4A	95%	1	100%	0
65	556	13A	100%	1	100%	0

ES 2 344 691 T3

Suceso	Nº de planta	Mortalidad del ECB	Clasificación del daño	Mortalidad del FAW	Clasificación del daño
A188	NEG	0	10	0%	10

Ejemplo 9

*Toxinas Vip3 híbridas*

Vip3C es tóxica para *Ostrinia nubilalis* (barrenador del maíz europeo) y *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), en tanto que las toxinas homólogas a Vip3, por ejemplo, Vip3A(a), Vip3A(b) y Vip3A(c) no lo son. Vip3C y Vip3A difieren principalmente en la región C-terminal de sus respectivas secuencias de aminoácidos particularmente en la región desde el aminoácido 661 al aminoácido 788 de la SEC. ID. Nº: 2. Para demostrar que esta región C-terminal de Vip3C es la porción de la toxina Vip3C responsable de la actividad contra el barrenador del maíz europeo y la palomilla dorso de diamante, una toxina híbrida que comprendía la región C-terminal de Vip3C, desde el número de aminoácido 661 al número de aminoácido 788 de SEC. ID. Nº: 2, se juntó en la dirección de amino a carboxi con la región N-terminal, desde el número de aminoácido 1 al número de aminoácido 660 de SEC. ID. Nº: 5, de Vip3A. Esta toxina híbrida se designó Vip3A-C.

Se construyó una molécula de ácido nucleico que codificaba la toxina híbrida Vip3A-C, usando dos pasos de PCR con los cebadores siguientes:

Vip3A-N: 5'-ACCATGAACAAGAATAATACTAAATTAAGCACAAGAG-3' (SEC. ID. Nº: 24)

Vip3A2050: 5'-TAAAGTTATCTCCCCAAGCTTCATCTCCA-3' (SEC. ID. Nº: 25)

Vip3C-C1: 5'-AATGGAGATGAAGCTTGGGGAGAT-3' (SEC. ID. Nº: 26)

Vip3C-C2: 5'-TTTATTTAATAGAAACGTTTTCAAATGATATATG-3' (SEC. ID. Nº: 27)

En el primer paso de PCR se usaron los cebadores Vip3A-N (SEC. ID. Nº: 24) y Vip3A2050 (SEC. ID. Nº: 25) para generar un fragmento de aproximadamente 2.0 kb del extremo 5' del gen *vip3A*, que codifica la región N-terminal, y se usaron los cebadores Vip3C-C1 (SEC. ID. Nº: 26) y Vip3C-C2 (SEC. ID. Nº: 27) para generar un fragmento de aproximadamente 0.4 kb del extremo 3' del gen *vip3C*, que codifica la región C-terminal. En el segundo paso de PCR, estos dos fragmentos se combinaron como moldes para los cebadores Vip3A-N (SEC. ID. Nº: 24) y Vip3C-C2 (SEC. ID. Nº: 27) para generar un gen híbrido *vip3A-vip3C* de aproximadamente 2.4, designado *vip3A-C*.

Se preparó un gen híbrido *vip3A-vip3C(b)*, cuya secuencia se expone en SEC. ID. Nº: 10. El gen híbrido *vip3A-C* se clonó en pET101D (Novagen), y el vector resultante se designó pNOV3912, y se transformó en DH5 $\alpha$  de *E. coli* para la expresión. Este clon de *E. coli*, (NRRL B-30551), se volvió a probar contra las especies de insectos indicadas en la tabla 10. Se usó la proteína Vip3C como control comparativo. Los datos se compararon con el espectro de actividad conocido de Vip3A.

Los resultados que se muestran en la tabla 10 confirman que la región C-terminal de Vip3C, desde el número de aminoácido 661 al número de aminoácido 788 de SEC. ID. Nº: 2, es suficiente para conferir actividad contra el barrenador del maíz europeo y la palomilla dorso de diamante a la toxina híbrida.

ES 2 344 691 T3

TABLA 10

Insecto probado	Mortalidad del insecto en %		Espectro de actividad
	Vip3A-C	Vip3C(b) <sup>b</sup>	Vip3A <sup>c</sup>
<i>Agrotis ipsilon</i>	100	100	+
<i>Helicoverpa zea</i>	100	75 <sup>a</sup>	+
<i>Heliothis virescens</i>	60	50	+
<i>Spodoptera exigua</i>	80	100	+
<i>Spodoptera frugiperda</i>	70 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	+
<i>Trichoplusia ni</i>	80	100	+
<i>Pectinophora gossypiella</i>	80	60 <sup>a</sup>	+
<i>Cochylis hospes</i>	100	90	+
<i>Homeosoma electellum</i>	40 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	+
<i>Ostrinia nubilalis</i>	100	100	-
<i>Plutella xylostella</i>	100	100	-

<sup>a</sup>Se observó que los insectos sobrevivientes tenían una severa inhibición de la alimentación y el crecimiento.

<sup>b</sup>Datos del ejemplo 6

<sup>c</sup>A "+" indica una especie de insecto que es sensible a Vip3A. A "-" indica una especie de insecto poco sensible o no sensible a Vip3A.

Ejemplo 10

*Recombinación in vitro de genes vip3 por barajado del ADN*

5 Uno de los genes *vip3* de la presente invención (SEC. ID. N°: 1, 3 o 11) se amplifica por PCR. El fragmento de ADN resultante es digerido mediante tratamiento con DNasaI esencialmente según se describe en Stemmer *et al.*, PNAS 91: 10747-10751 (1994), y los cebadores de PCR se separan de la mezcla de reacción. Se lleva a cabo una reacción de PCR sin cebadores seguida de una reacción de PCR con cebadores, ambas según se describe en Stemmer *et al.* (1994). Los fragmentos de ADN resultantes se clonan en pTRC99a (Pharmacia, N° de cat.: 27-5007-01) y se transforman en *E. coli* cepa SASX38 mediante electroporación usando el pulsador de genes Biorad y las condiciones del fabricante. Las bacterias transformadas se cultivan en medio durante toda la noche y se les determina su actividad insecticida.

15 En una reacción similar, fragmentos de ADN amplificados por PCR que comprenden uno de los genes *vip3* descritos en este documento (SEC. ID. N°: 1, 3, 5, 7, 9 o 11, o sus mutantes), y fragmentos de ADN amplificados por PCR que comprenden al menos uno de los otros genes *vip3* descritos en este documento (o sus mutantes) se recombinan *in vitro* y se recuperan las variantes resultantes con mayores propiedades insecticidas según se describe a continuación.

20 Para aumentar la diversidad de la genoteca de genes *vip3* barajados, un gen o genes *vip3* (denominados genes primarios) se barajan usando barajado de oligonucleótidos sintéticos. Se sintetizan múltiples oligonucleótidos (p. ej., 2, 5, 10, 20, 50, 75 o 100 o más) correspondientes a la al menos una región de diversidad. Esos oligonucleótidos se pueden barajar directamente o se pueden recombinar con una o más de las familias de ácido nucleicos.

25 La secuencia de oligonucleótidos se puede tomar de otros genes *vip3* denominados genes secundarios. Los genes secundarios tienen un cierto grado de homología con los genes primarios. Existen varias maneras de seleccionar partes de los genes secundarios para la síntesis de oligonucleótidos. Por ejemplo, se pueden seleccionar porciones de genes secundarios al azar. El proceso de barajado del ADN seleccionará los oligonucleótidos que se pueden incorporar en los genes barajados.

30 Las porciones seleccionadas pueden ser de cualquier longitud en tanto sean adecuadas para sintetizar. Los oligonucleótidos también se pueden designar basándose en la homología entre los genes primarios y secundarios. Es necesario un cierto grado de homología para el cruzamiento, que debe ocurrir entre los fragmentos de ADN durante el barajado. Al mismo tiempo, se desea una gran heterogeneidad para la diversidad de la genoteca de genes barajados. Por otra parte, se puede seleccionar una porción específica de los genes secundarios para la síntesis de oligonucleótidos basándose en el conocimiento sobre la relación entre la secuencia de la proteína y la función.

35 La presente invención ha divulgado que el dominio C-terminal de Vip3 es en parte responsable del espectro de actividad de las toxinas Vip3. Cuando el espectro insecticida es modificado por la invención en curso utilizando la tecnología de barajado del ADN, la región C-terminal de la secuencia de nucleótidos de los genes secundarios se puede seleccionar como una región blanco para sintetizar oligonucleótidos utilizados en un procedimiento de barajado de oligonucleótidos.

40 Dado que la actividad insecticida de la proteína Vip3 depende, al menos en parte, de la región N-terminal, la región N-terminal de los genes secundarios se puede seleccionar para barajado de oligonucleótidos a fin de obtener una mayor actividad insecticida.

45 En un aspecto, los genes primarios *vip3C(a)* y *vip3C(b)* se barajan con varios oligonucleótidos que son sintetizados basándose en la secuencia del gen secundario *vip3A*. *Vip3C(a)* y *vip3C(b)* son muy homólogos, pero *vip3A* es sustancialmente diferente de esos genes. Por consiguiente, es deseable barajar *vip3A* junto con *vip3C(a)* y *vip3C(b)* para aumentar la diversidad de los ácidos nucleicos recombinantes barajados resultantes. Se seleccionan porciones de la secuencia *vip3A*, que son sustancialmente diferentes de las porciones correspondientes de *vip3C(a)* y *vip3C(b)*, y se sintetiza una serie de oligonucleótidos de 50-mer que cubren esas porciones. Esos oligonucleótidos se barajan con *vip3C(a)* y *vip3C(b)*. Luego se selecciona una cierta cantidad de clones de la genoteca de genes barajados y se examinan para determinar la diversidad por mapeo de restricción. Se prevé que la diversidad sea mayor que la normalmente esperada para el barajado de *vip3C(a)* y *vip3C(b)* solos.

Ejemplo 11

60 *Detección de alto rendimiento de actividad insecticida*

65 Se criban genotecas de genes *vip3* barajados en *E. coli* o en *Bacillus thuringiensis* para determinar la actividad insecticida. Se repican colonias con un Q-bot (Beckman), se colocan en un medio de cultivo en un formato estándar de 96 pocillos y se cultivan durante toda la noche. Cada clon se distribuye en una capa sobre la superficie de la dieta de un insecto en un formato de 96 pocillos y se deja secar la superficie. Opcionalmente, se agregan mezclas de células transformadas a cada pocillo para aumentar la cantidad de clones probados en la ronda de cribado inicial. Por ejemplo, cribar 100 clones por pocillo y usar 10 000 pocillos proporciona un cribado de 10<sup>6</sup> clones.

## ES 2 344 691 T3

Se agregan varias larvas neonatas de un insecto blanco, por ejemplo, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* o *Spodoptera frugiperda*, a cada pocillo. La placa se cubre con una membrana permeable al aire que retenga las larvas en los pocillos en los cuales fueron colocadas. Después de 5 días los pocillos se evalúan para determinar la cantidad de dieta consumida y o la mortalidad del insecto. Los clones de los pocillos que indican que se consumió poca dieta o nada y/o aquellos en los que se observa una gran mortalidad del insecto se seleccionan para análisis posteriores. Se debería encontrar que varios clones tienen mayor actividad contra el insecto blanco.

### Ejemplo 12

#### Clonación con cósmido del gen *vip3C* completo

Se aisló el ADN total de C1674 (NRRL B-30556) tratando células recién cultivadas resuspendidas en Tris 100 mM de pH 8, EDTA 10 mM con 2 mg/ml de lisozima durante 30 minutos a 37°C. Se le agregó proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml en SDS al 1%, EDTA 50 mM, urea 1 M y se incubó 55°C. Se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La muestra se mezcló suavemente durante 5 minutos y se centrifugó a 3 K. Esto se repitió dos veces. Después la fase acuosa se mezcló con 0.7 volúmenes de isopropanol y se centrifugó. El sedimento de ADN se lavó tres veces con etanol al 70% y se resuspendió suavemente en 0.5 X TE. Se trataron 12 µg de ADN con 0.3 unidades de *Sau3A* por µg de ADN a 37°C en un volumen de 100 µl. Se tomaron muestras a intervalos de 2 minutos durante 10 minutos. Después se agregó un volumen 1/10 de 10 X TE y las muestras se calentaron durante 30 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Las muestras se sometieron a electroforesis para determinar qué fracción estaba en el rango de 40 kb y esta muestra se usó en la ligación.

