

PETITORIO


Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 01030451 00000000

Folios: 224 dón

Fecha (MM): 2001-05-15 17:24:52

Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO DE SOLICITUD DE PATENTE
2000-3

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención ✓



Patente de Modelo de Utilidad

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: MONSANTO TECHNOLOGY LLC
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.Dirección: 800 North Lindbergh Boulevard,
St. Louis, Missouri 63167, Estados Unidos
de América.Teléfono: 546 09 70
E-mail: clientes@camyp.com
Fax: 249 40 70Domicilio: St. Louis, Missouri 63167,
Estados Unidos de América.

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número: _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: Emilio FERRERO ✓

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 ✓

Teléfono: 347 38 11
E-mail: caveller@cavelier.com
Fax: 217 92 11
Domicilio: Bogotá, Colombia

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número: 438.019 TP 31.929

4

INVENTOR(ES)
(72)Nombre: 1- Barbara G. ISAAC, 2- Elysa K.
KRIEGER, 3- Anne-Marie LIGHT METTUS, 4-
Sakuntala SIVASUPRAMANIAM y 5- Farhad
MOSHIRI1- 5165 Rosemount Drive, St. Charles, MO
63304,
2- 531 East Essex Avenue, Kirkwood, MO 63122
3- 154 Forge Lane, Feasterville, PA 19053
4- 16226 Lea Oak Drive, Chesterfield, MO 63017
5- 741 Hawkmont Circle, Chesterfield, MO 63017
Estados Unidos de América, respectivamente.

IDENTIFICACION

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Número: _____

5

TÍTULO (54)

COMPOSICIONES DE POLIPÉPTIDOS TOXICAS PARA INSECTOS/
ANTONOMUS, Y MÉTODOS DE USO

6

Clasificación Internacional (51)

A 01 N 61/00.

7

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US.

(32) Fecha

15 de mayo de 2000 ✓

(31) Número de Solicitud

80/204.367

8

Para publicar a partir de la fecha de la presente solicitud a los

6 meses ☐12 meses ☐18 meses ☒Otro ☐

9

Comprobante de pago No. 01- 21.053 por \$ 358.640.00 Fecha 2 de abril de 2001
 Comprobante de pago No. 01- 16.207 por \$ 100.000.00 Fecha 12 de marzo de 2001

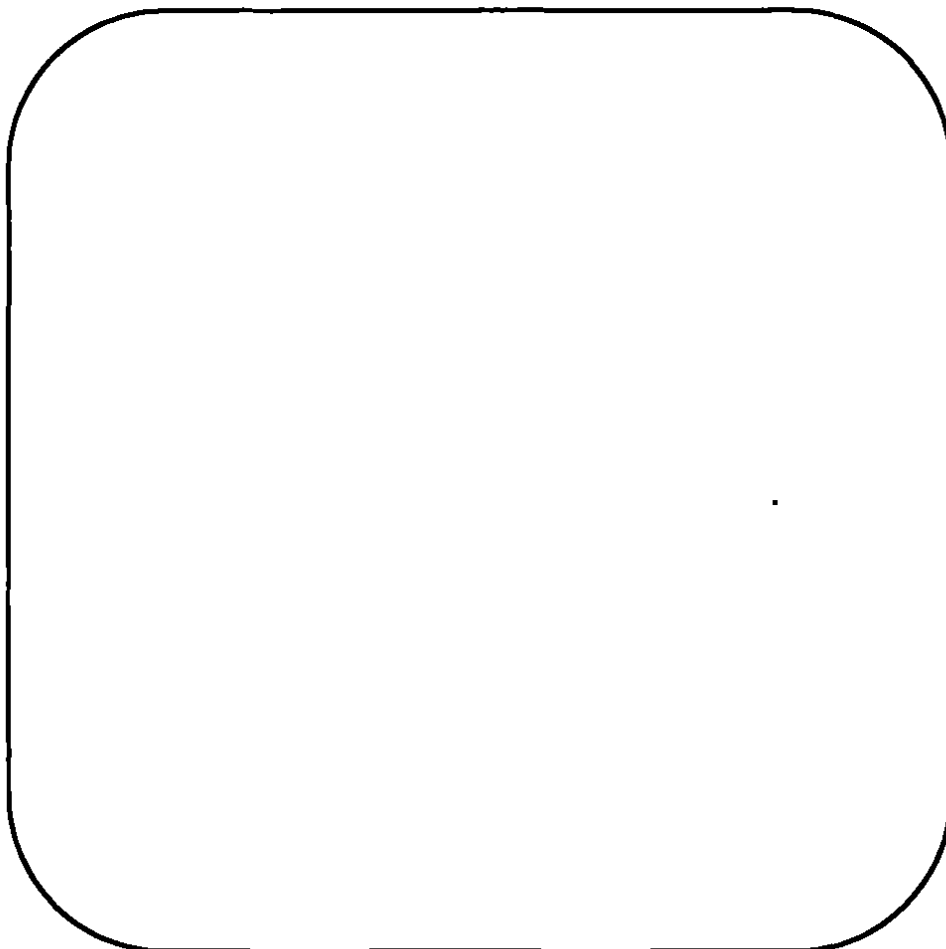
10

ANEXOS

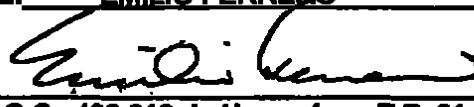
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación
- ☒ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes, si fuere el caso
- ☐ Copia certificada de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☒ Descripción de la invención
- ☒ Una o más reivindicaciones
- ☒ Dibujos y/o planos necesarios (12 p^ágs)
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: 

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

(1 2

COMPOSICIONES DE POLIPEPTIDOS TOXICAS PARA INSECTOS

ANTONOMICUS, Y METODOS DE USO

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1.1. Campo de la Invención

La presente in se relaciona de manera general con los campos de biología molecular. Se suministran métodos y composiciones que comprenden secuencias de ADN y polipéptidos derivados de *Bacillus turingiensis* para uso en formulaciones insecticidas y el desarrollo de plantas resistentes a insectos transgénicos. Se describen ácidos nucleicos novedosos obtenidos de *Bacillus turingiensis* que codifican polipéptidos coleopterotóxicos. Se describen varios métodos para elaborar y utilizar estos ácidos nucleicos, secuencias de AADN modificadas sintéticamente que codifican tIC851, y composiciones de polipéptidos nativos y sintéticos. También se describe el uso de secuencias de ADN como pruebas de diagnóstico y plantillas para síntesis de proteína, y el uso de polipéptidos. También se suministran proteínas de fusión, anticuerpos, y fragmentos de péptidos en varias

aplicaciones de insecticidas inmunológicas y diagnóstico, como son métodos de elaboración y uso de secuencias de ácido nucleico en el desarrollo de células de plantas transgénicas que comprenden los polinucleótidos.

1.2. Descripción de la técnica relacionada

Los métodos ambientalmente sensibles para controlar o erradicar la infestación de insectos son deseables en muchos casos, en particular cuando los cultivos de interés comercial están en disputa. Las formulaciones insecticidas ambientalmente sensibles más ampliamente utilizadas desarrolladas en años recientes se han compuesto de pesticidas microbianos derivados de la bacteria *Bacillus turingiensis*. El *B. Turingiensis* es bien conocido en la técnica, y se caracteriza morfológicamente como una bacteria Gram-positiva que produce proteínas de cristal o cuerpo de inclusión que son agregaciones de proteínas específicamente tóxicas a ciertos órdenes y especies de insectos. Muchas diferentes cepas de *B. Turingiensis* han mostrado producir proteínas de cristales insecticidas. Las composiciones que incluyen las cepas de *B. Turingiensis* que producen proteínas insecticidas han estado comercialmente disponibles y se

han utilizado como insecticidas ambientalmente aceptables en razón a que ellas son muy tóxicas para los insectos objeto específicos, pero no son dañosas para las plantas y otros organismos no objetivo.

Existen varias categorías de toxinas establecidas con base en la información de estructura primaria y el grado de similaridades de una toxina a otra. En la década pasada la investigación sobre la estructura y función de las toxinas del *B. Turingiencis* han cubierto las principales categorías de toxinas, y mientras estas toxinas difieren en su estructura y función específica, se han asumido generalidades generales en la estructura y función. Con base en el conocimiento acumulado de las toxinas de *Bacillus turingiencis*, se ha creado un modo generalizado de acción para el *Bacillus turingiencis* e incluye: Ingestión por el insecto, solubilización el intestino medio (una combinación de estómago e intestino delgado), resistencia a enzimas digestivas algunas veces con digestión parcial que "activa" la toxina, uniéndola a las células del intestino medio, formación de un todo en las células del insecto y la irrupción de homeóstasis celular (English and Slatin, 1992).

Muchas de las δ -endotoxinas se relacionan con vario grados de similaridades en sus secuencias de aminoácido. Históricamente las proteínas y los genes que las codifican se clasificaron con base principalmente en su espectro de actividad insecticida. La revisión de Schnepf et al. (Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998) 62:775.806) discute los genes y las proteínas que fueron identificados en *Bacillus turingiensis* antes de 1998, y establece la nomenclatura más reciente y el esquema de clasificación según se aplica a los genes y proteínas insecticidas de *Bacillus turingiensis*. Utilizando esquemas de clasificación de nomenclatura más viejos, los genes cry1 se consideraron que codificaban las proteínas cry1 tóxicas a los lepidópteros, los genes cry2 se consideraron que codificaban las proteínas Cry2 tóxicas tanto a lepidópteros como dípteros, los genes cry3 se consideraron que codificaban las proteínas cry3 tóxicas a coleópteros, y los genes cry4 se consideraron que codificaban a las proteínas cry4 tóxicas a dípteros, sin embargo, la nueva nomenclatura clasifica sistemáticamente las proteínas cry con base en la homología de la secuencia de aminoácidos en lugar de las especificidades objetivo de los insectos. El esquema de clasificación

para muchas toxinas conocidas, no incluyendo evaluaciones alélicas en proteínas individuales, que incluyen dendogramas y listas de toxinas completas de *Bacillus turingiensis* se resume y se actualiza regularmente en [http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil Crickmore/Bt/index.html](http://epunix.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html)

La mayoría de la cerca de 200 toxinas de proteínas cristal Bt tienen algún grado de actividad lepidóptera asociada con ellas. La inmensa mayoría de las proteínas insecticidas del *Bacillus turingiensis* que se han identificado no tiene actividad que controle los coleópteros. Por lo tanto, es particularmente importante, al menos, por razones comerciales identificar proteínas insecticidas específicas adicionales de coleópteros.

Las proteínas cry3 generalmente muestran actividad coleóptera, sin embargo, estas generalmente han limitado la especificidad del rango de huésped y no son significativamente tóxicas a plagas objetivo a menos que se ingieran en dosis muy altas. La clonación y expresión del gen cry3Bb se ha descrito (Donovan et al., 1992). Este gen codifica la proteína de 74 kDa con actividad contra insectos coleópteros, particularmente el cucarrón

de la papa colorado (CPB) y el gusano de la raíz del maíz del sur (SCRW). Las proteínas cry3Bb mejoradas han sido trabajadas por ingeniería que muestran toxicidad incrementada a la vez o menores dosis que la proteína tipo silvestre (patente estadounidense serie No. 6,023,013; Febrero 08, 2000).

Una cepa de *Bacillus turingiensis*, PS201T6, se reportó por tener actividad contra WCRW (*Diabrotica virgifera virgifera*) patente estadounidense No. 5,436,002). Esta cepa también tubo actividad contra *Musca doméstica*, *Aedes aegypti*, y *Liriomyza trifolii*. El gen vip 1 A, que produce una proteína vegetal, soluble, insecticida, se ha clonado y secuenciado (Intl. Pat. Appl. Pub. No. WO 96/10083, 1996). Este gen produce una proteína aproximadamente 80 kDa con actividad contra WCRW y gusano de la raíz del maíz del norte (NCRW). Otra proteína toxina con actividad contra insectos coleópteros, que incluyen WCW, es cry1 IA un polipéptido de 81 kDa, cuyo gen que codifica se ha clonado y secuenciado (Intl. Pat. Appl. Pub. No. WO 96/13651, 1990).

2.0. Resumen de la Invención

El polipéptido de la presente invención y las secuencias de ADN novedosas que codifican la proteína representan un nuevo gen y proteína de cristal de *Bacillus turingiensis*, y solo comparten una homología de secuencia insustancial con cualquiera de las endotoxinas inhibitorias de coleópteros identificada previamente descrita en la técnica anterior. Similarmente, las cepas de *Bacillus turingiensis* de la presente invención comprende secuencias de genes novedosos que expresan un polipéptido que tiene una actividad insecticida contra insectos coleópteros, en particular el gorgojo de la cápsula de algodón (*Anthonomus grandis* Boheman).

Se describe y reivindica aquí un polipéptido de una δ -endotoxina de *Bacillus turingiensis* que comprende la SEC ID NO:8. Los inventores han identificado un polipéptido insecticidamente activo que comprende la secuencia con una longitud de 632 aminoácidos de la SEC ID NO:8 que muestra actividad insecticida contra insectos coleópteros. Por ejemplo, los inventores han mostrado que un polipéptido de δ -endotoxina que comprende la secuencia

de la SEC ID NO:8 tiene actividad insecticida contra la larva del gorgojo del algodón (BWV), pero no contra la larva del gusano de la raíz del maíz del oeste.

El polipéptido de SEC ID NO:8 se codifica mediante un segmento de ácido nucleico que comprende al menos un marco de lectura abierto como se muestra en la SEC ID NO:7 desde la posición del nucleótido 28 hasta la posición del nucleótido 1923. La invención también describe composiciones y formulaciones insecticidas que comprenden tal polipéptido. Tal composición puede ser un extracto celular, una suspensión celular, un homogenato celular, un lisato celular, un supernatant celular, un filtrado de célula o un peletizado de células de unas células de bacteria que comprendan un polinucleótido que codifica tal polipéptido. Ejemplo de células bacteriales que producen tal polipéptido incluyen *Bacillus thuringiensis* EG4135 y EG4268, depositado con NRRL respectivamente en abril 28, 2000. La composición como se describe en detalle adelante se puede formular como un polvo, talco, peletizado, gránulo, rociado, emulsión, coloide, solución, o similar, y puede ser preparable mediante tales medios convencionales como diescación,

liofilización, homogenización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración de un cultivo de células que comprenden el polipéptido. Preferiblemente tales composiciones se obtienen de cultivos de células de *Bacillus turingiensis* EG4135 y EG4268. En todas las tales composiciones que contiene, al menos, uno de tales polipéptidos insecticidas, el polipéptido puede estar presente en una concentración que va de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 99% en peso.