El vector cósmido SuperCos (Stratagene, La Jolla, CA) se preparó según describe el fabricante utilizando el sitio de clonación *BamHI*. El SuperCos preparado a 100 ng/ml se ligó con el ADN de C1674 previamente digerido con *Sau3A* en una proporción de 2:1 en un volumen de 5 µl durante toda la noche a 6°C. La mezcla de ligación se empacó usando Gigapack XL III (Stratagene) según describe el fabricante. Los fagos empacados se infectaron en células de *E. coli* XL-1MR (Stratagene) según describe el fabricante. La genoteca de cósmidos se sembró en placas de L-agar con 50 µg/ml de kanamicina que se incubaron 16 horas a 37°C. Se repicaron 200 colonias y se cultivaron para detectar la presencia del gen *vip3C*.

Los 200 clones de cósmido se analizaron por PCR para detectar la presencia del gen *vip3C* usando los cebadores específicos de *vip3C*.

Se demostró que dos clones de cósmido contenían la secuencia de codificación de *vip3C*. Después de varias corridas de secuenciación se confirmó que la secuencia era la secuencia que se expone en SEC. ID. N°: 31. Esta secuencia de codificación de *vip3C* se designó *vip3C*-12168 y codifica la proteína Vip3C-12168 (SEC. ID. N°: 32).

### Ejemplo 13

#### Bioensayo de Vip3C-12168

Se analizaron células de *E. coli* que comprendían un vector de expresión (pTrcHis; Invitrogen) que contenía la secuencia de codificación de *vip3C*-12168 para determinar la actividad biológica usando el protocolo descrito en el ejemplo 6. Las especies de insectos probadas fueron: barrenador del maíz europeo (ECB), gusano cogollero (FAW), gusano cortador grasiento (BCW), gusano cogollero del tabaco (TBW) y gusano elotero (CEW). Se registró la mortalidad de las larvas, al igual que la ocurrencia de inhibición de la alimentación y el crecimiento, 7 días después de la infección de la dieta con las larvas. Una muestra que contenía células de *E. coli* con un vector de expresión vacío (pTrcHis) actuó como control negativo. Las células de *E. coli* que expresan la  $\delta$ -endotoxina CryIAb y las células de *E. coli* que expresan la proteína Vip3A también se analizaron en el mismo bioensayo para comparar el espectro de actividad.

Los resultados se muestran en la tabla 11. Los datos muestran que Vip3C-12168 tiene el mismo espectro de actividad que una combinación de CryIAb y Vip3 A.

ES 2 344 691 T3

TABLA 11

5	Tratamiento	Mortalidad en %				
		ECB	FAW	BCW	TBW	CEW
10	Cry1Ab	100	0	10	0 <sup>a</sup>	8
	Vip3A	0	100	100	83 <sup>b</sup>	100
15	Vip3C-12168	100	100	100	92 <sup>b</sup>	100
	PTrcHis (vector vacío)	0	0	10	0	8
20	<sup>a</sup> Inhibición del crecimiento; <sup>b</sup> Inhibición de la alimentación					

25 Ejemplo 14

*Vp3C-12168 optimizado para maíz*

30 Una secuencia de codificación de *vip3C-12168* optimizado para maíz se designó de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 5. La secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación de *vip3C-12168* optimizado para maíz se muestra en SEC. ID. N°: 33.

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 344 691 T3

### REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina que es activa contra el barrenador del maíz europeo, donde dicha secuencia de nucleótidos:
- (a) tiene una secuencia complementaria que se hibrida con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID N°:1 en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C; o
  - 10 (b) es isocodificante con la secuencia de nucleótidos de (a); o
  - (c) tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 1; o
  - 15 (d) codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 91% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 2.
- 20 2. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°:1 o SEC. ID. N°: 3.
3. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 3, SEC. ID. N°: 10, SEC. ID. N°: 31 o SEC. ID. N°: 33.
- 25 4. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 11 o SEC. ID. N°: 32.
5. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha toxina comprende los aminoácidos 681-788 de la secuencia de aminoácidos de SEC. ID. N°: 2.
- 30 6. Un gen quimérico que comprende una secuencia promotora heteróloga unida operativamente a la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector recombinante que comprende el gen quimérico de la reivindicación 6.
- 35 8. Una célula huésped transgénica que comprende el gen quimérico de la reivindicación 6.
9. La célula huésped transgénica de acuerdo con la reivindicación 8, que es una célula bacteriana.
- 40 10. La célula huésped transgénica de acuerdo con la reivindicación 8, que es una célula vegetal.
11. Una planta transgénica que comprende la célula vegetal transgénica de la reivindicación 10.
12. Una semilla transgénica de la planta transgénica de la reivindicación 11, donde la semilla transgénica comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 45 13. Una toxina aislada que es activa contra el barrenador del maíz europeo, donde el extremo C-terminal de dicha toxina comprende los aminoácidos 661-788 de SEC. ID. N°: 2, y dicha toxina comprende una secuencia de aminoácidos que:
- 50 a) tiene al menos 91% de identidad con SEC. ID. N°: 2; o
  - b) es producida por la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tienen una secuencia complementaria que se hibrida con los nucleótidos 1981-2367 de SEC. ID. N°: 1 en 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), NaPO<sub>4</sub> 0.5 M, EDTA 1 mM a 50°C con lavado en 0.1 X SSC, SDS al 0.1% a 65°C; o
  - 55 c) es producida por la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es isocodificante con la secuencia de nucleótidos de (b); o
  - 60 d) es producida por la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con SEC. ID. N°: 1.
- 65 14. La toxina aislada de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en SEC. ID. N°: 2, SEC. ID. N°: 11 o SEC. ID. N°: 32.

## ES 2 344 691 T3

15. La toxina aislada de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicha toxina es producida por la expresión de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC. ID. N°: 1, SEC. ID. N°: 3, SEC. ID. N°: 10, SEC. ID. N°: 31 o SEC. ID. N°: 33.

5 16. La toxina aislada de acuerdo con la reivindicación 13 o una toxina codificada por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha toxina tiene actividad contra un insecto lepidóptero seleccionado del grupo que consiste en *Plutella xylostella* (palomilla dorso de diamante), *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Agrotis ipsilon* (gusano cortador grasiento), *Helicoverpa zea* (gusano elotero), *Heliothis virescens* (gusano cogollero del tabaco), *Spodoptera exigua* (gusano soldado de la remolacha), *Pectinophora gossypiella* (lagarta rosada), *Trichoplusia ni* (gusano falso medidor de la col), *Cochylis hospes* (polilla de bandas del girasol), y *Homeosoma electellum* (polilla del girasol).

15 17. La toxina aislada de acuerdo con la reivindicación 13 o una toxina codificada por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha toxina es producida por una cepa de *Bacillus thuringiensis* seleccionada del grupo que consiste en C1674, designada como registro NRRL B-30556; y C536, designada como registro NRRL B-30557.

20 18. La toxina aislada de acuerdo con la reivindicación 13 o una toxina codificada por una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha toxina es producida por un clon de *E. coli* seleccionado del grupo que consiste en pNOV3910, designado como registro NRRL B-30553; pNOV3911, designado como registro NRRL B-30552; pNOV3906, designado como registro NRRL B-30555; pNOV3905, designado como registro NRRL B-30554; y pNOV3912, designado como registro NRRL B-3055 1.

25 19. Una composición que comprende una cantidad eficaz para controlar insectos de la toxina de acuerdo con la reivindicación 13.

30 20. Un método para producir una planta transgénica resistente a los insectos, que comprende introducir la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 en una célula vegetal; y regenerar una planta transformada a partir de dicha célula vegetal, donde dicha planta transformada es resistente a los insectos.

21. Un método para controlar un insecto que comprende suministrar a dicho insecto una cantidad eficaz de la toxina de acuerdo con la reivindicación 13.

35 22. Una toxina híbrida activa contra el barrenador del maíz europeo, que comprende una región carboxi-terminal de una toxina Vip3 unida en la dirección de amino a carboxi a una región amino-terminal de una toxina Vip3 diferente, donde dicha región carboxi-terminal comprende los aminoácidos 661-788 de la SEC. ID. N°: 2; y donde dicha región amino-terminal tiene al menos 85% de identidad con los aminoácidos 1-660 de SEC. ID. N°: 7.

40

45

50

55

60

65



# ES 2 344 691 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> syngenta Participations AG  
Shen, Zhicheng  
5 Warren, Gregory  
Shotkoski, Frank  
Kramer, Vance

<120> Nuevas toxinas Vip3 y métodos de uso

<130> 60163PCT

<150> US 60/362250  
15 <151> 2002-03-06

<160> 33

20 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1  
<211> 2367  
25 <212> ADN  
<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>  
30 <221> característica\_misc  
<222> (1)..(2367)  
<223> Secuencia de codificación de vip3C nativa.  
35 Una "r" en la posición 2213 representa el nucleótido g o a.

<400> 1

40 atgaacaaga ataatactaa attaagcaca agagccctac cgagttttat tgattatfff 60  
aatggcattt atggatttgc cactgggtatc aaagacatta tgaatatgat ttttaaacg 120  
gatacagggtg gtaatctaac cttagacgaa atcctaaga atcagcagtt actaaatgag 180  
45 atttctggta aattggatgg ggtaaatggg agcttaaatg atcttatcgc acagggaaac 240  
ttaaatacag aattatctaa ggaaatctta aaaatcgaa atgaacagaa tcaagtetta 300  
aatgatgta ataacaaact cgatgcgata aatacgatgc ttcatatata tctacctaaa 360  
attacatcta tgtaagtga tgtaatgaag caaaattatg cgctaagtct gcaaatagaa 420  
50 tacttaagta agcaattgca agaaatttct gataaattag atattattaa cgtaaatggt 480  
cttattaact ctacacttac tgaaattaca cctgcatatc aacggattaa atatgtgaat 540  
gaaaanttg aagaattaac ttttgcata gaaaccactt taaaagtana aaaggatagc 600  
55 tgcctgctg atattcttga tgagttaact gaattaactg aactagcgaa aagtgttaca 660  
aaaaatgacg ttgatggtt tgaattttac cttaatacat tccacgatgt aatggtagga 720  
aataatttat tcgggcgttc agctttaaaa actgcttcag aattaattgc taagaaaaat 780  
60 gtgaaaacaa gtggcagtga agtaggaaat gtttataatt tcttaattgt attaacagct 840  
ctacaagcaa aagcttttct tactttaaca acatgccgaa aattattagg cttagcaggt 900  
attgattata cttctattat gaatgaacat ttaataaagg aaaaagagga atttagagta 960

65

ES 2 344 691 T3

aacatccttc ctacaacttc taatactttt tctaatecta attatgcaaa agttaaagga 1020  
 aqtagatgaag atgcaagat gattgtggaa gctaaaccag gacatgcatt ggttggttc 1080  
 5 gaaatgagca atgattcaat cacagtatta aaagtatatg aggctaagct aaaacaaat 1140  
 tatcaagttg ataaggattc cctatcggag gttatttatg gtgatacgga taaattattt 1200  
 tgtccagatc aatctgaaca aatatattat acaataaca tagtattccc aatgaatat 1260  
 gtaattacta aaattgattt cactaaaaaa atgaaaactt taagatatga ggtaacagcg 1320  
 10 aatttttatg attcttctac aggagaaatt gacttaaata agaaaaaagt agaatcaagt 1380  
 gaagcggagt atagaacggt aagtgctaata gatgatggag tgtatatgcc attagtygtc 1440  
 atcagtgaaa catTTTTgac tccgataaat gggtttgcc tccaagctga tgaaaattca 1500  
 15 agattaatta ctttaacatg taaatcatat ttaagagaac tactgctagc aacagactta 1560  
 agcaataaag aaactaaatt gatcgtccca ccaagtggtt ttattagcaa tattgtagag 1620  
 aacgggtcca tagaagagga caatttagag ccgtggaaag caaataataa gaatcgtat 1680  
 20 gtagatcata caggcggagt gaatggaact aaagctttat atgttcataa ggacggagga 1740  
 ttttcacaaat ttattggaga taagttaaaa ccgaaaactg agtatgtaat ccaatatact 1800  
 gttaaaggaa aaccttctat tcatttaaaa gatgaaaata ctggatatac tcattatgaa 1860  
 25 gatcaaaata ataatttaa agattatcaa actattacta aacgttttac tacaggaact 1920  
 gatttaaagg gagtgtattt aattttaaaa agtcaaatg gagatgaagc ttggggagat 1980  
 aaatttacia ttttagaaat taagcctgag gaggatttat taagcccaga attaattaat 2040  
 30 ccgaattctt ggattacgac tccaggggct agcatttcag gaaataaact tttcattaac 2100  
 ttggggacaa atgggacctt tagacaaagt ctttcattaa acagttattc aacttatagt 2160  
 ataagcttta ctgcatcagg accatttaat gtgacggtaa gaaattctag ggragtatta 2220  
 35 tttgaacgaa gcaaccttat gtcttcaact agtcatattt ctgggacatt caaaactgaa 2280  
 tccaataata ccggattata tgtagaactt tcccgtcgtc ctggtggtgg tggatcata 2340  
 40 tcatttgaaa acgtttctat taaataa 2367