Una formulación de polipéptido insecticida de ejemplo se puede prepara mediante un proceso que comprende las etapas de cultivos células de *Bacillus turingiensis* EG4135 y EG 4268 bajo condiciones efectivas para producir el polipéptido insecticida, y obtener el polipéptido insecticida así producido.

Por ejemplo, la invención describe y reivindica un método de preparación de un polipéptido de δ -endotoxina que tiene actividad insecticida contra un insecto coleóptero. El método involucra de manera general el

aislamiento de un cultivo de células de b..t EG 4135 y EG 4268 que han crecido bajo condiciones adecuadas, el polipéptido de δ -endotoxina producido mediante las células. Tales polipéptidos se pueden aislar del cultivo de células o supernatant o de suspensiones de esporas derivadas del cultivo de células y utilizadas en la forma nativa, o se pueden de otra manera purificar o concentrar según sea apropiado para la aplicación particular.

Un método para controlar una población de insectos coleópteros también se proporciona en la invención. El método involucra generalmente poner en contacto la población con una cantidad insecticidamente efectiva de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido del SEC ID NO:8. Tales métodos se pueden utilizar para matar i reducir el número de insectos coleópteros en un área dad, o se pueden aplicar profilácticamente a un área ambiental para evitar la infestación mediante un insecto susceptible. Preferiblemente el insecto injiere o es contactado con, una cantidad insecticidamente efectiva del polipéptido.

Adicionalmente, la invención proporciona un anticuerpo purificado que une específicamente a los polipéptidos insecticidas. También se proporcionan métodos de preparación de tal anticuerpo, y métodos para usar el anticuerpo para aislar, identificar, caracterizar y/o purificar polipéptidos a los cuales tales anticuerpos se unen específicamente. Los kits inmunológicos y los métodos de inmunodetención útiles en la identificación de tales plps y fragmentos de péptidos y/o epítopos de estos se proporcionan en detalle aquí, y también representan aspectos importantes de la presente invención.

Tales anticuerpos se pueden utilizar para detectar la presencia de tales polipéptidos en una muestra o se pueden utilizar como se describe adelante en una variedad de métodos inmunológicos. Un método de ejemplo para detectar un polipéptido de δ -endotoxina en una muestra biológica involucra generalmente obtener una muestra biológica que se sospecha que contiene el polipéptido de δ -endotoxina; poner en contacto la muestra con un anticuerpo que une específicamente al polipéptido, bajo condiciones efectivas para permitir la formación de

complejos; y detectar los complejos así formados. Para tales métodos, la invención también proporciona un kit de inmunodetección. Tal kit contiene genheralmente medios de contenedor adeucados, un anticuerpo que se une al polipéptido de la δ -endotoxina, y, al menos, un primer reactivo de inmunodetección. Opcionalmente, el kit puede proporcionar reactivos adicionales o instrucciones para utilizar el anticuerpo en la detección de polipéptidos de δ -endotoxina en una muestra.

La preparación de tales anticuerpos se puede lograr utilizando el polipéptido descrito como un antígeno en un animal como se describe adelante. Los epítomos antigénicos, los péptidos más cortos, las funciones de péptidos, los fragmentos de péptido unidos a portador, y similares también se pueden generar del todo o una secuencia de polipéptidos descritas en la SEC ID NO:8. Los péptidos particularmente preferidos son aquellos que comprenden al menos 10 aminoácidos contiguos de la secuencia descrita en SEC ID NO:8.

En otra modalidad, la presente invención también proporciona segmentos de ácido nucleico que comprenden

una región de secuencia de nucleótido seleccionada que comprende una secuencia de polinucleótido de la SEC ID NO:7. En las modalidades preferidas, esta región de secuencia de nucleótidos seleccionada comprende un gen que codifica un polipéptido que comprende al menos la SEC ID NO:8.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un cultivo biológicamente puro de una bacteria de *Bacillus turingiensis* tipo silvestre seleccionada de la cepa EG 4135 y EG 4268, depositadas en abril 18, 2000 en la colección de cultivos de investigación agrícola del laboratorio de investigaciones regional del norte (NRRL), Peoria, Illinois. También se depositó a cepa sIC8501 la cual es una *E. Coli* DH5a que contiene el plásmido pIC17501 que contiene la menos la secuencia que codifica la cepa de *Bacillus turingiensis* EG 4135 tIC851. Estas cepas se depositaron bajo las condiciones del tratado de Budapest, y se obtuvieron las declaraciones de viabilidad de acuerdo con la forma de Recibo Internacional de la BP/4. Las cepas de *Bacillus turingiensis* EG 4135 y EG 4268 son cepas de ocurrencia natural, que contiene, al menos, una región de secuencia que codifica la secuencia

de polipéptidos con una longitud de 632 aminoácidos en la SEC ID NO:8.

Una modalidad adicional de la invención se relaciona con un vector que comprende una región de secuencia que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:8, una célula hospedera recombinante transformada con tal vector recombinante, y cultivos biológicamente puros de bacterias recombinantes transformadas con una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido descrito en la SEC ID NO:8. Vectores de ejemplo, células huésped recombinantes, líneas de células transgénicas, y plantas transgénicas que comprenden al menos una primera región de secuencia que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de SEC ID NO:8 se describen en detalle aquí.

La presente invención también proporciona células huésped transformadas, tejidos de plantas embrionarios, callos de plantas, plántulas, y plantas transgénicas que comprenden una región de secuencia seleccionada que codifica el polipéptido insecticida. Tales células son preferiblemente células procarióticas o eucarióticas tales como bacterias, hongos o células vegetales, con

células bacteriales de ejemplo que incluyen células de *Bacillus turingiensis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* o *seudomonas*.

Las plantas y células hospederas de plantas son preferiblemente células de plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas tales como el maíz, el trigo, la soja, la avena, el algodón, el arroz, centeno, sorgo, caña de azúcar, tomate, tabaco, lana de ceiba, lino, papa, cebada, pasto de césped, pasto de forraje, fresa, fruta, legumbre, vegetal, planta ornamental, arbusto, cactus, suculentas, y células de árbol.

Las plantas transgénicas de la presente invención preferiblemente incorporado dentro de su genoma o transformado en sus cloroplastos o genomas de plástido un polinicleótido seleccionado (o "transgen"), que comprende, al menos una primer región de secuencia que codifica el polipéptido insecticida de la SEC ID NO:8. Las plantas transgénicas, también pretenden comprender la progenie (descendientes, sucesión, etc.) de cualquier generación de cualquier planta transgénica. Una semilla de cualquier generación de todas estas plantas.

transgénicas resistentes a los insectos en donde dicha semilla comprende una secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la presente invención también es un aspecto importante de la invención.

Las plantas transgénicas verdes cruzadas resistentes a los insectos que comprenden un transgen que codifica el polipéptido de la SEC ID NO:8 se puede preparar mediante un método y generalmente involucra obtener una planta transgénica fértil que contiene un transgen cromosomalmente incorporado que codifica el polipéptido insecticida de la SEC ID NO:8; operablemente ligado a un promotor activo en la planta; cruzando la planta transgénica fértil con una segunda planta a la que le falta el transgen para obtener una tercer planta que comprende el transgen; y retrocruzamiento de la tercer planta para obtener una planta fértil retrocruzada. En tales casos, el transgen se puede heredar a través del padre masculino o a través del padre femenino. La segunda planta puede ser un engendro puro, y la tercer planta puede ser un híbrido.

De manera similar, una planta transgénica híbrida resistente a los insectos se puede prepara mediante un

método que generalmente involucra el cruzamiento de una primera y una segunda planta engendrada pura que comprende un transgen cromosomalmente incorporado que codifica el polipéptido de la SEC ID NO:8 operablemente ligado a un promotor expresable de planta que expresa el transgen. En las modalidades de la ilustración, la primera y segunda plantas engendros puros pueden ser plantas monocotiledoneas seleccionadas del grupo que consiste de: maíz, trigo, arroz, cebada, avena, centeno, sorgo, pasto de césped y caña de azúcar.

En una modalidad relacionada, la invención también proporciona un método de preparar una planta resistente a insectos. El método involucra de manera general poner en contacto una célula de planta receptora con una composición de ADN que comprende al menos un primer transgen que codifica el polipéptido de la SEC ID NO:8 bajo condiciones que permiten la toma de la composición de ADN; selecciona una célula receptora que comprende un transgen cromosomalmente incorporado que codifica el polipéptido; regenerar una planta de la célula seleccionada; e identificar la planta transgénica fértil que tiene una resistencia mejorada a los insectos con relación a la planta no transformada correspondiente.

Un método de producción de semillas transgénicas generalmente involucra obtener una planta transgénica fértil que comprende un transgen cromosomalmente integrado que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido del DEC ID NO:8 operablemente ligado a un promotor que expresa el transgen en una planta; y hacer crecer la planta bajo condiciones apropiadas para producir la semilla transgénica.

Un método de producir progenie de cualquier generación de una planta transgénica fértil con resistencia mejorada a los insectos también se proporciona en la invención. El método generalmente involucra recolectar semilla transgénica de una planta transgénica que comprende un transgen cromosomalmente integrado que codifica el polipéptido de la ISC DI NO:8, operablemente ligado a un promotor que expresa el transgen en la planta; plantar la semilla transgénica recolectada; y hacer crecer las plantas transgénicas progenie de la semilla.

Estos métodos para crear plantas transgénicas, progenie y semillas pueden involucrar poner en contacto

la célula de la planta con la composición de ADN que utiliza uno de los procesos bien conocidos para la transformación de células vegetales tales como bombardeo de microproyectiles, electroporación o transformación mediada por *Agrobacterium*.

Un Método de ejemplo descrito aquí proporciona protección a una planta de la infestación del gusano de la cápsula de algodón que comprende proporcionar al gusano de la cápsula de algodón en su dieta una planta transformada para expresar una proteína tóxica a dicho gusano en donde dicha proteína se expresa en cantidades suficientes para controlar la infestación del gusano de la cápsula y en donde dicha proteína se selecciona del grupo que consiste de Cry22Aaa, ET70, y tIC851. En una modalidad adicional de este método, una planta que expresa dos o más de estas proteínas con el propósito de reducir la infestación del gusano de cápsula se contempla, en particular para reducir el desarrollo de razas de gusanos de cápsula resistente a cualquiera de estas proteínas.

Estas y otras modalidades de la presente invención serán evidentes para aquellos expertos en la técnica con

base en los siguientes ejemplos y reivindicaciones, que tienen beneficio de las enseñanzas de la especificación presente.

2.1. secuencias de polinucleótido TIC851

la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que se pueden aislar de cepas de bacillus turingiensis, que están libres de ADN genómico total, y que codifican los polipéptidos insecticidas novedosos y fragmentos de péptidos descritos aquí. Los polinucleótidos que codifican estos péptidos y polipéptidos pueden codificar proteínas de insectividas activos o fragmentos de péptidos, subunidades de polipéptidos, dominios funcionales, o similares de uno o más proteínas de cristal de tIC851 o relacionadas con tIC851, tales como el polipéptido descrito en la SEC ID NO:8. Además la invención comprende secuencias de ácidos nucleicos que se pueden sintetizar completamente in vitro utilizando métodos que son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica que codifican el polipéptido novedoso tIC851, péptidos, fragmentos de péptido, subunidades, o dominios funcionales descritos aquí.

Como se utiliza aquí, el término "secuencia de ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha aislado libre de ADN genómico total o de otra manera de unas especies particulares. Por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido que codifica un polipéptido de endotoxinas se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una primer secuencia que codifica la proteína de cristal ya aislada de, o purificada libre de, ADN genómico total de las especies de las cuales se ha obtenido la secuencia de aminoácido, que en el caso presente es el genoma del género bacterial Gram-positivo, bacilus, y en particular, las especies de bacilus conocidas como *Bacillus turingiensis*. Incluidas en el término "secuencia de ácido nucleico", están las secuencias de polinucleótidos de fragmentos más pequeños de tales secuencias, y también vectores recombinantes, que incluyen, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagémidos, fagos, viriones, baculovirus, cromosmas artificiales, virus, y similares. De acuerdo con esto, las secuencias de polinucleótidos que tienen entre aproximadamente 70% y aproximadamente 80%, o más preferiblemente entre aproximadamente 81% y aproximadamente 90%, o más preferiblemente entre

aproximadamente 91% y aproximadamente 99% de identidad de la secuencia de ácido nucleico o equivalencia funcional a la secuencia de polinucleótidos de la SEC ID NO:7 serán las secuencias que son "esencialmente como se establece la SIC ID NO:7". Las secuencias altamente preferidas son aquellas que son preferiblemente desde aproximadamente 91% a aproximadamente 100% idénticas o funcionalmente equivalentes a la secuencia nucleica del SEC ID NO:7. Otras secuencias preferidas que codifican el tIC851 o secuencias relacionadas con el tIC851 son aquellas que van desde aproximadamente 81% a aproximadamente 90% idénticas o funcionalmente equivalentes a las secuencias de polinucleótidos establecidas en el SEC ID NO:7. De manera similar las secuencias que van desde aproximadamente 71% a aproximadamente 80% idénticas o funcionalmente equivalentes a la secuencia de polipéptidos establecidas en la SEC ID NO:7 se contemplan como útiles en la práctica de la presente invención.

De manera similar, un polinucleótido que comprende un gen aislado, purificado o seleccionado o una región de secuencia se refiere a un polinucleótido que puede incluir además de las secuencias que codifican el péptido, ciertos otros elementos tales como, secuencias

regulatorias, sustancialmente aisladas de otros genes de ocurrencia natural o secuencias que codifican proteína. A este respecto, el término "gen" se utiliza por simplicidad para referirse a una proteína de función, o una unidad codificadora de polipéptido. Como entenderán aquellos expertos en la técnica, este término funcional incluye tanto secuencias genómicas, secuencias de operador y segmentos de gen trabajados por ingeniería que expresan, o se pueden adaptar para expresar polipéptidos de proteínas o péptidos. En ciertas modalidades, un segmento de ácido nucleico comprenderá, de al menos, un primer gen que comprende la secuencia SEC ID NO:8.