<210> 2

<211> 788

45 <212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

50 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(788)

<223> Toxina Vip3C

55 Xaa en la posición 738 es el aminoácido Glu o el aminoácido Gly.

60

65

ES 2 344 691 T3

<400> 2

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe

5

1 5 10 15

10

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
20 25 30

15

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu  
35 40 45

20

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys  
50 55 60

25

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn  
65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln  
85 90 95

30

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
100 105 110

Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
115 120 125

35

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val  
145 150 155 160

40

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
165 170 175

45

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
180 185 190

Thr Leu Lys Val Lys Lys Asp Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu  
195 200 205

50

Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
210 215 220

55

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly  
225 230 235 240

Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile  
245 250 255

60

Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
260 265 270

65

ES 2 344 691 T3

5           Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr  
                   275                                   280                                   285  
  
 10          Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Gly Ile Asp Tyr Thr  
                   290                                   295                                   300  
  
 15          Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
                   305                                   310                                   315                                   320  
  
 20          Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala  
                                   325                                   330                                   335  
  
 25          Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys  
                                   340                                   345                                   350  
  
 30          Pro Gly His Ala Leu Val Gly Phe Glu Met Ser Asn Asp Ser Ile Thr  
                                   355                                   360                                   365  
  
 35          Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp  
                   370                                   375                                   380  
  
 40          Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Thr Asp Lys Leu Phe  
                   385                                   390                                   395                                   400  
  
 45          Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe  
                                   405                                   410                                   415  
  
 50          Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys  
                                   420                                   425                                   430  
  
 55          Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly  
                                   435                                   440                                   445  
  
 60          Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr  
                   450                                   455                                   460  
  
 65          Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val  
                   465                                   470                                   475                                   480  
  
 70          Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala  
                                   485                                   490                                   495  
  
 75          Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
                                   500                                   505                                   510  
  
 80          Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
                   515                                   520                                   525  
  
 85  
  
 90  
  
 95

ES 2 344 691 T3

5 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile  
 530 535 540

5 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 545 550 555 560

10 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
 565 570 575

15 Lys Asp Gly Gly Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
 580 585 590

20 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
 595 600 605

25 Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 610 615 620

30 Asn Leu Lys Asp Tyr Gln Thr Ile Thr Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
 625 630 635 640

35 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 645 650 655

40 Ala Trp Gly Asp Lys Phe Thr Ile Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Asp  
 660 665 670

45 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Pro Asn Ser Trp Ile Thr Thr Pro  
 675 680 685

50 Gly Ala Ser Ile Ser Gly Asn Lys Leu Phe Ile Asn Leu Gly Thr Asn  
 690 695 700

55 Glu Thr Phe Arg Gln Ser Leu Ser Leu Asn Ser Tyr Ser Thr Tyr Ser  
 705 710 715 720

60 Ile Ser Phe Thr Ala Ser Gly Pro Phe Asn Val Thr Val Arg Asn Ser  
 725 730 735

65 Arg Xaa Val Leu Phe Glu Arg Ser Asn Leu Met Ser Ser Thr Ser His  
 740 745 750

70 Ile Ser Gly Thr Phe Lys Thr Glu Ser Asn Asn Thr Gly Leu Tyr Val  
 755 760 765

75 Glu Leu Ser Arg Arg Ser Gly Gly Gly Gly His Ile Ser Phe Glu Asn  
 770 775 780

80 Val Ser Ile Lys  
 785

<210> 3

<211> 2367

65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 344 691 T3

<220>

<223> Secuencia de codificación de vip3C optimizado para maíz.  
Una "r" en las posiciones 2213 y 2214 representa el nucleótido g o a.

5

<400> 3

	atgaacaaga acaacaccaa gctctccacc cgcgccctcc cgtccttcat cgactacttc	60
10	aacggcatct acggcttcgc caccggcacc aaggacatca tgaacatgat cttcaagacc	120
	gacaccggcg gcaacctcac cctcgacgag atcctcaaga accagcagct cctcaacgag	180
	atcagcggca agctcgacgg cgtgaaccgg tccctcaacg acctcatcgc ccagggcaac	240
15	ctcaacaccg agctgtccaa ggagatcctc aagatcgcca acgagcagaa ccaggtgctc	300
	aacgacgtga acaacaagct cgacgccatc aacaccatgc tccacatcta cctcccgaag	360
	atcacctcca tgctctccga cgtgatgaag cagaactacg cctctcctcc ccagatcgag	420
20	tacctctcca agcagctcca ggagatcagc gacaagctcg acatcatcaa cgtgaacgtg	480
	ctcatcaact ccacctcac cgagatcacc ccggcctacc agcgcaccaa gtacgtgaac	540
	gagaagtccg aggagctgac ctctgccacc gagaccacc tcaaggtgaa gaaggactcc	600
25	tccccggccg acatcctcga cgagctgacc gagctgaccg agctggccaa gtccgtgacc	660
	aagaacgacg tggacggctt cgagttctac ctcaaacctc tccacgacgt gatggtgggc	720
	aacaacctct tcggcgcctc cgccctcaag accgcctccg agctgategc caaggagaa	780
30	gtgaagacct ccggctccga ggtgggcaac gtgtacaact tctcatcgtg gctcaccgcc	840
	ctgcaggcca aggccttctc caccctcacc acctgccgca agctcctcgg cctcggcggc	900
	atcgactaca cctccatcat gaacgagcac ctcaacaagg agaaggaggá gttccgcgtg	960
35	aacatcctcc cgacctctc caaaccttc tccaaccga actacgcaa ggtgaagggc	1020
	tccgacgagg acgccaagat gatcgtggag gccaaagccg gccacgcctc cgtgggcttc	1080
	gagatgtcca acgactccat caccgtgctc aagggtgtac aggccaagct caagcagaac	1140
40	taccaggtgg acaaggactc cctctccgag gtgatctacg gcgacaccga caagctcttc	1200
	tgcccggacc agtccgagca gatatactac accaacaaca tcgtgttccc gaacgagtac	1260
	gtgatcacca agatcgactt caccaagaag atgaagacc tccgctacga ggtgaccgcc	1320
45	aacttctacg actcctccac cggcgagatc gacctcaaca agaagaaggt ggagtctctc	1380
	gaggccgagt accgcaccct ctccgccaac gacgacggcg tgtacatgcc gctcggcgtg	1440
	atctccgaaa ccttctccac cccgatcaac ggcttcggcc tccaggccga cgagaactcc	1500

50

55

60

65

ES 2 344 691 T3

5 cgcctcatca ccctcacctg caagtcctac ctcgcgagc tgctcctcgc caccgacctc 1560  
 tccaacaagg agaccaagct catcgtgccg ccgtccggct tcattctcaa catcgtggag 1620  
 aacggetcca tcgaggagga caacctcgag ccgtggaagg ccaacaacaa gaacgcctac 1680  
 gtggaccaca ccggcggcgt gaacggcacc aaggccctct acgtgcacaa ggacggcggc 1740  
 ttctcccagt tcattcggca caagctcaag ccgaagaccg agtacgtgat ccagtacacc 1800  
 10 gtgaagggca agccgtccat ccacctcaag gacgagaaca ccggctacat ccactacgag 1860  
 gacaccaaca acaacctcaa ggactaccag accatcacca agcgtttcac caccggcacc 1920  
 gacctcaagg gcgtgtacct catcctcaag tcccagaacg ggcacgaggc ctggggcgac 1980  
 aagttcacca tccttgagat caagccggcc gaggacctcc tctccccgga gctgatcaac 2040  
 ccgaactcct ggatcaccaac ccggggcgcc tccatctccg gcaacaagct ctcatcaac 2100  
 ctgggcacca acggcacctt ccgccagtcc ctctccctca actcctactc cacctactcc 2160  
 20 atctccttea ccgcctccgg ccggttcaac gtgaccgtgc gcaactcccg cgrzgtgctc 2220  
 ttcgagcgtc ccaacctcat gtctccacc tcccacatct ccggcacctt caagaccgag 2280  
 tccaacaaca ccggcctcta cgtggagctg tcccgcctgt ccggcggcgg cggccacatc 2340  
 25 tccttcgaga acgtgtccat caagtag 2367

<210> 4

<211> 2370

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2370)

<223> secuencia de codificación nativa de vip3A(a).

<400> 4

45 atgaacaaga ataatactaa attaagcaca agagccttac caagttttat tgattatfff 60  
 aatggcattt atggatttgc cactggtatc aaagacatta tgaacatgat ttttaaacg 120  
 gatacagggtg gtgatctaac cctagacgaa attttaaga atcagcagtt actaaatgat 180  
 atttctggta aattggatgg ggtgaatgga agcttaaatg atcttatcgc acagggaaac 240  
 50 ttaaatacag aattatctaa ggaatatta aaaattgcaa atgmacaaaa tcaagtttta 300  
 aatgatgtta ataacaaact cgatgcgata aatacgatgc ttcgggtata tctacctaaa 360  
 attacctcta tgttgagtga tgtaatgaaa caaaattatg cgctaagtct gcaaatagaa 420  
 tacttaagta aacaattgca agagatttct gataagttgg atattattaa tgtaaatgta 480  
 cttattaact ctacacttac tgaaattaca cctgcgtatc aaaggattaa atatgtgaac 540  
 gaaaaatttg aggaattaac ttttgctaca gaaactagtt caaaagtaaa aaaggatggc 600  
 60 tctctcgag atattcttga tgagttaact gagttaactg aactagcga aagtgttaaca 660

65

ES 2 344 691 T3

aaaaatgatg tggatgggtt tgaattttac ctaatacat tccacgatgt aatggtagga 720  
 aataatttat tgggcttc agctttaaaa actgcacg aattaattac taaagaaaat 780  
 5 gtgaaacaa gtggcagtga ggtcggaaat gttataact tcttaattgt attaacagct 840  
 ctgcaagcaa aagcttttct tactttaaca acatgccgaa aattatagg cttagcagat 900  
 attgattata cttctattat gaatgaacat ttaantaagg aaaaagagga atttagagta 960  
 10 aacatcctcc ctacactttc taactctttt tctaactccta attatgcaa agttaaagga 1020  
 agtgatgaag atgcaagat gattgtggaa gctaaaccag gacatgcatt gattgggttt 1080  
 gaaattagta atgattcaat tacagtatta aaagtatatg aggctaagct aaaacaaaat 1140  
 15 tatcaagtcg ataaggattc cttatcggaa gttatttatg gtgatatgga taaattattg 1200  
 tgcccagatc aatctgaaca aatctattat acaataaca tagtatttcc aaatgaatat 1260  
 gtaattacta aaattgattt cactaaaaaa atgaaaactt taagatatga ggtaacagcg 1320  
 20 aatttttatg attcttctac aggagaaatt gacttaata agaaaaagt agaatacagt 1380  
 gaagcggagt atagaacggt aagtctaat gatgatggg tgtatatgcc gttagggtgc 1440  
 atcagtgaat catttttgac tccgattaat gggtttgcc tccaagctga tgaaaattca 1500  
 25 agattaatta cttaacatg taaatcatat ttaagagaac tactgctagc aacagactta 1560  
 agcaataaag aaactaaatt gatcgtcccg ccaagtgggt ttattagcaa tattgtagag 1620  
 aacgggtcca tagaagagga caatttagag ccgtggaag caaataataa gaatgcgtat 1680  
 30 gtatgcata caggcggagt gaatggaact aaagctttat atgttcataa ggacggagga 1740  
 attcacaat ttattggaga taagttaaaa ccgaaaactg agtatgtaat ccaatatact 1800  
 gttaaaggaa aaccttctat tcatttaaaa gatgaaaata ctggatatac tcattatgaa 1860  
 35 gatcaaaata ataattaga agattatcaa actattaata aacgttttac tacaggaact 1920  
 gatttaagg gagtgattt aattttaaaa agtcaaatg gagatgaagc ttggggagat 1980  
 aactttatta ttttgaaat tagtccttct gaaaagttat taagtcaga attaattaat 2040  
 40 acaataaatt ggacggtac gggatcaact aatattagcg gtaatacact cactctttat 2100  
 caggaggac gaggattct aaaacaaaac cttcaattag atagttttc aacttataga 2160  
 gtgtatttt ctgtgtccg agatgctaat gtaaggatta gaaattctag ggaagtgtta 2220  
 45 tttgaaaaa gatatatgag cggtgctaaa gatgttctg aatgttcac tacaataatt 2280  
 gagaagata acttttatat agagcttct caagggaata atttatatg tggctctatt 2340  
 50 gtacatttt acgatgtctc tattaagtaa 2370

<210> 5

<211> 789

<212> PRT

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(789)

<223> Toxina Vip3A



ES 2 344 691 T3

<400> 5

5 Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe  
1 5 10

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
20 25 30

10 Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu  
35 40 45

15 Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys  
50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn  
65 70 75 80

20 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln  
85 90 95

25 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
100 105 110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
115 120 125

30 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
130 135 140

35 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val  
145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
165 170 175

40 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
180 185 190

45 Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu  
195 200 205

50 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
210 215 220

Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly

ES 2 344 691 T3

	225				230					235					240	
5	Asn	Asn	Leu	Phe	Gly	Arg	Ser	Ala	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Glu	Leu	Ile
					245					250					255	
10	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Val	Gly	Asn	Val	Tyr
				260					265					270		
15	Asn	Phe	Leu	Ile	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gln	Ala	Lys	Ala	Phe	Leu	Thr
			275					280					285			
20	Leu	Thr	Thr	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Thr
	290					295						300				
25	Ser	Ile	Met	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Glu	Phe	Arg	Val
	305					310					315					320
30	Asn	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	Ser	Asn	Thr	Phe	Ser	Asn	Pro	Asn	Tyr	Ala
				325						330					335	
35	Lys	Val	Lys	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Ala	Lys	Met	Ile	Val	Glu	Ala	Lys
			340						345					350		
40	Pro	Gly	His	Ala	Leu	Ile	Gly	Phe	Glu	Ile	Ser	Asn	Asp	Ser	Ile	Thr
			355					360					365			
45	Val	Leu	Lys	Val	Tyr	Glu	Ala	Lys	Leu	Lys	Gln	Asn	Tyr	Gln	Val	Asp
	370						375					380				
50	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Asp	Lys	Leu	Leu
	385					390					395					400
55	Cys	Pro	Asp	Gln	Ser	Glu	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Asn	Ile	Val	Phe
				405						410					415	
60	Pro	Asn	Glu	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Asp	Phe	Thr	Lys	Lys	Met	Lys
			420						425					430		
65	Thr	Leu	Arg	Tyr	Glu	Val	Thr	Ala	Asn	Phe	Tyr	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly
			435					440					445			
70	Glu	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Val	Glu	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Tyr	
	450					455					460					
75	Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn	Asp	Asp	Gly	Val	Tyr	Met	Pro	Leu	Gly	Val
	465					470					475					480
80	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Asn	Gly	Phe	Gly	Leu	Gln	Ala
				485						490					495	

ES 2 344 691 T3

Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
 500 505 510  
 5  
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
 515 520 525  
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile  
 530 535 540  
 10  
 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 545 550 555 560  
 15  
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
 565 570 575  
 20  
 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
 580 585 590  
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
 595 600 605  
 25  
 Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 610 615 620  
 30  
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
 625 630 635 640  
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 645 650 655  
 35  
 Ala Trp Gly Asp Asn Phe Ile Ile Leu Glu Ile Ser Pro Ser Glu Lys  
 660 665 670  
 40  
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Thr Asn Asn Trp Thr Ser Thr Gly  
 675 680 685  
 Ser Thr Asn Ile Ser Gly Asn Thr Leu Thr Leu Tyr Gln Gly Gly Arg  
 690 695 700  
 45  
 Gly Ile Leu Lys Gln Asn Leu Gln Leu Asp Ser Phe Ser Thr Tyr Arg  
 705 710 715 720  
 50  
 Val Tyr Phe Ser Val Ser Gly Asp Ala Asn Val Arg Ile Arg Asn Ser  
 725 730 735  
 55  
 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Arg Tyr Met Ser Gly Ala Lys Asp Val  
 740 745 750  
 Ser Glu Met Phe Thr Thr Lys Phe Glu Lys Asp Asn Phe Tyr Ile Glu  
 755 760 765  
 60  
 Leu Ser Gln Gly Asn Asn Leu Tyr Gly Gly Pro Ile Val His Phe Tyr  
 770 775 780  
 65  
 Asp Val Ser Ile Lys  
 785

ES 2 344 691 T3

<210> 6  
<211> 2364  
<212> ADN

5 <213> *Bacillus thuringiensis*

<220>  
<221> característica\_misc

10 <222> (1)..(2364)

<223> secuencia de codificación nativa de vip3B.

15 <400> 6

```
atgaacaaga ataactaa attaaacgca agggccttac cgagttttat tgattatfff 60
aatggcattt atggatttgc cactggatc aaagacatta tgaacatgat ttttaaacg 120
gatacagggtg gaaatctaac cctagacgaa attttaaaa atcagcagtt attaatgag 180
atctctggtt aattggatgg ggtaaattgg agcttaaacg atcttatcgc acagggaaac 240
ttaaatcacag aattatctaa ggaaatctta aaaattgcaa atgagcagaa tcaagtctta 300
aatgatggtt ataacaact taatgcatg aatacaatgc ttcacatata tctacctaa 360
attacatcta tgtaaatga tgtaatgaaa caaaattatg cactaagtct gcaaatagaa 420
tacctaagta aacaattgca agaaatttcc gacaagttag atgtcattaa cgtgaatgta 480
cttattaact ctacacttac tgaaattaca cctgcgtatc aacggatgaa atatgtaaat 540
gaaaaatttg aagatttaac ttttgcctca gaaaccactt taaaagtana aagaatagc 600
tccctgcag atattcttga tgagttaact gagttaactg aactagcga aagtgtaca 660
aaaaatgacg tggatggtt tgaaatttac cttatacat tccacgatgt aatggtagga 720
aacaatttat tcgggcgttc agctttaaaa actgcttcgg aattaatcgc taaagaaat 780
gtgaaaacaa gtggcagtga ggtaggaaat gtttataatt tcttaattgt attaacagct 840
ctgcaagcaa aagcttttct tactttaaca acatgccgga aattattagg cttagcagat 900
attgattata ctttcattat gaatgaacat ttagataagg aaaaagagga atttagagta 960
aatatccttc ctacacttcc taatactttt tctaactccta actatgcaaa agctaaagga 1020
agcaatgaag atgcaaagat aattgtgga gctaaaccag gatatgcttt ggttgattt 1080
gaaatgagca atgattcaat cacagtatta aaagcatatc aggetaagct aaaacaagat 1140
tatcaagttg ataaagattc gttatcagaa atgtctatg gtgatatgga taaattattg 1200
```

55

60

65

ES 2 344 691 T3

5 tgccccgcatc aatctgaaca aatatattat scaaataaca ttgcttttcc caatgaatat 1260  
 gtaattacta aaattacttt tactaaaaaa atgaatagtt taagatatga ggcaacagct 1320  
 aatttttatg attcttctac aggggatatt gatctaata agacaaaagt agaatcaagt 1380  
 gaagcagagt atagtacgct aagtgctagt actgatggag tctatatgcc gttaggtatt 1440  
 atcagtgaaa catttttgac tccaattaat gggtttgaa tcgtagtcga tgaaaattca 1500  
 10 aaattagtaa atttaacatg taaatcatat ttaagagagg tattattagc aacagactta 1560  
 agtaataaag aaactaaatt gattgtccca cctattgggt ttattagcaa tattgtagaa 1620  
 aatgggaact tagagggaga aaacttagag cctgtgaaag caaataacaa aaatgcgtat 1680  
 15 gtgatcata caggcggcgt aaatggaact aaagctttat atgttcataa ggatggtgag 1740  
 ttttcacaat ttattggaga taagttgaaa tcgaaaacag aatattgtaat tcaatatatt 1800  
 gtaaagggaa aagcttctat tcttttgaaa gatgaaaaaa atggtgattg catttatgaa 1860  
 20 gatacaata atggtttaga agattttcaa accattacta aaagttttat tacaggaacg 1920  
 gattcttcag gagttcattt aatatttaat agtcaaaatg gcgatgaagc atttggggaa 1980  
 aactttacta tttcagaaat taggctttcc gaagatttat taagtccaga attgataaat 2040  
 25 tcagatgctt gggttggatc tcagggaaact tggatctcag gaaattcact cactattaat 2100  
 agtaatgtga atggaacttt tcgacaaaac ctttcgtttag aaagctatc aacttatagt 2160  
 atgaacttta atgtgaatgg atttgccaag gtgacagtaa gaaattcccg tgaagtatta 2220  
 30 tttgaaaaaa attatccgca gctttcacct aaagatattt ctgaaaaatt cacaactgca 2280  
 gccataata cccgggttga tgtagagctt tctcgtttta catcgggtgg cgetataaat 2340  
 ttccggaatt ttccgattaa gtga 2364

35

<210> 7

<211> 787

<212> PRT

40

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

45

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(787)

<223> Toxina Vip3B

50

<400> 7

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe  
 1 5 10 15

55

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
 20 25 30

60

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asn Leu Thr Leu  
 35 40 45

65

ES 2 344 691 T3

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Glu Ile Ser Gly Lys  
 50 55 60  
 5 Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn  
 65 70 75 80  
 10 Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln  
 85 90 95  
 15 Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asn Ala Ile Asn Thr  
 100 105 110  
 20 Met Leu His Ile Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Asn Asp Val  
 115 120 125  
 Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
 130 135 140  
 25 Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Val Asn Val  
 145 150 155 160  
 30 Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Met  
 165 170 175  
 Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Asp Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
 180 185 190  
 35 Thr Leu Lys Val Lys Lys Asn Ser Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu  
 195 200 205  
 Leu Thr Glu Leu Thr Glu Leu Ala Lys Ser Val Thr Lys Asn Asp Val  
 210 215 220  
 40 Asp Gly Phe Glu Phe Tyr Leu Asn Thr Phe His Asp Val Met Val Gly  
 225 230 235 240  
 45 Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile  
 245 250 255  
 Ala Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr  
 260 265 270  
 50 Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr  
 275 280 285  
 55 Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr  
 290 295 300  
 60  
 65

ES 2 344 691 T3

Phe Ile Met Asn Glu His Leu Asp Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val  
 305 310 315 320  
 5 Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Ser Asn Glu Asp Ala Lys Ile Ile Val Glu Ala Lys  
 340 345 350  
 10 Pro Gly Tyr Ala Leu Val Gly Phe Glu Met Ser Asn Asp Ser Ile Thr  
 355 360 365  
 15 Val Leu Lys Ala Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Gln Asp Tyr Gln Val Asp  
 370 375 380  
 Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ile Val Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu  
 385 390 395 400  
 20 Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Ala Phe  
 405 410 415  
 25 Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Thr Phe Thr Lys Lys Met Asn  
 420 425 430  
 Ser Leu Arg Tyr Glu Ala Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly  
 435 440 445  
 30 Asp Ile Asp Leu Asn Lys Thr Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr  
 450 455 460  
 Ser Thr Leu Ser Ala Ser Thr Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Ile  
 465 470 475 480  
 35 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Ile Val Val  
 485 490 495  
 40 Asp Glu Asn Ser Lys Leu Val Asn Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
 500 505 510  
 Glu Val Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
 515 520 525  
 45 Val Pro Pro Ile Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Asn Leu  
 530 535 540  
 50 Glu Gly Glu Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 545 550 555 560  
 55 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His

ES 2 344 691 T3

5 Lys Asp Gly Glu Phe Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Ser Lys  
 580 585 590  
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Ile Val Lys Gly Lys Ala Ser Ile Leu  
 595 600 605  
 10 Leu Lys Asp Glu Lys Asn Gly Asp Cys Ile Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 610 615 620  
 15 Gly Leu Glu Asp Phe Gln Thr Ile Thr Lys Ser Phe Ile Thr Gly Thr  
 625 630 635 640  
 20 Asp Ser Ser Gly Val His Leu Ile Phe Asn Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 645 650 655  
 Ala Phe Gly Glu Asn Phe Thr Ile Ser Glu Ile Arg Leu Ser Glu Asp  
 660 665 670  
 25 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Ser Asp Ala Trp Val Gly Ser Gln  
 675 680 685  
 30 Gly Thr Trp Ile Ser Gly Asn Ser Leu Thr Ile Asn Ser Asn Val Asn  
 690 695 700  
 Gly Thr Phe Arg Gln Asn Leu Ser Leu Glu Ser Tyr Ser Thr Tyr Ser  
 705 710 715 720  
 35 Met Asn Phe Asn Val Asn Gly Phe Ala Lys Val Thr Val Arg Asn Ser  
 725 730 735  
 40 Arg Glu Val Leu Phe Glu Lys Asn Tyr Pro Gln Leu Ser Pro Lys Asp  
 740 745 750  
 Ile Ser Glu Lys Phe Thr Thr Ala Ala Asn Asn Thr Gly Leu Tyr Val  
 755 760 765  
 45 Glu Leu Ser Arg Phe Thr Ser Gly Gly Ala Ile Asn Phe Arg Asn Phe  
 770 775 780  
 50 Ser Ile Lys  
 785

<210> 8

55 <211> 2407

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

60 <220>

<221> característica\_misc

<222> (1)..(2406)

65 <223> secuencia de codificación nativa de vip3Z.