Para permitir la expresión del gen, y la traducción del RMNA en un polipéptido maduro, la secuencia de ácido nucleico preferiblemente también comprende al menos un primer motor operablemente ligado al gen para expresar el polipéptido insecticida en una célula huésped transformada con esta secuencia de ácido. El promotor puede ser un promotor endógeno, o alternativamente un promotor heterólogo seleccionado por su capacidad para promover la expresión del gen en uno o más tipo de células particulares. Por ejemplo, en la creación de plantas transgénicas y células de plantas que comprenden

un gen tIC851, el promotor heterólogo de escogencia es aquel que sea expresable en la planta, y en muchos casos puede preferiblemente ser un promotor expresable en la planta que es específico al tejido o al ciclo de la célula. La selección de promotores expresables en plantas es bien conocida por aquellos expertos en la técnica de la transformación de plantas, y aquí se describen promotores adecuados de ejemplo. En ciertas modalidades, el promotor expresable en la planta se puede seleccionar de un grupo que consiste de cintetasa de sucrosa de maíz 1, dehidrogenasa de alcohol de maíz 1, complejos de cosecha de maíz ligero, proteína de choque al calor, carboxilasa, RuBP su unidad pequeña de guisante, manopoin sintasa de plásmido Ti, nopalin sintasa de plásmido Ti, chalcon isomerasa de petunio, proteína 1 rica en glicina deaba, patatina de papa, lecitina, CaMV 35S, y promotor de carboxilasa RuBP de subunidad pequeña S-E9.

Aisladas sustancialmente alejada de otras secuencias de codificación" significa que el gen de interés, en este caso, un gen que codifica una proteína de cristal bacteriana forma la parte significativa de la región codificante del segmento de ADN, y que el segmento de ADN no contiene porciones grandes de ADN codificante de

ocurrencia natural, tales como grandes fragmentos cromosomales u otros genes funcionales o regiones que codifican operon. Por supuesto, esto se refiere al segmento de ADN según se aisló originalmente, y no excluye genes, genes recombinantes, ligadores sintéticos, o regiones codificantes tardías agregadas al segmento por la mano del hombre.

También se debe entender que esta invención no está limitada a las secuencias de ácido nucleico particulares que codifican péptidos de la presente invención, o que codifican la secuencia de aminoácido del SEC ID NO:8 que incluyen la secuencia de ADN que es particularmente descrita en la SEC ID NO:7. Los vectores recombinantes de los segmentos de ADN aislados pueden por lo tanto incluir variadamente las regiones de codificación de polipéptidos mismas. Regiones codificantes que llevan alteraciones seleccionadas o modificaciones en la región codificante básica o ellos pueden codificar polipéptidos mayores que sin embargo incluyen estas regiones codificantes de péptidos o puede codificar proteínas equivalentes biológicamente funcionales o péptidos que tienen secuencias de aminoácidos variantes.

Las secuencias de ADN de la presente invención comprenden péptidos equivalentes biológicamente funcionales. Tales secuencias pueden surgir como consecuencia de una degeneración de codón y equivalencia funcional que son conocidas por ocurrir naturalmente dentro de las secuencias de ácido nucleico y las proteínas así codificadas. Alternativamente, las proteínas funcionalmente equivalentes o péptidos pueden ser creadas por vía de la aplicación de la tecnología del ADN recombinante, en cuyos cambios en la estructura de la proteína se pueden trabajar por ingeniería, basadas en consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que están siendo intercambiados. Si se desea, uno podría también preparar proteínas de fusión y péptidos, por ejemplo, donde las regiones que codifican los péptidos que están alineadas dentro de la misma unidad de expresión con otras proteínas o péptidos que tienen las soluciones deseadas, tales como para purificación o propósitos de inmunodetección (por ejemplo proteínas que se pueden purificar mediante cromatografía de afinidad y regiones que codifican la etiqueta de enzima respectivamente). Los vectores recombinantes forman aspectos adicionales de la presente invención, particularmente los vectores útiles se contemplan como aquellos vectores en los cuales la

porción codificante de la porción de ADN, sea que codifiquen una proteína insecticida de longitud completa o un péptido menor, se ubican bajo el control de un promotor. El promotor puede estar en la forma del promotor que está naturalmente asociado con un gen que codifica péptidos de la presente invención, como se puede obtener al aislar las secuencias no codificantes 5' localizadas corriente arriba del segmento de codificación o exón, por ejemplo, utilizando clonación recombinante y/o tecnología PCRTM, en relación con las composiciones descritas aquí. En muchos casos, el promotor puede ser el promotor nativo tIC851, o alternativamente un promotor heterólogo, tal como aquellos de origen bacteriano (incluyendo promotores de otras proteínas de cristal) origen fungoso, viral, origen fago o fagémido (que incluyen promotores tales como CaMV35, y sus derivados, T3, T7, λ , y promotores ϕ y similares), o el origen de la planta, que incluyen promotores constitutivos, inducibles, y/o de tejido específico y similares.

En otras modalidades, se contempla que ciertas ventajas se ganarán al ubicar la secuencia de ADN codificante bajo el control de un promotor recombinante o

heterólogo. Como se utiliza aquí, un promotor recombinante o heterólogo está destinado a referirse a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ADN que codifica una proteína de cristal o péptido en su ambiente natural. Tales promotores pueden incluir promotores normalmente asociados con otros genes, y/o promotores aislados de cualquier célula bacterial, viral, eucariótica, o de planta. Naturalmente, será importante emplear un promotor que dirija efectivamente las expresiones del segmento de ADN en el tipo de célula, organismo, o un animal, escogido por expresión. El uso del promotor y de las combinaciones de tipo de célula para la expresión de la proteína se conoce generalmente por aquellos expertos en la técnica de la biología molecular, por ejemplo, ver Sambrook et al., 1989. Los promotores empleados pueden ser constitutivos, o inducibles, y se pueden utilizar bajo condiciones apropiadas para dirigir alto nivel de expresión de la secuencia de ADN introducida, tal como es ventajoso en producción a gran escala de proteínas o péptidos recombinantes. Los sistemas promotores adecuados contemplados para uso en expresión de alto nivel incluyen pero no están limitados a, sistema de expresión Pichia (Pharmacia LKB) Biotechnology).

Aún en otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para producir una planta transgénica que expresa una secuencia de ácido nucleico seleccionada que comprende una región de secuencia que codifica los polipéptidos de endotoxina novedosos de la presente invención. El proceso de producir plantas transgénicas es bien conocido en la técnica. En general, el método comprende transformar una célula hospedera vegetal adecuada con una secuencia de ADN que contiene un promotor operativamente ligado a una región codificante que codifica uno o más polipéptidos tI851. Tal región codificante está generalmente operativamente ligada a, al menos, una primer región de terminación de transcripción, por medio de la cual el promotor es capaz de dirigir la transcripción de la región codificante en la célula, y de esta manera proporcionarle a la célula la capacidad de producir el polipéptido in vivo. Alternativamente, en casos donde es deseable controlar, regular, o disminuir la cantidad de una proteína de cristal recombinante particular expresada en una célula transgénica particular, la invención también proporciona la expresión del mRNA antisentido de la proteína de cristal. El uso del mRNA antisentido como medio para controlar o

disminuir la cantidad de una proteína dada de interés en una célula es bien conocido en la técnica.

Otro aspecto de la invención comprende plantas transgénicas que expresan un gen, secuencia de gen, o región de secuencias que codifica al menos uno o más de las composiciones de polipéptidos descritas aquí. Como se utiliza aquí, el término "planta transgénica" pretende referirse a una planta que ha incorporado secuencias de ADN que incluyen pero no están limitadas a genes que no están quizás normalmente presentes, secuencias de ADN normalmente no transcritas en el ARN o traducidas en una proteína ("Expresada") o cualquier otros genes o secuencias de ADN que uno desea introducir en la planta no transformada tales como genes que pueden normalmente estar presentes en la planta no transformada pero que uno desea manejar por ingeniería genética o tener la expresión alterada.

Se contempla que en algunos casos el genoma de una planta transgénica de la presente invención se aumentará a través de la introducción estable de uno o más transgenes, bien sea nativos, sintéticamente modificados o mutados, que modifican un polipéptido insecticida que

es idéntico a, o altamente homólogo al polipéptido descrito en la SEC ID NO:8. En algunos casos, más de un transgen se incorporará dentro del genoma de la célula vegetal huésped transformada. Tal es el caso cuando más de una secuencia de ADN que codifica proteína de cristal se incorpora dentro del genoma de tal planta. En ciertas ocasiones, puede ser deseable tener 1,3,4, o aún más proteínas de cristal de *Bacillus turingiensis* (bien sea nativas o manejadas por ingeniería recombinante) incorporadas y establemente expresadas en la planta transgénica transformada. Alternativamente, un segundo transgen se puede producir en la célula vegetal para conferirle rasgos genotípicos adicionales a la planta. Tales transgenes pueden conferirle resistencia a uno o más insectos, bacterias, hongos, virus, nemátodos u otros patógenos.

Un gen preferido que se puede introducir incluye, por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica la proteína de cristal proveniente de origen bacteriano, y particularmente uno o más de aquellos descritos aquí que se obtienen del *Bacillus* spp. Las secuencias de ácido nucleico altamente preferidas son aquellas obtenidas del *Bacillus turingiensis*, o cualquiera de aquellas secuencias

que han sido manejadas por ingeniería genética para disminuir i incrementar la actividad insecticida de la proteína de cristal en tales células de huésped transformadas.

Medios para transformar una célula vegetal y la preparación de las células vegetales, y la regeneración de línea celular transgénica proveniente de células transformadas, cultivos de células, embriones, o tejidos de cayo son bien conocidas en la técnica, y se discuten aquí. Los vectores, (incluyendo plásmidos, cósmidos, fagos, fagémidos, baculovirus, virus, viriones, YAC[cromosomas artificiales vacterianos], YAC [cromosomas artificiales de levadura]) comprenden, al menos, un primer segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido insecticida para uso en la transformación de tales células que generalmente, por supuesto, comprenderá bien sea operones, genes, o secuencias derivadas de gen de la presente invención, bien sea nativas o sintéticamente derivadas, y particularmente aquellas que codifican las proteínas de cristal descritas. Estas construcciones de ácido nucleico puede adicionalmente incluir estructuras tales como promotores, mejoradores, poliligadores, intrones, terminadores o aún secuencias de

genes que tienen una actividad reguladora positiva o negativa sobre el gen de δ -endotoxina clonado según se desee. La secuencia de ADN o el gen puede codificar bien sea una proteína de cristal nativo modificada que se expresará en las células recombinantes resultantes y/o que le conferirá a la planta transgénica que comprende tal segmento, un genotipo mejorado (en este caso, una resistencia incrementada al ataque de insectos, infestación, o colonización).

La preparación de una planta transgénica que comprende al menos una secuencia de polinucleótidos que codifica un TIC851 o un polipéptido derivado del tIC851 con el propósito de incrementar o mejorar la resistencia de tales plantas al ataque por medio de insectos objetivo representa un aspecto importante de la invención. En particular, los inventores describen aquí la preparación de plantas monocotilodones o dicotiledoneas resistente a los insectos, al incorporar en tal planta, una secuencia de ADN transgénico que codifica al menos el polipéptido tIC851 tóxico a los insectos coleópteros.

En un aspecto relacionado, la presente invención también comprende una semilla producida por la planta transformada, una progenie de tal semilla, y una semilla producida por la progenie de la planta transgénica original, producida de acuerdo con el proceso anterior. Tal progenie y semillas tendrán un transgen que codifica la proteína de cristal establemente incorporado dentro de su genoma, y tales plantas de progenie heredarán las características logradas mediante la introducción de un transgen estable en la forma Mendeliana. Todas aquellas plantas que tienen incorporados en sus genomas secuencias de AADN transgénico codifican una o más proteínas o polipéptidos de cristal tIC851 son aspectos de esta invención. Como es bien conocido por aquellos expertos en la técnica, una progenie de una planta se entiende que significa cualquier prole o cualquier descendencia de tal planta.

2.3. Definiciones

Las siguientes palabras y frases tienen los significados establecidos adelante.

Una: de acuerdo con la larga tradición de patentes, "una" utilizada a lo largo de esta descripción pretende significar "una o más".

Que comprende, comprende: manteniendo la larga tradición en patentes establecida, "que comprende" y "comprende" utilizada a lo largo de esta descripción pretende significar "que incluye, pero no limitada a"

Expresión: la combinación de procesos intracelulares, que incluyen al menos transcripción y a menudo la traducción subsecuente de mRNA de una molécula de ADN codificante tal como un gen estructural para producir un polipéptido.

Promotor: un sitio de reconocimiento sobre una secuencia de ADN o grupo de secuencias de ADN que proporcionan un elemento de control de expresión para el gen estructural o secuencia a ser transcrito y al cual se une específicamente una polimerasa de ARN e inicia una síntesis de ARN (transcripción) de aquel gen o secuencia a ser transcrito.

Regeneración: el proceso de crecimiento de una planta proveniente de una planta de célula vegetal (por ejemplo protoplasto vegetal o explanta).

Gen estructural: una secuencia de ADN que codifica un ARN mensajero que se puede transcribir para producir un polipéptido.

Transformación: un proceso de introducción de secuencia de ADN hexógeno (por ejemplo un vector, una molécula de ADN recombinante) en una célula, protoplasto, u organelo dentro de una célula, en el cual aquel ADN hexógeno se incorpora dentro del ADN nativo a la célula, o es capaz de replicación autónoma dentro de la célula.

Célula transformada: una célula cuyo genotipo se ha alterado mediante la introducción de una secuencia de ADN hexógeno dentro de la célula.

Célula transgénica: cualquier célula derivada de o regenerada de una célula transformada. Células transgénicas de ejemplo incluyen cayos de plantas derivados de una célula de planta transformada y células particulares tales como hojas, raíces, tallos, por

ejemplo células somáticas, o células reproductivas (germen) obtenidas de una planta transgénica.

Planta transgénica: una planta o una progenie de cualquier generación de la planta que fue derivada de una célula vegetal transformada o protoplasto, en donde los ácidos nucleicos de la planta contienen una región de secuencia de ácido nucleico seleccionada hexógena no originalmente presente en la planta no transgénica nativa de la misma variedad. Los términos "planta transgénica" y "planta transformada" han sido utilizados algunas veces en la técnica como expresiones sinónimas para definir una planta cuyo ADN nativo ha sido alterado para contener una molécula de ADN heterólogo. Sin embargo, se cree más científicamente correcto referirse a una planta regenerada o a un cayo obtenido de una célula vegetal transformada o células de protoplasto como a una planta transgénica. Preferiblemente, las plantas transgénicas de la presente invención incluyen aquellas plantas que comprende, al menos, un primer polinucleótido seleccionado que codifica un polipéptido insecticida. este polinucleótido seleccionado es preferiblemente una región codificante de δ -endotoxina (o gen) operablemente

ligado, a al menos, un primer promotor que expresa la región codificante para producir el polipéptido insecticida en la planta transgénica. Preferiblemente, las plantas transgénicas de la presente invención que producen el polipéptido codificado demuestran un fenotipo de resistencia mejorado a las plagas de insecto objetivo. Tales plantas transgénicas, su progenies, descendientes, y semilla de cualquiera de tales generaciones son preferiblemente plantas resistentes a insectos.

Vector: una molécula de ácido nucleico capaz de replicación en una célula huésped y/o a la cual otra secuencia de ácido nucleico se puede operablemente ligar de tal forma replicación aproximada de los segmentos unidos. Los plásmidos, fagos, fagélidos, y cósmidos son todos vectores de ejemplo. En muchas modalidades, los vectores son utilizados como un vehículo para introducir uno o más de los polinucleótidos seleccionados en una célula huésped generando de esta manera una célula huésped "transformada" o "recombinante".

3.0. Breve Descripción de los Dibujos

los dibujos de parte de la presente especificación se incluyen para demostrar adicional ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede ser mejor entendida mediante referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentes aquí.

La figura 1 ilustra una secuencia de nucleótidos y la traducción de la secuencia de aminoácido del gen tIC851 como derivado de las cepas EG 4135 y 4268.

La figura 2 ilustra un alineamiento de secuencia de aminoácido de las proteínas relacionadas CryET70 y Cry22Aa, así como también el alineamiento de mejor ajuste del tIC851.

4.0. Descripción de las modalidades ilustradas.

4.1. Algunas ventajas de la invención

La presente invención proporciona una δ -endotoxina novedosa, designada tIC851, que es altamente tóxica al gusano de la cápsula de algodón, *Antonomus grandis*

Boheman. Esta proteína tiene una secuencia de aminoácido que está sustancialmente no relacionada con otras δ -endotoxinas que son tóxicas a los insectos coleópteros. La identificación del Cry22Aa y CryET70 representa una nueva clase de proteínas de cristal insecticida. La diferencia de otras proteínas de cristal insecticida tóxicas WCRW de *Bacillus turingiensis*, el CryET70 no tiene una toxicidad significativa para el SCRW o el CPB. Las únicas proteínas conocidas que están relacionadas con el CryET70 es el Cry22Aa, una proteína de cristal insecticida que se reportó por ser tóxica solo a insectos himenópteros (Número de acceso al GenBank No. I34547. Los inventores aquí describen una δ -endotoxina de *Bacillus turingiensis* novedosa que muestra solo si la similaridad insustancial con la CryET70 o la Cry22Aa, y muestra diferencias sustanciales en el espectro insecticida y la actividad cuando se comparan con ambas de estas proteínas. Los inventores también describen que tanto la CryET70 como la Cry22Aa tienen toxicidad significativa a las larvas del gusano de cápsula de algodón.

4.2. Plagas de Insectos

Casi todos los cultivos de campo, plantas, y áreas de cultivo comerciales más susceptibles al ataque de una o más plagas de insectos. Las plagas de coleópteros particularmente problemáticas se identifican en la tabla 1.

Tabla 1
Taxonomía de plagas de coleópteros en los subórdenes Arcostemata y Polyfaga

Infraorden &/o superfamilia	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especies
	Cupedidae (escarabajo reticulado)			Priacma	P. Serrata
Bostrichiformia	Dermestidae (escarabajos de piel y disperso)			Attagenus	A. pelli
Chrysomeliformia	Cerambycidae (escarabajos de cuerno largo)			Agapantia	Agapantia sp.
		Lepturinae		Leptura	Leptura sp. (escarabajo de cuerno largo de flor)
				Rhagium	Rhagium sp.
				Megacillene	M. robiniae
		Prioninae		Derobracus	D. gemianatus
				Tetraopes	T. tetroptalmus
		Clamisinae		Exema	E. neglecta
	Crisomelidae (escarabajo de hoja)	Crisomelinae		Crisomela	C. tremula, crisomela sp.
				Oreina	O. cacaliae
				Crisolina	Crisolina sp.
				Leptinotarsa	L. decemlineata (escarabajo de papa colorada)

7/8

Infraorden	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especies
			Goniocetini	gonioctena	G. fornicata, G. holdausi, G. intermedia, G. interposita, G. kamikawi, G. lineana, G. nigroplagiata, G. occidentalis, G. oolivacea, G. pallida, G. quinquepunctata, G. rubripennis, G. rufipes, G. tredecim-maculata, G. variabilis, G. viminalis
			Timarchini	Timarcha	Timarcha sp.
		Criocerinae		Oulema	Oulema sp.
		Galerucinae	Galerucini	Monoxia	M inorata, Monoxia sp.
				Ofraella	O. arctica, O. Artemisiae, O. Bilineata, O. Communis, O. Conferta, O. Cribata, O. Notata, O. Notulata, O. Nuda, O. Pilosa, O. Sexvittata, O. Slobodkini
			Luperini	Ceratomyza	C. trifurcata
				Diabrotica	D. barberi (lombriz de maíz del norte), D. Undecimpunctata, (lombriz de maíz de raíz del sur, D. Vigifera (lombriz de maíz de raíz del oeste)
		Crisomelidae no clasificada		Lacnais	Lacnais sp.
				Epitrix	E. cucumeris (Harris) (escarabajo de la papa), E. Fuscula (pulga de la planta de huevo)
	Curculioninae (gusanos)	Curculioninae		Antonomus	A. grandis (gusano de cápsula) de huevo
		Entiminae	Haupectini	Acanthosoma	A. confrostris, A. Globoculus, A. Intermedius, A. Planiculus, A. Teselatus
				Otiorhynchus	Otiorhynchus sp.

44

Infraorden	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especies
			Fillobini	Diaprepes	D. abbreviata
				Fillobius	Fillobius sp.
				Galapaganus	G. galapagoensis
		Hiperniæ		Hypera	H. brunneipennis (gusano de alfalfa egipcia), H. Postica (gusano de alfalfa), H. Punctata (gusano de hoja de trébol)
		Molitinae		Pissodes	P. affinis, P. Memorensis, P. Schwarzii, P. Strobeli, P. Terminalis
		Rincoforinae	Sitofilini	Sitophilus	S. granarius (gusano de granero), S. Zeamais (gusano de maíz)
	Nemoncidae			Lebanorinus	L. succinus
	Scolitidae			Ips	I. acuminatus, I. Amitinus, I. Cembrae, I. Duplicata, I. Hannsfeldi, I. Sexdentatus, I. Tipografus
				Ortomicus	O. erosus
Cucujiformia				Tomicus	T. minor
	Coccinellidae (escarabajo mariquita)			Epilacna	E. borealis (es mariquita de sumo), E. Varivatis (escarabajo de haba mejicana)
	Cucujidae (escarabajo de corteza plana)			Criptolestes	C. ferrugineus
				Orizaefilus (grandes escarabajos)	O. surinamensis (escarabajo de grano con diente aserrado)
	Lagriidae (escarabajo de unipon larga)			Lagria	Lagria sp.
	Meloidae (escarabajo o pito)			Epicauta	E. funebris
				Meloe	M. proscarabaeus
	Rhipifrodidae			Rhipiforus	R. fasciatus

ff

Infraorden	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especies
	Tenebrionidae (escarabajo de fondo oscuro)			Alfitobius	A. diaperinus lombriz disminuidora de comida
				Hegeter	H. amaroides, H. brevocollis, H. costipennis, H. fernandezi, H. glaber, H. gomerensis, H. gran-canariensis, H. impressus, H. intercedens, H. lateralis, H. plicifrons, H. politus, H. subrotundatus, H. tenui-punctatus, transversus, H. webbianus
				Misolampus	M. goudoti
				Palorus	P. fisticola, P. Ratzeburgi (escarabajo de harina de hoja pequeña), P. Subdepressus (escarabajo deprimido de harina)
				Pimelia	P. baetica, P. canariensis, P. criba, P. elevata, P. estevezi, P. fernan-dexlopezi, P. grandis, P. granulicollis, P. integra, P. interjecta, P. laevigata, P. lutaria, P. radula, P. sparsa, P. variolosa
				Tenebrio	T. molitor (lombriz amarilla), T. Obscurus (lombriz oscura)
				Tentiria	T. shcaumi
				Trobelium	T. brevicornis, T. castaneum (escarabajo rojo de harina), T. confusum (escarabajo confundido de harina), T. freemani, T. Madens
				zofobas	Z. atratus
					z. rugipes

Infraorden	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especies
Elateriformia- superfamilia elateroidea				Octinodes	Octinodes sp.
				Piroforus	P: plagio-ftalanus
Scarabaeiformi a	Lucanidae (escarabajo ciervo)			Dorcus	D. paralelo pipedus
				allomirina	L. cervus
	Scarabaeidae (escarabajo lamellicórneo)			Lacanus	A. dicotoma
		Cetoniinae (escarabajo de flor)		Pachnoda	P. marginata
		Dynastinae		Xyloryctes	X. faunus
		Geotrupinae (escarabajo de estiercol perforador de suelos)		Geotrupes	G. stercorosus
		Melolontinae (raspador)		Costelytra	C. zealandica
				Melotricia	M. diomfalia
				Melolonta	M. melolonta (gastador)
				Odontria	O. striata
					O. variegata
				Prodontria	P. bicolorata, P. capito, P. lewisi, P. tarsis, P. modesta, P. pinguis P. praelatella, P. truncata, P. prodontria sp.
				Scytrodes	S. squalidus
		Rutelinae (raspador brillante de hoja)		Popillia	P. laponica (escarabajo japonés)

47

Infraorden	Familia	Subfamilia	Tribu	Género	Especies
		Scarabaeinae		Copris	C. lunaris (escarabajo negro de excremento)
				Scarabaeus	Scarabaeus sp. (escarabajo)
estafiliniformes	Hidrofilidae			Cercyon	Cercyon sp.
	Silfidae			Microforus	N. americanus, N. marginatus, N. Orbicollis, N. tomentosus
	Stafilinidae (escarabajo errante)			Carpellinus	Carpellinus sp.
				Quedius	Quedius
				Tachyporus	Tachyporus sp. Xantolinus sp.
				Xantolinus	Xantolinus sp.

4.3. Sondeos e Iniciadores

en otro aspecto, la información de la secuencia de ADN suministrada por la invención permite la preparación de secuencias de ADN relativamente cortas (o ARN) que tiene la capacidad de hibridizar específicamente a secuencias de genes de los polinucleótidos descritos aquí. En estos aspectos, los sondeos de ácidos nucleicos de una longitud apropiada se preparan con base en una consideración de una secuencia de gen que codifica una proteína de cristal seleccionada, por ejemplo una secuencia tal como aquella mostrada en la SEC ID NO:9 (tIC851), SEC ID NO:10 (Cry22Aa), y SEC ID NO:2 (CryET70). La capacidad de tal ADN y sondas de ácido nucleico para hibridizar específicamente a una secuencia de un gen que codifica la proteína de cristal y se otorga particular utilidad en una variedad de modalidades. Las más importantes sondas se pueden utilizar en una variedad de ensayos para detectar la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada.

En ciertas modalidades, es ventajoso utilizar iniciadores de oligonucleótidos. La secuencia de tales

iniciadores se designa utilizando un polinucleótido de la presente invención para utilizarlo en la detección, amplificación o mutación de un segmento definido de un gen de proteína de cristal de *Bacillus turingiensis* utilizando tecnología de amplificación térmica. Las secuencias de los genes de proteína de cristal de otras especies también se puede amplificar utilizando tales iniciadores.

Para proporcionar ciertas ventajas de acuerdo con la presente invención, una secuencia de ácido nucleico empleada para estudios o ensayos de hibridización incluyen secuencias que son complementaria a al menos aproximadamente 23 a aproximadamente 44 tramo de nucleótidos en longitud de una secuencia que codifica una proteína de cristal, tal como la mostrada en la SEC ID NO:7 (tIC851), SEC ID NO:9 (Cry 22Aa), o SEC ID NO:1 (CryET70). Un tamaño de al menos aproximadamente 14 o 15 o algo así de nucleótidos de longitud ayuda a asegurar que el fragmento será de suficiente longitud para formar una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. Las moléculas que tienen moléculas que tienen secuencias complementarias sobre tramos mayores de aproximadamente 23 o algo así de bases en longitud son preferiblemente,

aunque, con el fin de incrementar la estabilidad y selectividad del híbrido, y por lo tanto mejorar la calidad y el grado de las moléculas híbridas específicas obtenidas. Uno generalmente preferirá diseñar moléculas de ácido nucleico que tienen tramos de genes complementarios de aproximadamente 14 a 20 nucleótidos, o aún mayores cuando se desee. Tales fragmentos pueden ser fácilmente preparados mediante, por ejemplo, sintetización directa del fragmento mediante medios químicos por la aplicación de tecnología de reproducción de ácido nucleico tal como tecnología PCR™ de las patentes estadounidenses 4,683,195, y 4,683,202, también incorporadas aquí como referencia o al retirar con corte fragmentos de ADN seleccionado de plásmido recombinantes que contienen insertos apropiados y sitios de restricción adecuados.

4.4. vectores de expresión

la presente invención contempla un polinucleótido de la presente invención comprendido dentro de uno o más vectores de expresión. De esta manera, en una modalidad un vector de expresión comprende un segmento de ácido nucleico que contiene un gen tIC851 operablemente ligado

a un promotor que expresa el gen. Adicionalmente, la región codificante también puede ser operablemente ligada a una región de terminación de transcripción, por medio del cual el promotor maneja la transcripción de la región de codificación, y la región terminadora de la transcripción detiene la transcripción en algún punto 3' de la región de codificación.

Como se utiliza aquí, el término "operablemente ligado" significa que un promotor está conectado a una región de codificación de tal manera que la transcripción de tal región de codificación se controla y se regula por aquel promotor. Los medios para ligar operativamente un promotor a una región de codificación son bien conocidos en la técnica.

En una modalidad preferida, la expresión recombinante del ADN que codifica las proteínas e cristal de la presente invención está de preferencia en una célula hospedera de *Bacillus*. Las células hospederas preferidas incluyen células hospederas de *Bacillus turingiensis*, *B. Megaterium*, *B. Subtilis* y siendo los *Bacillus* relacionados con células hospederas de *Bacillus turingiensis* altamente preferidos. Los promotores que

funcionan en bacterias son bien conocidos en la técnica. Un promotor de ejemplo y preferido para las proteínas de cristal derivadas de *Bacillus* incluyen cualquiera de los promotores de gen de proteína de cristal conocidos, que incluyen el promotor de gen tIC851 mismo. Alternativamente, los promotores mutagenizados o recombinantes se pueden trabajar por ingeniería de la mano de la mano del hombre y ser utilizados para promover la expresión de segmentos de gen novedosos descritos aquí.

En una modalidad alternativa, la expresión recombinante del ADN que codifica las proteínas de cristal del a presente invención se transforma utilizando una bacteria gram negativa tal como una célula hospedera de *E. Coli* o *Seudomona* spp. Los promotores que funcionan en expresión de alto nivel de polipéptidos objetivos en *E. Coli* y otras células hospederas gram negativas son bien conocidas en la técnica.