ES 2 344 691 T3

<400> 8

atgaataata ctaagttaaa cgcaagggct ttaccaagtt ttattgatta ttttaatggc 60  
 5 atttatggat ttgccactgg tatcaaagac attatgaaca tgatttttaa aacggataca 120  
 ggtgggtgga atttaacact agatgaaatt ttaaagaatc aagatttatt aaatcaaadc 180  
 tcagataaac tcgatggaat taatggagat ttaggtgatc ttattgcaca aggcaattta 240  
 10 aattcagaac taactaagga attattaaaa attgccaatg agcagaatct gatgttaaact 300  
 aatgttaatg ctcaacttaa ttcaataaat tcaaacctta acacctatct gccaaaaact 360  
 acatctatgc taagtgaggt aatgaaacaa aactatgtat taagtctaca aatagaattt 420  
 15 cttagtgaac aattacaaga aatctcagat aaacttgatg ttatcaattt aaatgtatta 480  
 attaactcta cattgacaga aattacgcct gcatatcaac gtattaaata tgtaaatgat 540  
 aaatttgatg aattgacttc tactgtggaa aaaaatccga aaattaateca agataatttt 600  
 20 actgaagatg ttattgataa tttactgat ttaactgaac tagcacgaag tgtaacgaga 660  
 aatgatatgg atagttttga attttatatt aaaactttcc atgatgtgat gataggaaat 720  
 aatttattca gtcgttctgc attaaaaact gcttcagaat taattgctaa ggaaaaatata 780  
 25 cactactatgg gaagtgaat tggtaatgtc tacactttta tggttgtttt gacttcctta 840  
 caagcaaaaag cgttcctaac tttactgca tgccgtaaat tattaggatt aacagatadc 900  
 gattatacac aaattatgaa tgaaaattta aatagagaaa aagaggaatt tcgcttaaact 960  
 30 atctctccta cactttctaa tgatttttct aatcctaact atacagaacc tttaggaagt 1020  
 gatctttag atcctattgt tacgttagaa gctgatctg gttatgcttt aataggtttt 1080  
 gagattctca atgatccaact tccagtatta aaagtatac aggcaaagct aaaaccaaact 1140  
 35 tatcaagtcg acaaagatc gattatggaa aatatttatg gaaatatcca caaactactt 1200  
 tgtccaaaac aacgtcacca aaaatattat ataaaagaca ttacatttcc tgaaggttat 1260  
 gtaatcacca aaattgtttt tgaaaaaaaa ttgaatctat taggatatga agtaacagca 1320  
 40 aatctttatg acccatttac aggaagtatc gatttgaata agactattct agaactcatg 1380  
 aaggaagaat gctgtgaaga agaattgctgt gaagaagaat gctgtgaaga agaattgctgt 1440  
 45 gaagaattat ataaaattat agaggcggat actaacggg tttatatgcc gttgggagta 1500  
 attagtgaaa ctttttaac accaatctat agtttttaac taattattga cgaaagaaca 1560  
 aagagaatat ctttagcggg taaactttat ttacgtgaat ctttactagc cacagattta 1620  
 50 gttataaaag ataccgaattt aattccttca cccaatggtt tcattaacag tattgtggaa 1680  
 aattggaata taacatcgga taatatagag ccttggaag cgaataataa aaatgcatat 1740  
 gtcgataaga cggatgacat ggtgggattt aactctttat atactcataa ggatggggaa 1800

55

60

65

ES 2 344 691 T3

ttcttgcaat ttattggagc taagttaaag gctaaaactg agtatatcat tcaatatact 1860  
 gtaaaagggg gtccggaagt ttatttgaaa aacaataaag gtatctttaa tgaggataca 1920  
 5 acaataaat ttgatacgtt tcaactata actaaaaagt tcaattcagg agtagatcca 1980  
 tccgaaatat atctagtttt taaaaatcaa attggatatg aagcatgggg aataaattt 2040  
 attatactag aatcaagtc atttgaacc ctaccacaaa tattaaaacc tgaattgg 2100  
 10 atgccttttg gtaatgctga gattaaagaa gatggaaaaa ttgagatttc aggtaattgg 2160  
 actatgacgc aaaatattca attagaacag aattccaagt atcatctaag atttctgta 2220  
 aaagggaaaag ggagagtagc gatacaaaact caaagctccc atataaatgt accagctaca 2280  
 15 aacgaagagg tttctacaat gattacaact agaaacttat acggtgaagg tatgatatac 2340  
 ctatttaatg atgacgtgga gaactccaaa gttatttttt cggatgtatc tctagttaa 2400  
 gaatagg 2407

20

<210> 9

<211> 801

<212> PRT

25

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

30

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(801)

<223> Toxina Vip3Z

35

<400> 9

Met Asn Asn Thr Lys Leu Asn Ala Arg Ala Leu Pro Ser Phe Ile Asp  
 1 5 10 15  
 40 Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp Ile Met  
 20 25 30  
 45 Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Gly Asn Leu Thr Leu Asp  
 35 40 45  
 50 Glu Ile Leu Lys Asn Gln Asp Leu Leu Asn Gln Ile Ser Asp Lys Leu  
 50 55 60  
 55 Asp Gly Ile Asn Gly Asp Leu Gly Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn Leu  
 65 70 75 80  
 60 Asn Ser Glu Leu Thr Lys Glu Leu Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln Asn  
 85 90 95  
 65 Leu Met Leu Asn Asn Val Asn Ala Gln Leu Asn Ser Ile Asn Ser Thr  
 100 105 110

65

ES 2 344 691 T3

Leu Asn Thr Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Glu Val Met  
 115 120 125  
 5 Lys Gln Asn Tyr Val Leu Ser Leu Gln Ile Glu Phe Leu Ser Glu Gln  
 130 135 140  
 Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Val Ile Asn Leu Asn Val Leu  
 145 150 155 160  
 10 Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile Lys  
 165 170 175  
 Tyr Val Asn Asp Lys Phe Asp Glu Leu Thr Ser Thr Val Glu Lys Asn  
 180 185 190  
 15 Pro Lys Ile Asn Gln Asp Asn Phe Thr Glu Asp Val Ile Asp Asn Leu  
 195 200 205  
 20 Thr Asp Leu Thr Glu Leu Ala Arg Ser Val Thr Arg Asn Asp Met Asp  
 210 215 220  
 Ser Phe Glu Phe Tyr Ile Lys Thr Phe His Asp Val Met Ile Gly Asn  
 225 230 235 240  
 25 Asn Leu Phe Ser Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile Ala  
 245 250 255  
 30 Lys Glu Asn Ile His Thr Met Gly Ser Glu Ile Gly Asn Val Tyr Thr  
 260 265 270  
 Phe Met Val Val Leu Thr Ser Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr Leu  
 275 280 285  
 35 Thr Ala Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Thr Asp Ile Asp Tyr Thr Gln  
 290 295 300  
 40 Ile Met Asn Glu Asn Leu Asn Arg Glu Lys Glu Glu Phe Arg Leu Asn  
 305 310 315 320  
 45 Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Asp Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Thr Glu  
 325 330 335  
 Thr Leu Gly Ser Asp Leu Val Asp Pro Ile Val Thr Leu Glu Ala Asp  
 340 345 350  
 50 Pro Gly Tyr Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Leu Asn Asp Pro Leu Pro  
 355 360 365  
 55 Val Leu Lys Val Tyr Gln Ala Lys Leu Lys Pro Asn Tyr Gln Val Asp

ES 2 344 691 T3

	370					375									380			
5	Lys	Glu	Ser	Ile	Met	Glu	Asn	Ile	Tyr	Gly	Asn	Ile	His	Lys	Leu	Leu		
	385					390					395					400		
10	Cys	Pro	Lys	Gln	Arg	His	Gln	Lys	Tyr	Tyr	Ile	Lys	Asp	Ile	Thr	Phe		
					405					410					415			
15	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Ile	Thr	Lys	Ile	Val	Phe	Glu	Lys	Lys	Leu	Asn		
				420					425					430				
20	Leu	Leu	Gly	Tyr	Glu	Val	Thr	Ala	Asn	Leu	Tyr	Asp	Pro	Phe	Thr	Gly		
			435					440					445					
25	Ser	Ile	Asp	Leu	Asn	Lys	Thr	Ile	Leu	Glu	Ser	Trp	Lys	Glu	Glu	Cys		
	450						455					460						
30	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Cys		
	465				470						475					480		
35	Glu	Glu	Leu	Tyr	Lys	Ile	Ile	Glu	Ala	Asp	Thr	Asn	Gly	Val	Tyr	Met		
					485					490					495			
40	Pro	Leu	Gly	Val	Ile	Ser	Glu	Thr	Phe	Leu	Thr	Pro	Ile	Tyr	Ser	Phe		
				500					505					510				
45	Lys	Leu	Ile	Ile	Asp	Glu	Arg	Thr	Lys	Arg	Ile	Ser	Leu	Ala	Gly	Lys		
			515					520					525					
50	Ser	Tyr	Leu	Arg	Glu	Ser	Leu	Leu	Ala	Thr	Asp	Leu	Val	Asn	Lys	Asp		
	530					535						540						
55	Thr	Asn	Leu	Ile	Pro	Ser	Pro	Asn	Gly	Phe	Ile	Asn	Ser	Ile	Val	Glu		
	545				550						555					560		
60	Asn	Trp	Asn	Ile	Thr	Ser	Asp	Asn	Ile	Glu	Pro	Trp	Lys	Ala	Asn	Asn		
					565					570					575			
65	Lys	Asn	Ala	Tyr	Val	Asp	Lys	Thr	Asp	Asp	Met	Val	Gly	Phe	Asn	Ser		
			580						585					590				
70	Leu	Tyr	Thr	His	Lys	Asp	Gly	Glu	Phe	Leu	Gln	Phe	Ile	Gly	Ala	Lys		
			595					600					605					
75	Leu	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Tyr	Ile	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Lys	Gly	Ser		
	610						615						620					
80	Pro	Glu	Val	Tyr	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Gly	Ile	Phe	Tyr	Glu	Asp	Thr		
	625					630					635					640		

ES 2 344 691 T3

Thr Asn Lys Phe Asp Thr Phe Gln Thr Ile Thr Lys Lys Phe Asn Ser  
 645 650 655  
 5 Gly Val Asp Pro Ser Glu Ile Tyr Leu Val Phe Lys Asn Gln Ile Gly  
 660 665 670  
 Tyr Glu Ala Trp Gly Asn Lys Phe Ile Ile Leu Glu Ile Lys Ser Phe  
 675 680 685  
 10 Glu Thr Leu Pro Gln Ile Leu Lys Pro Glu Asn Trp Met Pro Phe Gly  
 690 695 700  
 Asn Ala Glu Ile Lys Glu Asp Gly Lys Ile Glu Ile Ser Gly Asn Gly  
 705 710 715 720  
 Thr Met Thr Gln Asn Ile Gln Leu Glu Gln Asn Ser Lys Tyr His Leu  
 725 730 735  
 20 Arg Phe Ser Val Lys Gly Lys Gly Arg Val Ala Ile Gln Thr Gln Ser  
 740 745 750  
 Ser His Ile Asn Val Pro Ala Thr Asn Glu Glu Val Ser Thr Met Ile  
 755 760 765  
 Thr Thr Arg Asn Leu Tyr Gly Glu Gly Met Ile Tyr Leu Phe Asn Asp  
 770 775 780  
 30 Asp Val Glu Asn Ser Lys Val Ile Phe Ser Asp Val Ser Leu Val Lys  
 785 790 795 800

35 Glu

<210> 10

<211> 2367

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Secuencia de codificación de la toxina híbrida vip3A-C.