Donde se va a utilizar un vector de expresión de la invención para transformar una planta se selecciona un promotor que tenga la capacidad de manejar la expresión de las plantas. Los promotores que funcionan en las

plantas son bien conocidos en la técnica. La utilidad en la expresión del polipéptido en las plantas son los promotores que son inducibles, virales, sintéticos constitutivos como se describió (Poszkowski et al., 1989; Odell et al., 1985), y temporalmente regulados, espacialmente regulados y espacio temporalmente regulados (Chau et al., 1989).

Un promotor también se selecciona por su capacidad para dirigir las células vegetales transformadas o la actividad transcripcional de las plantas transgénicas a la región codificante. Los genes estructurales se pueden manejar mediante una variedad de promotores en tejidos vegetales. Los promotores pueden ser constitutivos cercano, tales como el promotor CaMV 35S, o específicos de tejido o promotores específicos de desarrollo que afectan las dicotiledóneas o las monocotiledóneas.

Cuando el promotor es un promotor cercano constitutivo tal como el CaMV 35S, se encuentran incrementos en la expresión del polipéptido en una variedad de un tejido vegetal transformado (por ejemplo cayos, hoja, semilla y raíz). Alternativamente, los efectos de transformación se pueden dirigir a tejidos de

plantas específicas al utilizar plantas que integran vectores que contienen un promotor específico de tejido.

Un ejemplo de promotor específico de tejido es el promotor de Lectina, que es específico para tejido de semilla. A la proteína de Lectina en semillas de cebolla se codifica mediante un gen sencillo (Lel) que solo se expresa durante la maduración de la semilla en cantidades de aproximadamente 2 a aproximadamente 5% del total de mRNA de semilla. El gen de Lectina y el promotor específico de proteína de almacenamiento de semilla ha sido completamente caracterizado y utilizado para dirigir expresión específica de semilla en plantas de tabaco transgénico (Vodkin et al., 1983, Lindstrom et al., 1990).

Un vector de expresión que contiene una región de codificación que codifica un polipéptido de interés se trabaja por ingeniería para tener bajo control de promotor de Lectina y aquel vector es introducido en plantas utilizando, por ejemplo, un método de transformación de protoplastos (Dhir et al., 1991). La expresión del polipéptido está específicamente dirigida a la semilla de la planta transgénica.

Una planta transgénica de la presente invención producida de una célula vegetal transformada con un promotor específico de tejido se puede cruzar con una segunda planta transgénica desarrollada de una célula vegetal transformada con un promotor específico de tejido diferente para producir una planta transgénica híbrida que muestra los efectos de la transformación en más de un tejido específico.

Los promotores específicos de ejemplo son sintetasa 1 de sucrosa de maíz /(Yang et al., 1990), deshidrogenasa 1 de alcohol de maíz, Vogel et al., 1989), complejos de cosecha ligera de maíz (Simpson, 1986), proteína de choque al calor de maíz (Odell et al; 1985), carboxilasa RuBP subunidad pequeña de guisante (Poulsen et al., 1986; Cashmore et al., 1983), sintasa manopina de plásmido Ti (Langridge et al., 1989), sintasa nopalina de plásmido Ti (langridge et al., 1989), isomerasa chalcone (Van Tuene et al., 1988), proteína 1 rica en glicina de haba (Keller et al., 1989), transcriptos de CaMV 35S (Odell et al., 1985) y papatina de papa (Wenzler et al., 1989). Los promotores preferidos son el promotor del virus del

mosaico de coliflor (CaMV 35S) y el promotor de carboxilasa RuBP subunidad pequeña S-E9.

La escogencia de cual vector de expresión y finalmente a cual promotor está operativamente ligada la región de codificación de polipéptido depende directamente de las propiedades funcionales deseadas, por ejemplo, el sitio y tiempo de expresión de la proteína, y la célula hospedera a ser transformada. Existen limitaciones bien conocidas inherentes a la técnica de la contrucción de moléculas de ADN recombinantes. Sin embargo, un vector útil en la práctica de la presente invención es capaz de dirigir la expresión de una región que codifica un polipéptido a la cual está operativamente ligada.

Los vectores útiles para la expresión de genes en platos superiores son bien conocidos en la técnica e incluyen vectores derivados de plásmidos que inducen tumores (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* descritos (Rogers et al., 1987). Sin embargo, varios otros sistemas de vectorse que integran plantas son conocidos por funcionar en plantas que incluyen el vector de control de transferencia pCaMVCN descrito (de Fromm et al., 1985).

El pCaMVCN (disponible de Pharmacia, Piscataway, NJ) incluye el promotor CaMV 35S del virus mosaico del mosaico del coliflor.

En modalidades preferidas, el vector utilizado para expresar los polipéptidos incluye un marcador de selección que es efectivo en una célula vegetal, preferiblemente un marcador de selección resistente a drogas. Un marcador resistente a drogas preferido es el gen cuya expresión da como resultado resistencia a canalisina; es decir, el gen quimérico que contiene el promotor de la nopalina sintasa, neomicina fosfotransferasa II (nptII) y región no traducida 3' de nopalina sintasa descrito (Rogers et al., 1988).

La polimerasa de ARN describe una secuencia de ADN codificante a través del sitio donde ocurre la poliadenilación. Típicamente, las secuencias de ADN localizadas a pocos cientos de pares base corriente abajo del sitio de poliadenilación sirve para terminar la transcripción. Aquellas secuencias de ADN son denominadas aquí como regiones de terminación de transcripción. Aquellas regiones son requeridas por eficiente poliadenilación de ARN mensajero descrito (mARN).

Los medios para la preparación de vectores de expresión son bien conocidos en la técnica. La expresión (vectores de transformación) utilizada para transformar las plantas y los métodos de elaboración de aquellos vectores son descritos en la patente estadounidense series Nos. 4,971,908, 4,940,835, 4,769,061 y 4,757,011, cuyas descripciones se incorporan aquí específicamente aquí mediante referencia en su totalidad. Aquellos vectores pueden ser modificados para incluir una secuencia codificante de acuerdo con la presente invención.

Se han desarrollado una variedad de métodos para insertar operativamente una secuencia de ADN en un vector por vía de terminales conocidos complementarios o extremos despuntados. Por ejemplo, sistemas de homopolímeros complementarios se pueden agregar a la secuencia de ADN para ser insertada y al ADN vector. El vector en al secuencia de ADN son entonces unidas por un enlace de hidrógeno entre las colas homopoliméricas complementarias para formar moléculas de ADN recombinantes.

Una región de codificación que codifica un polipéptido que tiene la capacidad de conferir actividad insectívora a la célula es preferiblemente un gen que codifica la proteína de cristal tIC851 de *Bacillus turingiensis*. En las modalidades preferidas, tal polipéptido tiene una secuencia de residuo de aminoácido de SEC ID NO:8, o un equivalente funcional de este. De acuerdo con tal modalidad, una región codificante que comprende la secuencia de ADN de la SEC DI NO:7 también es preferida.

4.5. Característica del polipéptido TIC851 aislado de EG4135.

La presente invención proporciona un polipéptido novedoso que define la totalidad o una porción de una proteína de cristal de Ti851 de *Bacillus turingiensis*.

En una modalidad preferida la invención describe y reivindica una proteína aislada y purificada de TiC851. La proteína de TiC851 aislada de EG4135 comprende una secuencia de aminoácido 632, y tiene una masa molecular calculada de aproximadamente 69,527 Da. El tIC851 tiene una constante isoeléctrica calculada (pI) igual a 5,80.

La composición de aminoácido de la proteína de tIC851 está dada en la tabla 2.

Tabla 2
Composición de aminoácidos de tIC851

Aminoácido	# residuos	% total	Aminoácido	# residuos	% total
Ala	45	7,1	Leu	29	4,6
Arg	13	2,1	Lys	51	8,1
Asn	40	6,3	Met	5	0,8
Asp	49	7,8	Phe	22	3,5
Cys	1	0,2	Pro	34	5,4
Gln	13	2,1	Ser	34	5,4
Glu	41	6,5	Thr	57	9,0
Gly	47	7,4	Tro	8	1,3
His	12	1,9	Tyr	25	3,9
Ile	62	9,8	Val	44	6,9
Acido	(Asp + Glu)			90	14
Base	(Arg + Lys)			64	10
Aromático	(Phe + Trp + Tyr)			55	9
hidrófobo	(aromático + Ile + Leu + Met + Val)			195	31

4.6. Nomenclatura de las Proteínas Novedosas

Los inventores han asignado arbitrariamente la designación tIC851 a la proteína novedosa de la invención. De manera similar, la designación arbitraria del tIC851 se ha asignado a la secuencia de ácido nucleico novedosa que codifica este polipéptido. La

asignación formal del gen y las designaciones de proteína con base en la nomenclatura revisada de las endotoxinas de proteína de cristal se asignará por un comité sobre la nomenclatura de *Bacillus turingiencis* formada al clasificar sistemáticamente las proteínas de cristal de *Bacillus turingiencis*. Los inventores contemplan que la designaciones arbitrariamente asignadas de la presente invención serán sustituidas por la nomenclatura asignada a estas secuencias, y aquella basada en la falta de identidad o similaridad sustancial a otras proteínas insecticidas conocidas aisladas de *Bacillus turingiencis*, la proteína tIC851 estará sola en una categoría separada de la clase de proteínas.

4.7. Células Huésped transformadas y Plantas Transgénicas

Los métodos y composiciones para transformar una bacteria, una célula de levadura, una célula vegetal, o una planta completa con uno o más vectores de expresión que comprenden una secuencia de gen que codifica una proteína de cristal son aspectos adicionales de esta descripción. Una bacteria transgénica, una célula de levadura, una célula vegetal o una planta derivada de tal

proceso de transformación o la progenie y semillas de tales plantas transgénicas también son modalidades adicionales de la invención.

Los medios para transformar las bacterias y las células de levadura son bien conocidos en la técnica. Típicamente, los medios de transformación son similares a aquellos medios bien conocidos para transformar otras bacterias o levaduras tales como *E. Coli* o *Sacaromyces cerevisiae*. Los métodos para la transformación de ADN de células vegetales incluyen transformación de plantas mediadas por *Agrobacterium*, transformación de protoplasto, transferencia de genes en el polen, inyección en órganos reproductivos, inyección en embriones maduros y bombardeo de partículas. Cada uno de estos métodos tiene ventajas diferentes y desventajas. De esta manera, un método particular para introducir genes en una cepa vegetal particular puede no necesariamente ser más efectivo para otra cepa vegetal pero es bien conociendo cuales métodos son útiles para una cepa vegetal particular. Los métodos adecuados para introducir ADN de transformación en una célula consisten de, pero no están limitados a, infección por *Agrobacterium*, suministro directo de ADN tal como por ejemplo, mediante

transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh et al., 1993), mediante toma de ADN mediada por disecación/inhibición, mediante electroporación, mediante agitación con fibras de carburo de silicio, mediante aceleración de partículas recubiertas con ADN, etc. En ciertas modalidades, los métodos de aceleración son los preferidos e incluyen, por ejemplo, bombardeo de microproyectiles y similares. Cuatro métodos generales para el suministro de un gen en células se han descrito (1) métodos químicos (Graham and van der Eb, 1973; Zatloukal et al., 1992); (2) métodos físicos tales como microinyección (Capecchi, 1980), electroporación (Wong y Neumann, 1982; Fromm et al., 1985; patente estadounidense No. 5,384,253) y pistola de genes (Jhonson y Tang, 1994; Fynan et al., 1993); (3) vectores virales (Clapp, 1993; Lu et al., 1993; Eglitis y Anderson, 1988; Eglitis et al., 1988); y (4) mecanismos mediados por receptores (Curiel et al., 1991; 1992; Wagner et al., 1992).

4.7.1. Bombardeo de Microproyectiles

Un método particularmente ventajoso para el suministro de secuencia de ADN transformantes en células vegetales es el bombardeo de microproyectiles. En este

método, las partículas pueden ser recubiertas con ácidos nucleicos y suministradas en células mediante una fuerza propelente. Las partículas de ejemplo incluyen aquellas comprendidas de tungsteno, platino y similares.

4.7.2. Transferencia Mediada por *Agrobacterium*

La transferencia mediada por *Agrobacterium* es un sistema ampliamente aplicable para la introducción de genes en células vegetales en razón a que el ADN se puede introducir en tejidos vegetales completos, puenteando de esta manera la necesidad de regeneración de una planta intacta de un protoplasto. El uso de vectores que integran plantas mediadas por *agrobacterium* para introducir ADN en células vegetales es bien conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, los métodos descritos (Fraley et al., 1985; Rogers et al., 1987). Además, la integración del Ti-ADN es un proceso relativamente preciso que da como resultado pocos reajustes. La región de ADN a ser transformada se define por las secuencias del borde, y el ADN que interviene es usualmente insertado en el genoma de la planta como se describió (Spielman et al., 1986; Jorgensen et al., 1987).

Los vectores de transformación de *Agrobacterium* modernos son capaces de replicación en *E. Coli* así como también *Agrobacterium*, permitiendo manipulaciones convenientes como se describió (Klee et al, 1985). Más aún, recientes avances tecnológicos en vectores para transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* han mejorado la disposición de los genes y los sitios de restricción en los vectores para facilitar la construcción de vectores capaces de expresar varios genes que codifican polipéptidos. Los vectores descritos (Rogers et al., 1987), tienen regiones multiligadoras convenientes flanqueadas por un promotor y un sitio de poliadenilación para la expresión directa de los genes que codifican el polipéptido insertado y son adecuadas para los propósitos presentes. Además, el *Agrobacterium* que contiene tanto los genes Ti armados como desarmados se pueden utilizar para las transformaciones. En aquellas cepas de plantas donde la transformación mediada por *Agrobacterium* es eficiente, es el método de escogencia en razón a la naturaleza fácil y definida de la transferencia del gen.

Se debe entender que dos diferentes plantas transgénicas también pueden ser aparejadas para producir

descendencia que contenga dos genes hexógenos agregados independientemente segregados. Iguales de progenies apropiadas pueden producir plantas que son homocigotas para ambos genes hexógenos agregados que codifican un polipéptido de interés. El cruzamiento exterior con una planta no transgénica también se contempla.

4.7.3. Expresión del Gen en las Plantas

Para solucionar las limitaciones en expresión de genes extraños en plantas, secuencias y señales particulares en ARN que tienen el potencial para tener un efecto específico sobre la estabilidad del ARN han sido identificadas. En ciertas modalidades de la invención, por lo tanto, existe deseo de utilizar la expresión de los segmentos de ácido nucleico descritos in planta. Un método particular de hacerlo así, es mediante la alteración del gen bacterial para remover secuencias o motivos que disminuyen la expresión en una célula vegetal transformada. El proceso de trabajar por ingeniería una secuencia codificante para la expresión óptima in planta es a menudo denominada como "plantar" una secuencia de ADN.

Las secuencias particularmente problemáticas son aquellas que son ricas en A+T. Desafortunadamente, en razón a que el *Bacillus turingiensis* tiene un genoma rico en A + T, las secuencias de gen de proteína de cristal deben a menudo ser modificadas para la expresión óptima en una planta. El motivo de secuencia ATTTA (o AUUUA como aparece en el ARN) se ha implicado como una secuencia desestabilizante en el mRNA de célula de mamífero (Shaw y Kamen, 1986). Muchos mRNA de vida corta tienen regiones no traducidas 3' ricas en A + T, y estas regiones a menudo tienen la secuencia ATTTA, algunas veces presente en múltiples copias o como multímeros (por ejemplo ATTTATTTA...). Shaw y Kamen mostraron que la transferencia del extremo 3' de un mRNA inestable a un ARN estable (globina o VA1) disminuye la vida media del ARN estable dramáticamente. Ellos además mostraron que un pentámero de ATTTA tiene un efecto de desestabilización profundo sobre el mensaje estable, y que esta señal podría ejercer su efecto si estuviera localizada en el extremo 3' o dentro de la secuencia codificante. Sin embargo, el número de secuencias ATTTA y/o el contexto de la secuencia en la cual ella ocurre también parece ser importante para determinar si ellas funcionan como secuencias desestabilizantes. Shaw y Kamen mostraron que

un trímero de ATTTA tiene mucho menos efecto que un pentámero sobre la estabilidad del mRNA y el dímero o un monómero no tiene efectos sobre la estabilidad (Shaw y Kamen 1987). Note que los multímeros de ATTTA tales como un pentámero automáticamente crean una región rica en A + T. Esto fue mostrado por ser un efecto citoplásmico, no nuclear. En otros mRNA inestables, la secuencia ATTTA puede estar presente en solo una copia sencilla, esta está a menudo contenida en una región rica en A + T. De los datos de las células animales recolectadas hasta la fecha, parece que el ATTTA, al menos, en algunos contextos es importante en la estabilidad, pero no es posible predecir que ocurrencias de ATTTA son elementos desestabilizantes o si cualquiera de estos efectos puede ser vistos en las plantas. La tabla 3 lista algunas de las secuencias ricas comunes AT identificadas como problemáticas cuando están presentes en una secuencia de codificación para la cual se desean altos niveles de expresión.

Una cuerda de poliadenilato al extremo 3' es común en la mayoría de los mRNA eucarióticos, tanto vegetales como animales. El punto de vista habitualmente aceptado de poliA adición es que el transcripto naciente se

extiende más allá del terminal 3' maduro. Contenido dentro de este transcrito están las señales para la poliadenilación y la formación del extremo 3' adecuado. Este procesamiento en el extremo 3' involucra la división del mRNA y la adición de poliA al extremo 3' maduro. Al investigar las secuencias de consenso cercanas al sistema poliA tanto en ARN animal o vegetal, ha sido posible identificar secuencia de consenso que aparentemente están involucradas en poliA adición y en división del extremo 3'. Las mismas secuencias de consenso parecen ser importantes para ambos procesos. Estas señales son típicamente una variación sobre la secuencia AATAAA. En células animales, algunas variantes de esta secuencia que son funcionales se han identificado, en células vegetales parece ser un rango extendido de secuencias funcionales (Wickens y Stephenson, 1984 Dean et al., 1986) en razón a que todas estas secuencias de consenso son variaciones de AATAAA, ellas todas son secuencias ricas A + T.

Tabla 3

Sitios de poliadenilación en genes de plantas

PA	AATAAA	Sitio de consenso mayor
P1A	AATAAT	Sitio de vegetal mayor
P2A	AACCAA	Sitio de vegetal menor
P3A	ATATAA	"
P4A	AATCAA	"
P5A	ATACTA	"
P6A	ATAAAA	"
P7A	ATGAAA	"
P8A	AAGCAT	"
P9A	ATTAAT	"
P10A	ATACAT	"
P11A	AAAATA	"
P12A	ATTAAA	"
P13A	AATTAA	"
P14A	AATACA	"
P15A	CATAAA	"

La presente invención proporciona un método para preparar genes de plantas sintéticas cuyos genes expresan su producto de proteína y niveles significativamente mayores que los genes tipo silvestre que son comúnmente empleados en transformación de plantas hasta el presente. En otro aspecto, la presente invención también proporciona genes de plantas sintéticos novedosos que codifican proteínas no vegetales.

Como se describió anteriormente, la expresión de los genes de *Bacillus turingiensis* en plantas es a menudo

problemática. La naturaleza de las secuencias de codificación de los genes de *Bacillus turingiensis* las distingue de los genes de plantas así como también de muchos otros genes heterólogos expresados en plantas. En particular, los genes de *Bacillus turingiensis* son muy ricos ~62% en adenina (A) y timina (T) mientras que los genes de plantas y la mayoría de los otros genes de bacterias que han sido expresados en las plantas son del orden de 45-55% de A + T.

Debido a la degeneración del código genético y al número limitado de escogencias de codones para cualquier aminoácido la mayor parte del "exceso" de las secuencias de codificación estructural de algunas especies de bacilos se encuentran en la tercera posición de los codones. Esto es, los genes de algunas especies de bacilos tienen A o T como tercer nucleótido de muchos codones. De esta manera el contenido de A + T en parte puede determinar la presión del uso del codón. Además, es claro que los genes evolucionaron para una función máxima del organismo en los cuales ellos evolucionaron. Esto significa que la secuencia de nucleótidos particulares encontradas en un gen de un organismo, donde ellos pueden no jugar un papel con excepción de codificar un tramo

particular de aminoácidos, tiene el potencial reconocido como elementos de control del gen en otro organismo (tal como los promotores o terminadores transcripcionales, los sitios de poliA adición, sitios de unión intron, o señales de degradación de mRNA específico). Es quizás sorprendente que tales señales mal leídas no son una característica más común de la expresión del heterólogo, pero esto puede ser explicado en parte por el contenido relativamente homogéneo de A + T (~50%) de muchos organismos. Este contenido A + T más la naturaleza del código genético pone claros constreñimientos a la probabilidad de ocurrencia de cualquier secuencia de oligonucleótido particular. De esta manera, un gen de E. Coli con un 50% de contenido de A + T es mucho menos probable que contenga cualquier segmento particular rico en A + T que un gen de Bacillus turingiensis.

Típicamente, para obtener un alto nivel de expresión de genes de δ -endotoxina en plantas, existen secuencias de coedificación estructural ("gen estructural") que codifican la δ -endotoxina son modificadas mediante la remoción de secuencias ATTTA y señales de poliadenilación putativa mediante mutagénesis dirigida al sitio del ADN

que comprende el gen estructural. Es más preferido que sustancialmente todas las señales de poliadenilación y las secuencias ATTTA sean removidas aunque se observen niveles de expresión mejoradas con solo la remoción parcial de cualquiera de las anteriores secuencias identificadas. Alternativamente si un gen sintético se prepara el cual codifica la expresión de la proteína objeto los codones son seleccionados para evitar la secuencia ATTTA y las señales de poliadenilación putativa. Para los propósitos de la presente invención las señales de poliadenilación putativa incluyen, pero no están necesariamente limitadas a, AATAAA, AATAAT, AACCAA, ATATAA, AATCAA, ATACTA, ATAAAA, ATGAAA, AAGCAT, ATTAAT, ATACAT, AAAATA, ATTAAA, AATTAA, AATACA y CATAAA. Al reemplazar la secuencia ATTTA y señales de poliadenilación, los codones son preferiblemente utilizados cuando evitan los codones que son raramente encontrados en genomas de plantas.

La secuencia de ADN seleccionado es explorada para identificar regiones con más de 4 nucleótidos de adenina (A) o timina (T). Las regiones A + T son exploradas para ubicar señales de poliadenilación vegetal potencial. Aunque la ausencia de 5 o más nucleótidos consecutivos A

o T elimina la mayoría de señales de poliadenilación de las plantas, si existe más de una de las señales de poliadenilación menor identificada dentro de 10 nucleótidos de una a la otra, entonces la secuencia de nucleótidos de esta región se altera preferiblemente al remover estas señales mientras que mantiene las secuencias de aminoácidos original codificada.

La segunda etapa es considerar los aproximadamente 15 a aproximadamente 30 o algo así residuo de nucleótidos que circundan la región rica en A + T identificada en la etapa 1. Si el contenido de A + T en la región circundante es menos del 80%, la región se debe examinar para señales de poliadenilación. La alteración de la región con base en las señales de poliadenilación depende de (1) el número de señales de poliadenilación presentes y (2) la presencia de señales de poliadenilación mayor en plantas.

La región extendida se examina para ubicar la presencia de señales de poliadenilación en plants. Las señales de poliadenilación se remueven mediante mutagénesis dirigida al sitio de la secuencia de ADN. La región extendida también se examina con el fin de ubicar

múltiples copias de secuencias de ATTTA que también son removidas mediante mutagénesis.

También se prefiere que las regiones que comprendan muchas bases consecutivas A + T o bases G + C sean desorganizadas en razón a que estas regiones se predice que tienen una mayor probabilidad de formar estructuras curva de horquilla debido a su autocomplementariedad. Por lo tanto, la inserción de pares de base heterogéneos reducirían la probabilidad de formación de estructuras secundarias autocomplementarias que son conocidas por inhibir la transcripción y/o traducción en algunos organismos. En la mayoría de los casos, los efectos adversos se pueden minimizar al utilizar secuencias que no contienen cinco AA + T o G + C consecutivos.

4.7.4. Oligonucleótidos Sintéticos para Mutagénesis

Cuando los oligonucleótidos son utilizados en mutagénesis, es deseable mantener la secuencia de aminoácidos adecuada para leer el marco, sin introducir sitios de restricción común tales como Bg/II HindIII, SacI,, KpnI, EcoRI, NcoI, PstI y SalI dentro del gen modificado. Estos sitios de restricción son encontrados

en sitios de inserción poli-ligadores de muchos vectores de clonación. Por supuesto, a la introducción de nuevas señales de poliadenilación, secuencias ATTTA o fragmentos consecutivos de más de cinco A + T o G + C se debe evitar. El tamaño preferido de los oligonucleótidos es de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 bases, pero fragmentos que varían desde aproximadamente 18 a aproximadamente 100 bases ha sido utilizados. En la mayoría de los casos, un mínimo de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 pares de bases de homología al ADN molde o ambos extremos de fragmento sintetizado se mantienen para asegura la hibridización adecuada del iniciador al molde. Los oligonucleótidos deben evitar secuencias mayores de cinco pares de bases, A + T o G + C. Los codones utilizados en el reemplazo de codones tipo silvestre deben preferiblemente evitar el doblete TA o CG cuando sea posible. Los codones son seleccionados de una tabla de codones preferidos de plantas (tal como la tabla 4 siguiente) con el fin de evitar los codones que son encontrados solamente en genomas de plantas y se deben hacer esfuerzos para seleccionar codones para ajustar preferiblemente el contenido de G + C a aproximadamente el 50%.

Tabla 4

Uso de algodón preferido en plantas

Aminoácido	Codón	% uso en plantas
ARG	CGA	7
	CGC	11
	CGG	5
	CGU	25
	AGA	29
	AGG	23
LEU	CUA	8
	CUC	20
	CUG	10
	CUU	28
	UUA	5
	UUG	30
SER	UCA	14
	UCC	26
	UCG	3
	UCU	21
	AGC	21
	AGU	15
THR	ACA	21
	ACC	41
	ACG	7
	ACU	31
PRO	CCA	45
	CCC	19
	CCG	9
	CCU	26
ALA	GCA	23
	GCC	32
	GCG	3
	GCU	41
GLY	GGA	32
	GGC	20
	GGG	11
	GGU	37
ILE	AUA	12
	AUC	45
	AUU	43
VAL	GUA	9
	GUC	20
	GUG	28
	GUU	43

LYS	AAA	36
	AAG	64
ASN	AAC	72
	AAU	68
GLN	CAA	64
	CAG	36
HIS	CAC	65
	CAU	35
GLU	GAA	48
	GAG	52
ASP	GAC	48
	GAU	52
TYR	UAC	68
	UAU	32
CYS	UGC	78
	UGU	22
PHE	UUC	56
	UUU	44
MET	AUG	100
TRP	UGG	100

Las regiones con muchas bases A + T consecutivas o bases G + C se predice que tienen una mayor probabilidad de formar unas estructuras con curva de horquilla debido a la autocomplementariedad. La disrupción de estas regiones mediante la inserción de pares de base heterogéneos es preferida y debe reducir la probabilidad de la formación de estructuras secundarias autocomplementarias tal como las curvas de horquilla que son conocidas en algunos organismos por inhibir la transcripción (terminadores transcripcionales) y traducción (atenuadores).

Alternativamente, un gen completamente sintético para una secuencia de aminoácido dada puede ser preparada, evitándose las regiones de 5 o más nucleótidos consecutivos A + T o G + C. Los codones son seleccionados evitando los dobletes TA y CG en los codones cuando sea posible. El uso de codones se puede normalizar contra una tabla de uso de codón preferida (tal como la tabla 4) y el contenido G + C preferiblemente ajustado a aproximadamente 50%. La secuencia resultante debe ser examinada para asegurar que existen señales de poliadenilación vegetal putativa mínima y secuencias ATTTA. Los sitios de restricción adecuados encontrados en vectores de clonación comúnmente utilizados son también preferiblemente evitados. Sin embargo, la ubicación de varios sitios de restricción únicos a lo largo del gen es útil para el análisis de la expresión del gen o la construcción de variantes del gen.

4.8. Métodos de Producción de Plantas Transgénicas Resistentes a Insectos

Al transformar una célula hospedera adecuada, tal como una célula vegetal, con una secuencia de gen tIC851

recombinante, la expresión de la proteína de cristal codificada (es decir una proteína de cristal bacteriana o un polipéptido que tiene actividad insecticida contra coleópteros) puede dar como resultado la formación de unas plantas resistentes a insectos.

Una planta transgénica de esta invención tiene así una cantidad incrementada de una región codificante (por ejemplo un gen) que codifica un polipéptido de acuerdo con la SEC ID NO:8. Una planta transgénica preferida es un segregante independiente y puede transmitir aquel gen y su actividad a su progenie. Una planta transgénica más preferida es homocigota para ese gen, y transmite ese gen a toda su descendencia luego de su apareo sexual. Las semillas de una planta transgénica pueden crecer en el campo o en invernadero, y dan como resultado plantas transgénicas sexualmente maduras que son autopolinizadas para generar plantas de crianza reales. La progenie proveniente de estas plantas hace reales líneas de crianza que son evaluadas para, por vía de ejemplo, incrementar la capacidad insecticida contra insectos coleópteros, preferiblemente en el campo, bajo un rango de condiciones ambientales.