<400> 10

50 atgaacaaga ataactactaa attaagcaca agagccttac caagttttat tgattatfff 60  
 aatggcattt atggatttgc cactgggtatc aaagacatta tgaacatgat ttttaaaacg 120  
 gatacaggtg gtgatctaac cctagacgaa attttaaaga atcagcagtt actaaatgat 180  
 55 atttctggta aattggatgg ggtgaatgga agcttaaatg atcttatcgc acagggaaac 240  
 ttaaatacag aattatctaa ggaaatatta aaaattgcaa atgaacaaaa tcaagtttta 300

60

65

ES 2 344 691 T3

5     aatgatgta ataacaact cgatgcgata aatcgcgatc ttcgggtata tctacctaaa     360  
        attacctcta tgttgagtga tgtaatgaaa caaaattatg cgctaagtct gcaaatagaa     420  
        tacttaagta aacaattgca agagattttet gataagttgg atattattaa tgtaaatgta     480  
        cttattaact ctacacttac tgaaattaca cctgcgatac aaaggattaa atatgtgaac     540  
        gaaaaatttg aggaattaac ttttgctaca gaaactagtt caaaagtaaa aaaggatggc     600  
 10     tctcctgcag atattcttga tgagttaact gagttaactg aactagcga aagtgtaca     660  
        aaaaatgatg tggatggtt tgaaattttac cttataacat tccacgatgt aatggtagga     720  
        aataatttat tcgggcgttc agctttaaaa actgcatcgg aattaattac taagaaaaat     780  
 15     gtgaaaacaa gtggcagtga ggtcggaaat gtttataact tcttaattgt attaacagct     840  
        ctgcaagcaa aagcttttct tactttaaca acatgccgaa aattattagg cttagcagat     900  
        attgattata cttctattat gaatgaacat ttaataaagg aaaaagagga atttagagta     960  
 20     aacatectcc ctacacttcc taatactttt tctaatecta attatgcaaa agttaaagga     1020  
        agtgatgaag atgcaaagat gattgtggaa gctaaaccag gacatgcatt gattgggttt     1080  
        gaaattagta atgaltcaat tacagtatta aaagtatatg aggctaagct aaaacaaaat     1140  
 25     tatcaagtcg ataaggattc cttatcggaa gttatttatg gtgatatgga taaattattg     1200  
        tgcccagatc aatctgaaca aatctattat acaataaaca tagtatttcc aaatgaatat     1260  
        gtaattacta aaattgattt cactaaaaaa atgaaaactt taagatatga ggtaacagcg     1320  
 30     aatttttatg attcttctac aggagaaatt gacttaata agaaaaagt agaatcaagt     1380  
        gaagcggagt atagaacgtt aagtgcataat gatgatgggg tgtatatgcc gttaggtgtc     1440  
        atcagtgaaa catttttgac tccgattaat gggtttgcc tccaagctga tgaaaattca     1500  
 35     agattaatta cttaacatg taatcatat ttaagagaac tactgctagc aacagactta     1560  
        agcaataaag aactaaatt gatcgtcccg ccaagtggtt ttattagcaa tattgtagag     1620  
        aacgggtcca tagaagagga caatttagag cctgggaag caaataataa gaatgcgtat     1680  
 40     gtagatcata caggcggagt gaatggaact aaagctttat atgttcataa ggacggagga     1740  
        atttcacaat ttattggaga taagttaaaa ccgaaaactg agtatgtaat ccaatatact     1800  
        gttaaaggaa aaccttctat tcaattaaaa gatgaaaata ctggatatat tcattatgaa     1860  
 45     gatacaaata ataatttaga agattatcaa actattaata aacgttttac tacaggaact     1920  
        gatttaaagg gagtgtattt aattttaaaa agtcaaaatg gagatgaagc ttggggagat     1980  
        aaatttaca ttttagaat taagcctgcg gaggatttat taagcccaga attaattaat     2040  
 50     ccgaattcct ggattacgac tccaggggct agcatttcag gaaataaact tttcattaac     2100  
        ttggggacaa atgggacctt tagacaaagt ctttcattaa acagttatcc aacttatagt     2160  
        ataagcttta ctgcatcagg accatttaat gtgacggtaa gaaattctag gggagtatta     2220  
 55     ttgaaacgaa gcaaccttat gtcttcaact agtcatatt ctgggacatt caaaactgaa     2280  
        tccaataata ccggattata tgtagaactt tcccgctcgt ctgggtggtg tggatcata     2340  
        tcatttgaaa acgtttctat taaataa     2367

60

<210> 11

<211> 788

65 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 344 691 T3

<220>

<223> Toxina híbrida vip3A-C.

5 <400> 11

Met Asn Lys Asn Asn Thr Lys Leu Ser Thr Arg Ala Leu Pro Ser Phe  
 1 5 10 15

Ile Asp Tyr Phe Asn Gly Ile Tyr Gly Phe Ala Thr Gly Ile Lys Asp  
 20 25 30

Ile Met Asn Met Ile Phe Lys Thr Asp Thr Gly Gly Asp Leu Thr Leu  
 35 40 45

Asp Glu Ile Leu Lys Asn Gln Gln Leu Leu Asn Asp Ile Ser Gly Lys  
 50 55 60

Leu Asp Gly Val Asn Gly Ser Leu Asn Asp Leu Ile Ala Gln Gly Asn  
 65 70 75 80

Leu Asn Thr Glu Leu Ser Lys Glu Ile Leu Lys Ile Ala Asn Glu Gln  
 85 90 95

Asn Gln Val Leu Asn Asp Val Asn Asn Lys Leu Asp Ala Ile Asn Thr  
 100 105 110

Met Leu Arg Val Tyr Leu Pro Lys Ile Thr Ser Met Leu Ser Asp Val  
 115 120 125

Met Lys Gln Asn Tyr Ala Leu Ser Leu Gln Ile Glu Tyr Leu Ser Lys  
 130 135 140

Gln Leu Gln Glu Ile Ser Asp Lys Leu Asp Ile Ile Asn Val Asn Val  
 145 150 155 160

Leu Ile Asn Ser Thr Leu Thr Glu Ile Thr Pro Ala Tyr Gln Arg Ile  
 165 170 175

Lys Tyr Val Asn Glu Lys Phe Glu Glu Leu Thr Phe Ala Thr Glu Thr  
 180 185 190

Ser Ser Lys Val Lys Lys Asp Gly Ser Pro Ala Asp Ile Leu Asp Glu

ES 2 344 691 T3

	195	200	205
5	Leu Thr Glu Leu Thr Glu 210	Leu Ala Lys Ser Val 215	Thr Lys Asn Asp Val 220
10	Asp Gly Phe Glu Phe Tyr 225	Leu Asn Thr Phe His 230	Asp Val Met Val Gly 235
15	Asn Asn Leu Phe Gly Arg Ser Ala Leu Lys Thr Ala Ser Glu Leu Ile 245		250
20	Thr Lys Glu Asn Val Lys Thr Ser Gly Ser Glu Val Gly Asn Val Tyr 260		265
25	Asn Phe Leu Ile Val Leu Thr Ala Leu Gln Ala Lys Ala Phe Leu Thr 275		280
30	Leu Thr Thr Cys Arg Lys Leu Leu Gly Leu Ala Asp Ile Asp Tyr Thr 290		295
35	Ser Ile Met Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Lys Glu Glu Phe Arg Val 305		310
40	Asn Ile Leu Pro Thr Leu Ser Asn Thr Phe Ser Asn Pro Asn Tyr Ala 325		330
45	Lys Val Lys Gly Ser Asp Glu Asp Ala Lys Met Ile Val Glu Ala Lys 340		345
50	Pro Gly His Ala Leu Ile Gly Phe Glu Ile Ser Asn Asp Ser Ile Thr 355		360
55	Val Leu Lys Val Tyr Glu Ala Lys Leu Lys Gln Asn Tyr Gln Val Asp 370		375
60	Lys Asp Ser Leu Ser Glu Val Ile Tyr Gly Asp Met Asp Lys Leu Leu 385		390
65	Cys Pro Asp Gln Ser Glu Gln Ile Tyr Tyr Thr Asn Asn Ile Val Phe 405		410
	Pro Asn Glu Tyr Val Ile Thr Lys Ile Asp Phe Thr Lys Lys Met Lys 420		425
	Thr Leu Arg Tyr Glu Val Thr Ala Asn Phe Tyr Asp Ser Ser Thr Gly 435		440
	Glu Ile Asp Leu Asn Lys Lys Lys Val Glu Ser Ser Glu Ala Glu Tyr 450		455
			460



ES 2 344 691 T3

Arg Thr Leu Ser Ala Asn Asp Asp Gly Val Tyr Met Pro Leu Gly Val  
 465 470 475 480  
 5  
 Ile Ser Glu Thr Phe Leu Thr Pro Ile Asn Gly Phe Gly Leu Gln Ala  
 485 490 495  
 Asp Glu Asn Ser Arg Leu Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ser Tyr Leu Arg  
 500 505 510  
 10  
 Glu Leu Leu Leu Ala Thr Asp Leu Ser Asn Lys Glu Thr Lys Leu Ile  
 515 520 525  
 Val Pro Pro Ser Gly Phe Ile Ser Asn Ile Val Glu Asn Gly Ser Ile  
 530 535 540  
 15  
 Glu Glu Asp Asn Leu Glu Pro Trp Lys Ala Asn Asn Lys Asn Ala Tyr  
 545 550 555 560  
 20  
 Val Asp His Thr Gly Gly Val Asn Gly Thr Lys Ala Leu Tyr Val His  
 565 570 575  
 25  
 Lys Asp Gly Gly Ile Ser Gln Phe Ile Gly Asp Lys Leu Lys Pro Lys  
 580 585 590  
 Thr Glu Tyr Val Ile Gln Tyr Thr Val Lys Gly Lys Pro Ser Ile His  
 595 600 605  
 30  
 Leu Lys Asp Glu Asn Thr Gly Tyr Ile His Tyr Glu Asp Thr Asn Asn  
 610 615 620  
 35  
 Asn Leu Glu Asp Tyr Gln Thr Ile Asn Lys Arg Phe Thr Thr Gly Thr  
 625 630 635 640  
 Asp Leu Lys Gly Val Tyr Leu Ile Leu Lys Ser Gln Asn Gly Asp Glu  
 645 650 655  
 40  
 Ala Trp Gly Asp Lys Phe Thr Ile Leu Glu Ile Lys Pro Ala Glu Asp  
 660 665 670  
 45  
 Leu Leu Ser Pro Glu Leu Ile Asn Pro Asn Ser Trp Ile Thr Thr Pro  
 675 680 685  
 Gly Ala Ser Ile Ser Gly Asn Lys Leu Phe Ile Asn Leu Gly Thr Asn  
 690 695 700  
 50  
 Gly Thr Phe Arg Gln Ser Leu Ser Leu Asn Ser Tyr Ser Thr Tyr Ser  
 705 710 715 720  
 55  
 60  
 65

ES 2 344 691 T3

Ile Ser Phe Thr Ala Ser Gly Pro Phe Asn Val Thr Val Arg Asn Ser  
725 730 735

5 Arg Gly Val Leu Phe Glu Arg Ser Asn Leu Met Ser Ser Thr Ser His  
740 745 750

10 Ile Ser Gly Thr Phe Lys Thr Glu Ser Asn Asn Thr Gly Leu Tyr Val  
755 760 765

Glu Leu Ser Arg Arg Ser Gly Gly Gly Gly His Ile Ser Phe Glu Asn  
770 775 780

15 Val Ser Ile Lys  
785

<210> 12

20 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador hacia adelante 1F

<400> 12

30 atgaacaaga ataatactaa attaagcaca agagcc 36

<210> 13

35 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> cebador reverso 1R

<400> 13

45 ctcaacatag aggtaatttt aggtagatat acccg 35

50 <210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> cebador P3

60 <400> 14

gatgatgggg tgtatatgcc gttag 25

65

<210> 15

<211> 25

ES 2 344 691 T3

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador P4

<400> 15

10 aataaattgt gaaattcctc cgtec 25

<210> 16  
15 <211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador 4F

25 <400> 16

agtcaaaatg gagatcaagg ttggggagat aac 33

30 <210> 17  
<211> 34  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador 4R

40 <400> 17

ttacttaata gagagatcgt ggaaatgtac aata 34

45 <210> 18  
<211> 23  
<212> ADN  
50 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador P5