Las plantas transgénicas que comprenden uno o más transgenes que codifican un polipéptido de acuerdo con la SEC ID NO:8 exhibirá preferiblemente un fenotipo de resistencia insecto mejorada a los insectos coleópteros objetivo según se describe aquí. Estas plantas proporcionarán preferiblemente semillas transgénicas que serán utilizadas para crear linajes de plantas transgénicas es decir progenies de generaciones avanzadas de la planta transgénica original que se pueden utilizar para producir semilla, o utilizadas como alimentos para animales o humanos, para producir fibras, aceites, frutas, granos, u otros productos vegetales comercialmente importantes o componentes derivados de plantas. En tales casos, la progenie y las semillas obtenidas de cualquier generación de las plantas transformadas contendrá el transgén seleccionado y establemente integrado que codifica la δ -endotoxina de la presente invención. Las plantas transgénicas de la presente invención se pueden cruzar para producir líneas híbridas o puras con una o más plantas que tengan propiedades deseables. En ciertas circunstancias, también puede ser deseable crear plantas transgénicas, semillas, y progenies que contengan uno o más transgenes

adicionales incorporados dentro de su genoma además del transgen que codifica el polipéptido de la invención. Por ejemplo, las plantas transgénicas pueden contener un segundo gen que codifica él mismo, o un polipéptido diferente resistente a insectos, o alternativamente, las plantas pueden comprender uno o más transgenes adicionales tales como aquellos que le confieren resistencia a herbicida, resistencia fungosa, resistencia bacteriana, tensión, sal o tolerancia a la sequía, tallo mejorado o alojamiento de raíz, almidón incrementado, grano, aceite, carbohidrato, aminoácido, reducción de proteína y similar.

4.9 Aislamiento de Gen Homólogo y Fragmentos de Gen

Los genes y δ -endotoxinas de acuerdo con la invención incluyen no solo las secuencias de longitud completa descritas aquí sino también fragmentos de estas secuencias, o proteínas de fusión, que retienen la actividad insecticida característica de las secuencias específicamente ejemplificadas aquí.

Debe ser evidente para aquellas personas expertas en la técnica que δ -endotoxinas insecticidas se puedan identificar y obtener a través de varios medios. Los genes específicos o porciones de estos se pueden obtener de un cultivo depositario, o construido sintéticamente, por ejemplo, al utilizar una máquina de gen. Las variaciones de estos genes pueden ser fácilmente construidas utilizando técnicas estándar para la elaboración de mutaciones de punto. También, los fragmentos de estos genes se pueden hacer utilizando exonucleasas comercialmente disponibles o endonucleasas de acuerdo con procedimientos estándar. También, los genes que codifican fragmentos activos que pueden obtener utilizando una variedad de otras enzimas de restricción. Las proteasas se pueden utilizar para obtener directamente fragmentos activos de estas δ -endotoxinas.

Las δ -endotoxinas equivalentes y/o los genes que codifican estas δ -endotoxinas equivalentes también se pueden aislar de cepas de bacilos y/o librerías de ADN que utilizan la enseñanza suministrada aquí. Por ejemplo, los anticuerpos de las δ -endotoxinas descritas y reivindicadas aquí se pueden utilizar para identificar y

aislar otras δ -endotoxinas provenientes de una mezcla de proteínas. Específicamente, los anticuerpos pueden ser elevados a las porciones de las δ -endotoxinas que son más constantes y más distintas de las otras δ -endotoxinas de *Bacillus turingiensis*. Estos anticuerpos se pueden utilizar para identificar específicamente δ -endotoxinas equivalentes con las características de actividad insecticida mediante inmunoprecipitación, inmunoensayo ligado a enzima, (ELISA), o borrado del oeste.

Un método adicional para identificar δ -endotoxinas y genes de la invención es a través del uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias de oligonucleótidos que tienen una etiqueta detectable. Como es bien conocido de la técnica, si la molécula sonda y la muestra de ácido nucleico se hibridizan al formar una enlace fuerte entre las dos moléculas, se puede razonablemente asumir que la sonda y la muestra son esencialmente idénticas. La etiqueta detectable de la sonda proporciona unos medios para determinar de una manera conocida si ha ocurrido la hibridización. Tal análisis de sonda proporciona un método rápido para

identificar genes de δ -endotoxina formicida de la invención.

La formación Duplex y la estabilidad dependen de la complementariedad sustancial entre dos hebras de un híbrido, y, como notó anteriormente, un cierto grado de no coincidencia se puede tolerar. Por lo tanto, las sondas de la invención incluyen mutaciones (tanto simples como múltiples), supresiones, inserciones o secuencias descritas, y combinaciones de estas, en donde dichas mutaciones, inserciones o supresiones permiten la formación de híbridos estables con el polinucleótido objeto de interés. Las mutaciones, inserciones, y supresiones se pueden producir en una secuencia de polinucleótidos dada de muchas maneras, mediante métodos habitualmente conocidos por un experto en la técnica o quizás mediante otros métodos que se hagan conocidos en el futuro.

Las variaciones potenciales en las sondas enlistadas se debe, en parte, a la redundancia del código genético. En razón de la redundancia del código genético, es decir, más de una triplete de nucleótidos codificantes (codón)

se puede utilizar en la mayoría de los aminoácidos usados para hacer proteínas. Por lo tanto diferentes secuencias de nucleótidos puede codificar un aminoácido particular. De esta manera, las secuencias de aminoácido de δ -endotoxinas y péptidos de *Bacillus turingiensis* se pueden prepara mediante secuencias de nucleótidos equivalentes que codifican la misma secuencia de aminoácidos de la proteína o el péptido. De acuerdo con esto, la invención incluye tales secuencias de nucleótidos equivalentes. También, las secuencias inversas o complementarias son un aspecto de la invención y pueden ser fácilmente utilizadas por una persona experta en la técnica. Además se ha mostrado que las proteínas de estructura identificadas y la función se puede construir al cambiar la secuencia de aminoácidos si tales cambios no alteran la estructura secundaria de la proteína (Kaiser y Kezdy, 1984). De esta manera, la invención incluye mutantes de secuencias de aminoácidos descritas aquí que no alteran la estructura secundaria de la proteína, o si la estructura se altera, la actividad biológica es sustancialmente retenida. Además, la invención también incluye mutantes de organismos que hospedan todo o parte de δ -endotoxinas que codifican un gen de la invención.

Tales mutantes pueden ser hechos mediante técnicas bien conocidas por las personas expertas en el arte. Por ejemplo, la relación UV para preparar mutantes de organismos huésped. De manera similar, tales mutantes pueden incluir célula huésped asporogéneas que también se pueden preparar mediante los procedimientos bien conocidos en la técnica.

4.10. Células Huésped Recombinantes

Las secuencias de nucleótidos de la invención se pueden introducir en una amplia variedad de huéspedes microbianos y eucarióticos. Como huéspedes para expresión recombinante de polipéptidos tIC851, de particular interés serán los procariotes y los eucariotes inferiores tales como los hongos, procariotes de ilustración, tanto como gram negativos como gram positivos, incluyen Enterobacteriaceae, tales como Escherichia, Erwinia, Shigella, Salmonella, y Proteus; Bacillaceae; Rhizobiaceae, tal como Rhizobium, Spirillaceae, tal como fotobacterium, Zymomonas, Seratia, Aeromonas, Vibrio, Desulfovibrio, Spirillum,; Lactobacillaceae; Pseudomonadaceae, tales como Pseudomonas y Acetobacter; Azotobacteraceae, Actinomycetales, y Nitrobacteraceae.

Entre los eucariotes están los hongos, tales como el Ficomicetes y Ascomicetes, que incluyen levadura, tal como el Sacaromices y el Schizosaccharomyces; y levaduras de Basidiomycetes, tales como Rhodotorula, Aureobasidium, Sporobolomyces, y similares.

Características de interés particular para seleccionar células huésped con propósitos de producción incluyen la fácil introducción de construcciones genéticas de la presente invención dentro de las células huésped, disponibilidad de los sistemas de expresión, eficiencia de expresión, estabilidad el gen de interés en el huésped y presencia de capacidades genéticas auxiliares.

Un gran número de microorganismos conocidos por habitar el filoplano (la superficie de las hojas de plantas) y/o la rhizosfera (el suelo que circunda las raíces de las plantas) de una amplia variedad de cultivos importantes pueden ser células hospederas deseables para manipulación, preparación, almacenamiento, suministro y/o mutagénesis de las construcciones genéticas descritas. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas, y hongos. De particular interés son los microorganismos

tales como las bacterias, por ejemplo género bacilus (que incluyen las especies y subespecies *Bacillus turingiencis* Kurstaki HD-1, *Bacillus turingiencis* Kurstaki HD-73, *Bacillus turingiencis* sotto, *Bacillus turingiencis* berliner, *Bacillus turingiencis* turingiencis, *Bacillus turingiencis* tolworhi, *Bacillus turingiencis* dendrolimus, *Bacillus turingiencis* alesti, *Bacillus turingiencis* galeries, *Bacillus turingiencis* aizawai, *Bacillus turingiencis* subtoxicus, *Bacillus turingiencis* entomocidus, *Bacillus turingiencis* tenebrionis y *Bacillus turingiencis* san Diego); *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Znathomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodoseudomonas*, *Methilophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, y *Alcaligenes*; hongos; particularmente levadura por ejemplo, géneros *Saccharomices*, *Cryptococcus*, *Kluiveromices*, *Sporobolomices*, *Rhodotorula*, y *Aerubasidium*. De particular interés son las especies bacteriales de la fitoesfera como las *Pseudomonas* *siringae*, *Pseudomonas* *fluorescens*, *Serratia* *marcescens*, *Acetobacter* *xilinum*, ag.t, *Rhodobacter* *sphaeroides*, *Xantomonas* *campestris*, *Rhizobium* *meliloti*, *Alcaligenes* *eutrofus*, y *Azotobacter* *vinladii*; y las especies de levadura de fitosfera tales como la *Rhodotorula* *rubra*, R.

Glutinis, R. Marina, R. Aurantiaca, Cryptococcus albidus, C. Diffluens, C. Laurentii, Saccharonices rosei, S. Pretoriensis, S. Cerevise, Sporobolomices roseus, S. Odorus, Kluyveromices veronae, y Aureobasidium pollulans.

Las características de particular interés para seleccionar las células huésped con propósitos de producción incluyen la fácil introducción de una construcción genética seleccionada en el huésped, disponibilidad de los sistemas de expresión, eficiencia de la expresión, estabilidad del polinucleótido en el huésped, y la presencia de capacidades genéticas auxiliares. Otras consideraciones incluyen facilidad de formulación y manejo, economías, estabilidad de almacenamiento, y similares.

4.11. Secuencias de Polinucleótidos

La composición de ADN que codifica los polipéptidos con actividad insecticida de la presente invención son particularmente preferidos para el suministro a las células vegetales receptoras, y finalmente en la producción de plantas transgénicas resistentes a insectos. Por ejemplo, los sedimentos de ADN en la forma

de vectores y plásmidos, o los fragmentos de ADN lineal, en algunos casos que contienen un solo elemento de ADN para ser expresado en células vegetales, y similares, se pueden emplear.

4.12. Métodos Para Preparar Secuencias De Polinucleotidos Mutagenizados

En ciertas circunstancias, puede ser deseable modificar o alterar uno o más nucleotidos en una o más secuencias de polinucleotidos descritas aquí con el propósito de alterar o cambiar la actividad insecticida o la especificidad insecticida del polipeptido. En general, los medios y métodos para mutagenizar unas secuencias de ADN son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las modificaciones a tales secuencias pueden ser hechas aleatoriamente, o mediante procedimientos de mutagénesis de sitio específico. Los polinucleotidos pueden ser modificados mediante la adición, supresión, o sustitución de uno o más nucleotidos de la secuencia que codifica el polipeptido insecticidamente activo.

La mutagénesis se puede desarrollar de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas en el arte tales

como, y no limitada a, sintetizar un oligonucleótido que tiene una o más mutaciones dentro de la secuencia de una región particular. En particular, la mutagénesis de sitio específico es una técnica útil en la preparación de mutantes, a través de mutagénesis específica en ADN subyacente. La técnica además proporciona la fácil capacidad de preparar variantes de secuencia de ensayo, por ejemplo, incorporando una o más de las consideraciones precedentes, al introducir uno o más cambios de la secuencia de nucleótidos en el ADN. La mutagénesis de sitio específico permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de oligonucleótido específico que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada así como también un número suficiente de nucleótidos adyacentes, para proporcionar una secuencia iniciadora de suficiente tamaño y complejidad de secuencia para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de supresión que está siendo escudriñada. Típicamente, un iniciador de aproximadamente 17 a aproximadamente 75 nucleótidos o más de longitud es el preferido con aproximadamente 10 a aproximadamente 25 o mas residuos en ambos lados de la unión de la secuencia que está siendo alterada.

En general, la técnica de mutagenesis de sitio específico es bien conocida en el arte como se ejemplifica en varias publicaciones. Como se apreciará, la técnica químicamente emplea un vector pago el cual existe tanto en forma de hilo simple como de hilo doble. Los vectores típicos útiles en la mutagenesis dirigida de sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles comercialmente y su uso es generalmente bien conocido por aquellos expertos en la técnica. Los plasmidos de doble hilo son también rutinariamente empleados en la mutagénesis dirigida de sitio que ilumina la etapa de transferir el gen de interés desde un plasmide a un fago.

La preparación de las variantes de secuencia de los segmentos de ADN que codifica la δ -endotoxina utilizando una mutagenesis dirigida de sitio se proporciona como unos medios de producción de especies potencialmente útiles y no pretenden estar limitadas en razón a que otras formas en las cuales las variantes de las secuencias de ADN se pueden obtener. Por ejemplo, vectores recombinantes que codifican la secuencia deseada puede ser tratados con agentes mutagénicos, tales como la hidroxilamina para obtener variantes de secuencias.