55 <400> 18

60 aatggagatg aagcttgggg aga 23

<210> 19  
65 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 344 691 T3

<220>  
<223> Cebador P6

5 <400> 19  
          cgtggaatg tacaatagga ccacc          25

10 <210> 20  
    <211> 25  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial

15 <220>  
    <223> Cebador Vip3CF4

20 <400> 20  
          gtttagaaga ttttcaaacc attac          25

25 <210> 21  
    <211> 21  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial

30 <220>  
    <223> Cebador T7

35 <400> 21  
          ttaatacgac tcactatagg g          21

40 <210> 22  
    <211> 34  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial

45 <220>  
    <223> Cebador Vip3Cc

50 <400> 22  
          tttatttaat agaaacgttt tcaaatagata tatg          34

55 <210> 23  
    <211> 38  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial

60 <220>  
    <223> Cebador Vip3Cn

65

ES 2 344 691 T3

<400> 23

5 caccatgaac aagaataata ctaaattaag cacaagag 38

<210> 24

<211> 38

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador Vip3A-N

<400> 24

20 caccatgaac aagaataata ctaaattaag cacaagag 38

<210> 25

<211> 29

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Cebador Vip3A2050

<400> 25

35 taaagttatc tccccaagct tcattctcca 29

<210> 26

40 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Vip3C-C1

<400> 26

50 aatggagatg aagcttgggg agat 24

<210> 27

55 <211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

60 <223> Vip3C-C2

<400> 27

65 tttatttaat agaaacgttt tcaaatgata tatg 34

ES 2 344 691 T3

<210> 28  
<211> 27  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador Vip3Za  
10  
<400> 28

15 ggcatttatg gatttgccac tggatc 27

<210> 29  
<211> 27  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
25 <223> Cebador Vip3Zb  
<400> 29

30 tcctttgata cgcaggtgta atttcag 27

<210> 30  
<211> 13829  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
40 <223> pNOV2149  
<400> 30

45 aagcttgcac gcctgcagtg cagcgtgacc cggtcgtgcc cctctctaga gataatgagc 60  
attgcatgtc taagttataa aaaattacca catatctttt ttgtcacact tgtttgaagt 120  
gcagtttatc tatctttata catatattta aactttactc tacgaataat ataacttata 180  
50 gtactacaat aatatacagtg ttttagagaa tcatataaat gaacagttag acatggtcta 240  
aaggacaatt gagtattttg acaacaggac tctacagttt tatcttttta gtgtgcatgt 300  
gttctccttt ttttttcaa atagcttcac ctatataata cttcatccat tttattagta 360  
55 catccattta gggtttaggg ttaatggttt ttatagacta atttttttag tacatctatt 420

60

65

ES 2 344 691 T3

ttattctatt ttgcctcta aattaagaaa actaaaactc tattttagtt tttttattta 480  
 ataatttaga tataaaatag aataaaataa agtgactaaa aattaaacia atacccttta 540  
 5 agaaattaaa aaaactaagg aaacattttt cttgtttcga gtagataatg ccagcctggt  
 aaacgccgtc gacgagteta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc 660  
 aagcgaagca gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc gagagtcccg 720  
 10 ctccaccggt ggacttgctc cgctgtcggc atccagaaat tgcgtggcgg agcggcagac 780  
 gtgagccggc acggcaggcg gcctcctcct cctctcaccg caccggcagc tacgggggat 840  
 toctttccca cegetccttc gctttccctt cctcgcctgc cgtaataaat agacaccccc 900  
 15 tccacaccct ctttcccaa cctcgtggtt ttcggagcgc acacacacac aaccagatct 960  
 cccccaatc caccgctcg cactccgct tcaaggtagc ccgctcgtcc tcccccccc 1020  
 cccctctcta ccttctctag atcggcgctc cggtoeatgg ttagggcccg gtagttctae 1080  
 20 ttctgtteat gtttgtgta gatecgtgtt tgtgtagat ccgtgetget agcgttcgta 1140  
 cacggatgcg acctgtacgt cagacacggt ctgattgcta acttgccagt gtttctcttt 1200  
 ggggaatcct gggatggctc tagccgttcc gcagacggga tcgatttcat gatttttttt 1260  
 25 gtttcgttgc atagggtttg gtttgcctt ttcctttatt tcaatatatg ccgtgcactt 1320  
 gtttgcggg tcatctttc atgctttttt ttgtcttggg tgtgatgatg tggctcgggt 1380  
 gggcggctgt tctagatcgg agtagaatc tgtttcaaac tacctggtgg atttattaat 1440  
 30 tttggatctg tatgtgtgtg ccatacatat tcatagtac gaattgaaga tgatggatgg 1500  
 aaatatcgat ctaggatagg tatacatggt gatgcgggtt ttactgatgc atatacagag 1560  
 atgctttttg ttcgcttggg tgtgatgatg tgggtgggtt gggcggctgt tcatcgttc 1620  
 35 tagatcggag tagaatactg tttcaacta cctggtgtat ttattaattt tggaaactgta 1680  
 tgtgtgtgtc atacatcttc atagttacga gtttaagatg gatggaata tcgatctagg 1740  
 ataggtatac atgttgatgt gggttttact gatgcataa catgatggca tatgcagcat 1800  
 40 ctattcatat gctctaacct tgagtacctt tctattataa taaacaagta tgttttataa 1860  
 ttattttgat ctgatatac ttggatgatg gcatatgcag cagctatatg tggatttttt 1920  
 tagccctgcc ttcatacgtt atttatttgc ttggtactgt ttcttttgc gatgctcacc 1980  
 45 ctgttggttg gtgttacttc tgcagggatc caccatgaac aagaacaaca ccaagctctc 2040  
 caccgcggcc ctcccgctc tcatcgacta ctcaacggc atctacggct tcgccaccgg 2100  
 catcaaggac atcatgaaca tgatcttcaa gaccgacacc ggcggaacc tcaccctcga 2160  
 50 cgagatcctc aagaaccagc agctcctcaa cgagatcagc ggcaagctcg acggcgtgaa 2220  
 cggctccctc aacgacctca tcgccaggcg caacctcaac accgagctgt ccaaggagat 2280  
 cctcaagatc gccaacgagc agaaccaggc gctcaacgac gtgaacaaca agctcagcgc 2340  
 55 catcaacacc atgctccaca tctacctccc gaagatcacc tccatgctct ccgacgtgat 2400

60

65

ES 2 344 691 T3

gaagcagaac tacgccctct ccctccagat cgagtacctc tccaagcagc tccaggagat 2460  
 cagegacaag ctcgacatca tcaacgtgaa cgtgctcadc aactccaccc tcaccgagat 2520  
 5 caccceggcc taccagcgca tcaagtacgt gaacgagaag ttcgaggagc tgaccttcgc 2580  
 caccgagacc accctcaagg tgaagaagga ctctccccg gccgacatcc tcgacgagct 2640  
 gaccgagctg accgagctgg ccaagtccgt gaccaagaac gacgtggaeg gcttcgagtt 2700  
 10 ctacctcaac accttccacg acgtgatggt gggcaacaac ctctteggcc gctccgccct 2760  
 caagaccgcc tccgagctga tcgccaagga gaacgtgaag acctccggct ccgaggtggg 2820  
 caacgtgtac aacttctca tcgtgctcac cgccctgcag gccaaaggct tcctcaccct 2880  
 15 caccacctgc cgcaagctcc teggctcgc cgcatcgac tacacctcca tcatgaacga 2940  
 gcacctcaac aaggagaagg aggagttccg cgtgaacatc ctcccgacc tctccaacac 3000  
 ctctctcaac ccgaactacg ccaaggtgaa gggctccgac gaggacgcca agatgatcgt 3060  
 20 ggaggccaag ccgggccacg ccctcgtggg ctctgagatg tccaacgact ccatcaccgt 3120  
 gctcaagggtg tacgaggcca agctcaagca gaactaccag gtggacaagg actccctctc 3180  
 cgaggtgatc tacggcgaca ccgacaagct cttctgcccg gaccagtcgg agcagatata 3240  
 25 ctacaccaac aacatcgtgt tcccgaacga gtacgtgatc accaagatcg acttcaccaa 3300  
 gaagatgaag acctccgct acgaggtgac cgccaacttc tacgactcct ccaccggcga 3360  
 gatcgacctc aacaagaaga aggtggagtc ctccgaggcc gagtaccgca ccctctccgc 3420  
 30 caacgacgac ggcgtgtaca tgcgctcgg cgtgatctcc gaaaccttc tcaccccgat 3480  
 caacggcttc ggctccagg ccgacgagaa ctccgcctc atcaccctca cctgcaagtc 3540  
 ctacctccgc gagctgctcc tcgccaccga cctctccaac aaggagacca agctcatcgt 3600  
 35 gccgectcc ggcttcatct ccaacatcgt ggagaacggc tccatcgagg aggacaacct 3660  
 cgagccgtgg aaggccaaca acaagaacgc ctacgtggac cacaccggcg gegtgaacgg 3720  
 caccaaggcc ctctacgtgc acaaggacgg cgctctctcc cagttcatcg gcgacaagct 3780  
 40 caagccgaag accgagtacg tgatccagta caccgtgaag ggcaagccgt ccatccacct 3840  
 caaggacgag aacaccggct acatccacta cgaggacacc aacaacaacc tcaaggacta 3900  
 ccagaccatc accaagcgtc tcaccaccgg caccgacctc aagggcgtgt acctcatcct 3960  
 45 caagtcaccg aacggcgacg aggcctgggg cgacaagtc accatccttg agatcaagcc 4020  
 ggccgaggac ctctctccc cgagctgat caaccgaaac tcctggatca ccacccggg 4080  
 cgctctcadc tccggcaaca agctcttcat caacctggc accaacggca ccttccgcca 4140  
 50 gtccctctcc ctcaactcct actccacctc ctccatctcc ttcaccgect ccggcccgtt 4200  
 caacgtgacc gtgcgcaact cccgcagggt gctcttcgag cgctccaacc tcatgtctc 4260  
 cacctccac atctccggca ccttcaagac cgagtccaac aacaccggcc tctacgtgga 4320  
 55  
 60  
 65



ES 2 344 691 T3

5 gctgtcccgc cgetccggcg gggcgggcca catctccttc gagaacgtgt ccatcaagta 4380  
 gatctgagct ctagatcccc gaatttcccc gatcgttcaa acatttggca ataaagtctc 4440  
 ttaagattga atcctgttgc cggctttgcy atgattatca tataatttct gttgaattac 4500  
 gttaagcatg taataattaa catgtaatgc atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg 4560  
 attagagtcc cgcaattata catttaatac gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac 4620  
 10 taggataaat tctcggcgcg ggtgtcatct atgttactag atcgggaatt ggttaccagc 4680  
 ttgatgect gcagtgcagc gtgacccggc cgtgcccttc tctagagata atgagcattg 4740  
 catgtctaag ttataaaaaa ttaccacata tttttttgt cacacttgtt tgaagtgcag 4800  
 15 tttatctatc tttatacata tatttaaaact ttactctacg aataatataa tctatagtac 4860  
 tacaataata tcagtgtttt agagaatcat ataaatgaac agttagacat ggtctaaagg 4920  
 acaattgagt attttgaaa caggactcta cagttttatc tttttagtgt gcagtgttc 4980  
 20 tccttttttt ttgcaaatac cttcacctat ataatacttc atccatttta ttagtacatc 5040  
 catttagggt ttagggtaa tggtttttat agactaattt ttttagtaca tctattttat 5100  
 tctatttttag cctctaaatt aagaaaacta aaactctatt ttagtttttt tatttaataa 5160  
 25 tttagatata aatagaata aaataaagtg actaaaaatt aaacaaatac ctttaagaa 5220  
 attaaaaaaa ctaaggaaac attttcttg tttcagtag ataatgccag cctgttaaac 5280  
 gccgtcgacg agtctaacgg acaccaacca gcgaaccagc agcgtcgcgt cgggccaagc 5340  
 30 gaagcagacg gcacggcacc tctgtcgtg cctctggacc cctctcgaga gttccgctcc 5400  
 accgttgac ttgctccgt gtccgcatcc agaaattgcy tggcggagcg gcagacgtga 5460  
 gccggcacgg caggcggcct cctcctctc tcacggcacc ggcagctacg ggggattcct 5520  
 35 ttcccaccgc tccttcgctt tcccctctc gcccgccgta ataaatagac accccctcca 5580  
 caccctcttt ccccaacctc gtgtgttctg gacgcacac acacacaacc agatctcccc 5640  
 caaatccacc cgtcggcacc tccgcttcaa ggtaecgcgc tegtctctcc ccccccccc 5700  
 40 tctctacett ctctagatcg gcgttccggt ccatggtag ggcccggtag ttctactct 5760  
 gttcatgttt gtgttagac cgtgtttgtg ttagatccgt gctgctagcg ttcgtacacg 5820  
 gatgcgacct gtacgtcaga cacgttctga ttgctaact gccagtgtt ctctttgggg 5880  
 45 aatcctggga tggctctagc cgttccgag acgggatcga tttcatgatt tttttgttt 5940  
 cgttgcatag ggtttggtt gcccttttc tttatttcaa tatatgccgt gcacttgttt 6000  
 gtcgggcat cttttcatgc tttttttgt cttggttgtg atgatgtgt ctggttgggc 6060  
 50 ggtcgttcta gatcggagta gaattctgt tcaaactacc tgggtgattt attaattttg 6120  
 gatctgtatg tgtgtgccat acatattcat agttacgaat tgaagatgat ggatggaat 6180  
 atcgatctag gataggtata catgttgatg cgggttttac tgatgcatac acagagatgc 6240  
 55 tttttgttcg cttggttgtg atgatgtgt gtggttgggc ggtcgttcat tcgttctaga 6300

60  
65

ES 2 344 691 T3

tccggagtaga atactgtttc aaactacctg gtgtatttat taattttga actgtatgtg 6360  
 tgtgtcatac atcttcatag ttacgagttt aagatggatg gaaatatcga tctaggatag 6420  
 5 gtatacatgt tgatgtgggt tttactgatg catatacatg atggcatatg cagcatctat 6480  
 tcatatgctc taaccttgag tacctatcta ttataataaa caagtatggt ttataattat 6540  
 tttgatcttg atatacttgg atgatggcat atgcagcagc tatatgtgga tttttttagc 6600  
 10 cctgccttca tacgctattt atttgcttgg tactgtttct tttgtcgatg ctcaccctgt 6660  
 tgttttgggt tactttctgca gggatccccg atcatgcaaa aactcattaa ctcagtgcaa 6720  
 aactatgcct ggggcagcaa aaecggcgtg actgaacttt atggtatgga aaatccgtcc 6780  
 15 agccagccga tggccgagct gtggatgggc gcacatccga aaagcagttc acgagtgcag 6840  
 aatgccgccg gagatacgt ttcactgctg gatgtgatg agagtataa atcgactctg 6900  
 ctcggagagg ccgttgccaa acgctttggc gaactgcctt tcctgttcaa agtattatgc 6960  
 20 gcagcacagc cactctccat tcagttcat ccaaacaaac acaattctga aatcggtttt 7020  
 gccaaagaaa atgccgcagg tatcccgatg gatgccgccg agcgtacta taaagatcct 7080  
 aaccacaagc cggagctggt ttttgcgctg acgcttttcc ttgcgatgaa cgcgtttcgt 7140  
 25 gaattttccg agattgtctc cctactccag ccggtgcag gtgcacatcc ggcgattgct 7200  
 cactttttac aacagcctga tgccgaacgt ttaagegaac tgttcgccag cctgttgaat 7260  
 atgcagggtg aagaaaaatc ccgcgcgctg gcgattttaa aatcgccct cgatagccag 7320  
 30 caggggtaac cgtggcaaac gattcgttta atttctgaat tttaccggga agacagcggg 7380  
 ctgttctccc cgtatttctg gaatgtggtg aaattgaacc ctggcgaagc gatgttctg 7440  
 ttcgctgaaa caccgcacgc ttacctgcaa ggcgtggcgc tggaagtgat ggcaactcc 7500  
 35 gataacgtgc tgcgtgcggg tctgacgcct aaatacattg atattccgga actggttgcc 7560  
 aatgtgaaat tcgaagccaa accggttaac cagttgttga cccagccggg gaaacaagg 7620  
 gcagaactgg acttcccgat tccagtggat gattttgcct tctcgtgca tgaccttagt 7680  
 40 gataaagaaa ccaccattag ccagcagagt gccgccatth tgttctgcgt cgaaggcgat 7740  
 gcaacgttgt ggaaggttc tcagcagtta cagcttaaac cgggtgaatc agcgtttatt 7800  
 gccgccaacg aatcaccggg gactgtcaaa ggccacggcc gtttagcgcg tgtttacaac 7860  
 45 aagctgtaag agcttactga aaaaattaac atctcttgct aagctgggag ctcgatccgt 7920  
 cgacctgcag atcgttcaaa catttgcaa taaagttct taagattgaa tcctgttgcc 7980  
 ggtcttgcga tgattatcat ataatttctg ttgaattacg ttaagcatgt aataattaac 8040  
 50 atgtaatgca tgacgttatt tatgagatgg gtttttatga ttagagtccc gcaattatac 8100  
 atttaatacg cgatagaaaa caaatatag cgcgcaaac aggataaatt atcgcgcgcg 8160  
 gtgtcatcta tgttactaga tctgctagcc ctgcagaaa tttaccgggtg cccgggcggc 8220

55

60

65

ES 2 344 691 T3

5 cagcatggcc gtatccgcaa tgtgttatta agttgtctaa gcgtcaattt gtttacacca 8280  
 caatataatcc tgccaccagc cagccaacag ctccccgacc ggcagctcgg cacaaaatca 8340  
 ccactcgata caggcagccc atcagaatta attctcatgt ttgacagctt atcatcgact 8400  
 gcacgggtgca ccaatgcttc tggcgtcagg cagccatcgg aagctgtggt atggctgtgc 8460  
 agtgcgtaaa tcaactgcata attegtgtcg ctcaaggcgc actcccgttc tggataatgt 8520  
 10 tttttgcgcc gacatcataa cggttctggc aaatattctg aatgagctg ttgacaatta 8580  
 atcatccggc tcgtataatg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca 8640  
 gaccatgagg gaagcgttga tcgccgaagt atcgactcaa ctatcagagg tagttggcgt 8700  
 15 catcgagcgc catctcgaac cgacgttgcg gcccgtaacat ttgtacggct ccgcagtgga 8760  
 tggcggcctg aagccacaca gtgatattga tttgctggtt acggtgaccg taaggcttga 8820  
 tgaacaacag cggcgagctt tgatcaacga ccttttgaa acttcggctt cccctggaga 8880  
 20 gagegagatt ctccgcgctg tagaagtcac cattgttbtg caegacgaca tcattccgtg 8940  
 gcgttatcca gctaagcggg aactgcaatt tggagaatgg cagcgaatg acattcttgc 9000  
 aggtatcttc gagccagcca cgatcgacat tgatctggct atcttgctga caaaagcaag 9060  
 25 agaacatagc gttgccttgg taggtccagc ggcggaggaa ctctttgatc cggttcctga 9120  
 acaggatcta tttgaggcgc taaatgaaac cttaacgcta tggaaactgc cgcccactg 9180  
 ggctggcgat gagcgaaatg tagtgcttac gttgtccgcg atttggatca gcgcagtaac 9240  
 30 cggcaaatc gcgccgaagg atgtcgctgc cgactgggca atggagcgcc tgccggccca 9300  
 gtatcagccc gtcatacttg aagctaggca ggcttatctt ggacaagaag atcgcttggc 9360  
 ctccgcgcca gatcagttgg aagaatttgt. tcaactacgtg aaaggcgaga tcaccaagt 9420  
 35 agtcggcaaa taaagetcta gtgatctcc gtacccccgg gggatctggc tcgcggcgga 9480  
 cgcacgacgc cggggcgaga ccataggcga tctcctaant caatagtagc tgtaacctc 9540  
 aagcgtttca ctgttaacaa cgattgagaa tttttgtcat aaaattgaa tacttggttc 9600  
 40 gcatttttgt catccgcggt cagccgcaat tctgacgaac tgcccattta gctggagatg 9660  
 attgtacatc cttcacgtga aaatttctca agcgtgtgga acaagggttc agattttaga 9720  
 ttgaaaggty agccgttgaa acacgttctt cttgtcgatg acgacgtcgc tatgcgcat 9780  
 45 cttattattg aataccttac gatccacgcc tteaaagtga ccgcggtagc cgacagcacc 9840  
 cagttcacia gagtactctc ttcccgacg gtcgatgtcg tggttgttga tctaaattta 9900  
 ggtcgtgaa aggggctcga gatcgttctt aatctggcgg caaagtctga tattccaatc 9960  
 50 ataattatca gtggcgaccg ccttgaggag acggataaag ttgttgcact cgagctagga 10020  
 gcaagtgatt ttatcgctaa gccgttcagt atcagagagt ttctagcacg catcggggtt 10080  
 gccttgccg tgccgcccaa cgttgtccgc tccaaagacc gacgttcttt ttgttttact 10140  
 55 gactggacac ttaatctcag gcaacgtcgc ttgatgtccg aagetggcgg tgagggtgaaa 10200

60

65

ES 2 344 691 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55

```

cttacggcag gtgagttcaa tcttctctc gcgtttttag agaaaccccg cgacgttcta 10260
tcgcgcgagc aacttctcat tgccagtcga gtacgcgacg aggaggttta tgacaggagt 10320
atagatgttc tcattttgag gctgcgccgc aaacttgagg cagatccgtc aagccctcaa 10380
ctgataaaaa cagcaagagg tgccggttat ttctttgacg cggacgtgca ggtttcgcac 10440
ggggggacga tggcagcctg agccaattcc cagatccccg aggaatcggc gtgagcggtc 10500
gcaaacccate cggcccggta caaatcggcg cggcgctggg tgatgacctg gtggagaagt 10560
tgaaggccgc gcaggccgcc cagcggcaac gcatcgaggc agaagcacgc cccggtgaat 10620
cgtggcaagc ggccgctgat cgaatccgca aagaatcccg gcaaccgceg gcagccggtg 10680
cgccgtcgat taggaagccg cccaagggcg acgagcaacc agattttttc gttccgatgc 10740
tctatgacgt gggcacccgc gatagtcgca gcatcatgga cgtggccggtt tccgctctgt 10800
cgaagcgtga ccgacyagct ggcgaggtga tccgctacga gcttccagac gggcacgtag 10860
aggtttccgc agggccggcc ggcattggcca gtgtgtggga ttacgacctg gtactgatgg 10920
cggtttccca tctaaccgaa tccatgaacc gataccggga agggaagggg gacaagcccg 10980
gccgcgtggt ccgtccacac gttgcggacg tactcaagtt ctgccggcga gccgatggcg 11040
gaaagcagaa agacgacctg gtagaaacct gcattcgggtt aaacaccacg cacgttgcca 11100
tgcagcgtac gaagaaggcc aagaacggcc gcctggtgac ggtatccgag ggtgaagcct 11160
tgattagccg ctacaagatc gtaaagagcg aaaccggggc gccggagtac atcgagatcg 11220
egctagctga ttggatgtac cgcgagatca cagaaggcaa gaaccgggac gtyctgacyg 11280
ttcaccocga ttactttttg atcgatcccc gcatcggccg ttttctctac cgccctggcac 11340
gccgcgccgc aggcaaggca gaagccagat ggttgttcaa gacgatctac gaacgcagtg 11400
gcagcgcggg agagttcaag aagtctctgtt tcaccgtgcy caagctgatc ggggtcaaattg 11460
acctgccgga gtacgatttg aaggaggagg cggggcaggc tggcccgatc ctagtcatgc 11520
gctaccgcaa cctgatcgag ggcgaagcat ccgccggttc ctaatgtacg gagcagatgc 11580
tagggcaaat tgccctagca ggggaaaaag gtcgaaaaag tctctttcct gtggatagca 11640
cgtacattgg gaaccctaaag ccgtacattg ggaaccggaa cccgtacatt gggaaaccaa 11700
agccgtacat tgggaaccgg tcacacatgt aagtgactga tataaaagag aaaaaaggcg 11760
atTTTTccgc ctaaaactct ttaaaactta taaaactct taaaaccgcg ctggcctgtg 11820
cataactgtc tggccagcgc acagccgaag agctgcaaaa agcgcctacc cttcggtcgc 11880
tgcgctccct acgccccgcg gcttcgctgc ggctatcgc ggccgctggc cgctcaaaaa 11940
tggttgccct acggccaggc aatctaccag ggcgaggaca agccgcgccg tcgccactcg 12000
accgccggcg ctgaggtctg cctcgtgaag aaggtgttgc tgactcatac caggcctgaa 12060
tcgccccatc atccagccag aaagtgaggg agccacggtt gatgagagct ttgtttagg 12120
  
```