Como se utiliza aquí, el término "procedimiento de mutagenésis dirigido por oligonucleótido" se refiere a un proceso dependiente de molde y propagación mediada por vector que da como resultado un incremento en la concentración de una molécula de ácido nucleico específica a su concentración inicial, o en un incremento en la concentración de una señal detectable, tal como amplificación. Como se utiliza aquí, el término "procedimiento de mutagenésis dirigido por oligonucleótido" también pretende referirse a un proceso que involucra la extensión dependiente de molde de una molécula iniciadora. El proceso dependiente de molde se refiere a una síntesis de ácido nucleico de una molécula de ARN o de ADN en donde la secuencia de la recientemente sintetizada hebra de ácido nucleico es dictada por reglas bien conocidas de apareamiento complementario de base (Watson, 1987). Típicamente, las metodologías mediadas por vector involucran la introducción del fragmento de ácido nucleico en un vector de ADN o ARN, la amplificación clonal del vector, y la recuperación del fragmento de ácido nucleico amplificado. Ejemplos de tales metodologías se proporcionan mediante la patente estadounidense No. 4,237,224.

Un número de procesos dependientes de templado están disponibles para amplificar las secuencias objetivo de interés presente en una muestra. Uno de los métodos mejor conocidos de amplificación es la reacción en cadena de polimerasa (PCR™) que se describe en detalle en la Patente estadounidense No. 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159. Brevemente, en el PCR™, las dos primeras secuencias que se preparan son complementarias a regiones sobre hebras complementarias opuestas de la secuencias objetivo. Un exceso de deoxinucleosido trifosfato se agregan a la mezcla de reacción junto con una polimerasa de ADN (por ejemplo polimerasa de Taq). Si la secuencia objetivo esta presente en una muestra, los iniciadores se unirán al objetivo y la polimerasa originará que los iniciadores se extiendan junto con la secuencia objetivo al agregarse sobre los nucleótidos. Al subir y bajar la temperatura de la mezcla de reacción, los iniciadores extendidos se disociarán del objetivo para formar productos de reacción, el exceso de iniciadores se unirá al objetivo y a los productos de reacción y el proceso se repetirá. Preferiblemente un procedimiento de amplificación PCR™ de transcriptasa inversa puede ser desarrollado con el fin de cuantificar la cantidad de mRNA amplificado. Las

metodologías de reacción en cadena de polimerasa son bien conocidas en la técnica.

Otro método de amplificación es la reacción en cadena de ligasa (denominada como LCR), descrita en la solicitud de patente europea publicación No. 320,308. En LCR, dos pares de sondas complementarias se preparan, y en la presencia de secuencias objetivo, cada parte unirá a hebras complementarias opuestas del objetivo de tal manera que ellas sobresalgan. En la presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se unirán para formar una unidad sencilla. Mediante el ciclo de la temperatura, como en PCRTM, unidades ligadas unidas se disocian de los objetivos y luego sirven como "secuencias objetivo", para el ligado del exceso de pares sonda. La Patente estadounidense No. 4,883,750, incorporada aquí como referencia en su totalidad, describe un método alternativo de amplificación similar a LCR para unir los pares sonda a la secuencia objetivo.

Un Método de amplificación isotérmico, en el cual la restricción de las endonucleasas y las ligasas se utilizan para lograr la amplificación de las moléculas objetivo que contienen nucleótidos 5'-[α -tio]trifosfatos

en una hebra de un sitio de restricción (Walker et al., 1992, incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad), puede ser útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente invención.

4.13. Eventos Post Transcripcionales Que Afectan La Expresión De Transgenes En Plantas

En muchos casos, el nivel de transcripción de un transgen particular en una célula huésped dada no es siempre indicativo de la cantidad de proteína que esta siendo producido en la célula huésped transformada. Esto es a menudo debido a los procesos post transcripcionales, tales como empalmes, poliadenilación, iniciación de producción apropiada, y estabilidad del ARN, que afecta la capacidad de un transcripto para producir proteína. Tales factores también pueden afectar la estabilidad y la cantidad de mRNA producido de un transgen dado. Como tal, es a menudo deseable alterar los ejemplos post transduccionales a través de técnicas de biología molecular particulares. Los inventores contemplan que en ciertas instancias puede ser deseable alterar la transcripción y/o expresión de las construcciones de ácido nucleico que codifican los polipeptidos de la

presente invención para aumentar, disminuir, o de otra forma regular o controlar estas construcciones en células huéspedes particulares y/o plantas transgénicas.

4.13.1 Iniciación eficiente de la traducción de proteína

La secuencia líder 5' no traducida (5'-UTL) de mRNA eucariótico juega un papel principal en la eficiencia transduccional. Muchos transgenes y quiméricos tempranos que utilizan un promotor viral utilizando una longitud arbitraria de secuencia viral después de la transcripción del sitio de iniciación y la fusión de este al auge de la región codificante. Estudios más recientes han mostrado que la secuencia 5'-UTL y las secuencias directamente circundantes de AUG pueden tener gran efecto en la eficiencia transduccional en células huésped y particularmente ciertas especies de plantas y que este efecto puede ser diferente dependiendo de las células o tejidos particulares en los cuales el mensaje se exprese.

En la mayoría de los mRNA eucarióticos, el punto de iniciación transduccional ocurre en el codon auge más cercano a la tapa 5' del transcripto. La comparación de

secuencias de mRNA de plantas y experimentos de mutagénesis dirigidas de sitio han demostrado la existencia de secuencias de consenso que circundan el codon de iniciación en plantas, 5'-UAAACAAUGGCU-3' (SEQ ID (NO:4) (Joshi, 1987; Lutcke et al., 1987). Sin embargo, la secuencias de consenso serán evidentes entre especies de plantas individuales. Por ejemplo, una compilación de secuencias que circundan el codon de iniciación de 85 genes de maíz producen un consenso de 5'-(C/G)AUGGCG-3' (Luehrsen et al., 1994). En protoplastos de tabaco, los transgenes que codifican α -glucoronidasa (GUS) y quitinasa bacterial mostraron un incremento de 4 a 8 veces en la expresión, respectivamente, cuando las secuencias nativas de estos genes se cambió para codificar 5'-ACCAAUGG-3' (Gallie et al., 1987b; Jones et al., 1988). De manera interesante, el *B. thuringiensis* ha escogido para utilizar un codon de iniciación alternativo para el gen nativo que codifica tIC851. Los inventores encontraron, como se describe adelante, que este codon, aunque no generalmente conocido por codificar nada diferente a la leucina, se cree que codifica la metionina en la primer posición de la toxina de polipeptido tIC851 tal como se juzga mediante el análisis de secuencia de N-aminoácido terminal de la toxina purificada. Por lo

tanto, por eficiencia inplanta, se pretende que el codon de iniciación ATG más frecuentemente utilizado será utilizado en su lugar.

Cuando la producción de transgenes quiméricos es decir, (transgenes que comprenden segmentos de ADN de diferentes fuentes operablemente ligadas juntas), a menudo se utiliza virus de 5'-UTL de planta. La proteína de recubrimiento del virus del mosaico de la alfalfa (AMV) y la 5'-UTL de la proteína de recubrimiento del virus del mosaico de la broma (BMV) han mostrado que mejoran la traducción del mRNA 8 veces en protoplastos de tabaco electroporado (Gallie et al., 1987a; 1987b). Un derivado de 67 nucleótidos (Ω) de 5-UTL de ARN de virus de mosaico de tabaco (TMV) fusionado al gen (CAT) cloramfenicol acetiltransferasa y el gen GUS ha mostrado mejora en la traducción de genes reporteros in vitro (Gallie et al., 1987a; 1987b; Sleat et al., 1987; Sleat et al., 1988). La electroporación de los protoplastos del mesofilo de tabaco con transcriptos que contienen el líder TMV fusionado a genes reporteros CAT, GUS, y LUC produjeron un nivel de 33, 21, y 36 veces de mejora, respectivamente (Gallie et al., 1987a; 1987b; Gallie et al., 1991). También en tabaco, un 5'-UTL 83-nt X ARN de virus de papa

mostró mejorar la expresión de neomicina fosfotransferasa II (NptII) 4 veces (Poogin and Skryabin, 1992).

El efecto de un -5'UTL puede ser diferente dependiendo de la planta, particularmente entre dicotiledoneas y monocotiledoneas. El TMV 5'-UTL ha mostrado ser más efectivo en los protoplastos de tabaco (Gallie et al., 1989) que en protoplastos de maíz (Gallie and Young, 1994). También, el 5'-UTL del TMV- Ω (Gallie et al., 1988), cubierta de AMV (Gehrke et al., 1983; Jobling y Gehrke, 1987), cubierta de TMV (Goelet et al., 1982) y cubierta del BMV (French et al., 1986) trabajaron pobremente el maíz e inhibieron la expresión del gen luciferasa en el maíz con relación a su líder nativo (Koziel et al., 1996). Sin embargo, los 5'-UTL del transcripto (CaMV) 35S del virus del mosaico del coliflor y los genes glutelín del maíz (Boronat et al., 1986), el PEP-carboxilasa (Hudspeth and Grula, 1989) y la ribulosa bisfosfato carboxilasa mostraron un considerable incremento en la expresión del gen luciferasa en el maíz en relación a su líder nativo (Koziel et al., 1996).

Estos 5'-UTL tienen diferentes efectos en el tabaco. Como contraste al maíz, el TMV Ω 5'-UTL y el 5'-UTL de la

proteína de recubrimiento del AMV mejorado mejoraron la expresión en el tabaco, mientras que la glutelina, la PEP-carboxilasa del maíz y la 5'-UTL de la ribulosa -1,5-bisfosfato carboxilasa del maíz no mostraron mejora relativa con la 5'-UTL luciferasa nativa (Koziel et al., 1996). Solo la CaMV 35S 5'-UTL mejoró la expresión de luciferasa tanto en maíz como en tabaco (Koziel et al., 1996). Adicionalmente, el 5'-UTL de la proteína de recubrimiento del TMV y del BMV fueron inhibitorias tanto en protoplastos de maíz como de tabaco (Koziel ET AL., 1996).

4.13.2 Uso de Intrones para incrementar la expresión

Incluyendo uno o más intrones en la porción de transcripción de un gen se ha encontrado el incremento de expresión del gen heterólogo en una variedad de sistemas de planta (Callis et al. , 1987; Maas et al. , 1991; Mascarenhas et al., 1990; McElroy et al., 1990; Vasil et al., 1989), aunque no todos los intrones producen un efecto estimulatorio y el grado de varias estimulaciones. En efecto el mejoramiento de los intrones parece ser más evidente en monocotiledoneas que en dicotiledoneas.

Tanaka et al., (1990) ha mostrado que el uso del intron 1 catalasa aislado de abas castor incrementa incrementan la expresión del gen en arroz. De manera similar, el primer intron del alcohol dehidrogenasa 1 (*Adh1*) ha mostrado el incremento de expresión de un clon genómico de *Adh1* que comprende el promotor endogeno en células de maíz transformado (Callis et al., 1987; Dennis et al., 1984). Otros intrones que son también capaces de incrementar la expresión de transgenes que los contienen incluyendo los intrones 2 y 6 de *Adh1* (Luehrsen y Walbot, 1991), el intrón catalasa (Tanaka et al., 1990), el intrón 1 del gen de maíz bronce 1 (Callis et al., 1987), el intrón 1 de sintasa de sucrosa de maíz (Vasil et al., 1989), intrón 3 del gen actin del arroz (Luehrsen y Walbot, 1991), el intrón 1 actin del arroz (McElroy et al., 1990), y el exón ubiquitin del maíz 1 (Christensen et al., 1992).

Generalmente, para lograr la expresión óptima, el intrón o intrones seleccionados deben estar presentes en la unidad transcripcional 5' en la orientación correcta con respecto a las secuencias de la unión de división (Callis et al., 1987; Maas et al., 1991; Mascarenhas et al., 1990; Oard et al., 1989; tanaka et

al., 1990; Vasil et al., 1989). El intrón de Adh1 ha sido mostrado para incrementar la expresión de un gen heterólogo cuando está colocado en 3' (o aguas debajo de) el gen de interés. (Collis et al., 1987).

4.13.3. Uso de Genes Sintéticos para Incrementar la Expresión de Genes Heterólogos en las Plantas

Cuando se introduce un gen procariótico en un huésped eucariótico o cuando se expresa un gen eucariótico en un huésped no nativo, la secuencia del gen debe frecuentemente ser alterado o modificado para permitir la translación eficiente del transcripto derivado de la forma de gen. La experiencia significativa en usar genes sintéticos para incrementar la expresión de una proteína deseada ha sido lograda en la expresión del *Bacillus turingiensis* en las plantas. Los genes nativos *Bacillus turingiensis* están frecuentemente expresados solamente en bajos niveles de dicotes y algunas veces no en todas en muchas especies de monocotes (Kozile et al., 1996). El uso de codón en los genes nativos es considerablemente diferente de aquel encontrado en genes de plantas típicos, el cual tiene una contenido G + C mayor. Las estrategias para incrementar la expresión de

estos genes en plantas generalmente altera el contenido general G + C de los genes. Por ejemplo, los genes que codifican la proteína cristal Bacillus turingiensis han resultado en mejoras significativas de la expresión de estas endotoxinas en varios cultivos incluyendo algodón (Perlak et al., 1990; Wilson et al., 1992), tomate (perlak et al., 1991), papas (Perlak et al., 1993), arroz (Cheng et al., 1998), y maíz (Kozziel et al., 1993).

De manera similar los inventores contemplan que la construcción genética de la presente invención, debido a que ellas contienen uno o más genes de origen bacterial, puede en ciertas circunstancias ser alterado para incrementar la expresión de estos genes derivados procarióticos en particular células huésped eucarióticas y/o plantas transgénicas que comprenden tales construcciones. Usando técnicas de biología molecular que son bien conocidas por aquellos versados en la técnica uno puede alterar la codificación y las secuencias no codificadas de las secuencias del gen que codifica el tIC851 particular par optimizar o facilitar su expresión en células de plantas transformadas a niveles adecuados para impedir o reducir la infestación o ataque de insectos en tales plantas transgénicas.

4.13.4. Uso de Promotores en Vectores de Expresión

La expresión de un gen que existe en una forma de ADN en una forma de doble ramificación involucra la transcripción del mensajero ARN (mARN) de ramificación codificada del ADN por una enzima de polimerasa ARN, y el proceso subsecuente del transcripto primario mARN dentro del núcleo. La transcripción de ADN en mARN es regulada por una región de ADN referida como el "promotor". La región promotora contiene una secuencia de bases que dan señal a la polimerasa ARN para asociarse con el ADN y para iniciar la transcripción de mARN usando una de las ramas de ADN como una plantilla para hacer una rama correspondientes de ARN. El promotor particular seleccionado debería ser capaz de causar suficiente expresión de la secuencia codificada para resultar en la producción de una cantidad insecticida efectiva de la proteína *Bacillus turingiensis*.

Un promotor es seleccionado por su habilidad para dirigir las células de planta transformada o la actividad transcripcional de las plantas transgénicas a la región codificada para asegurar suficiente expresión de la

secunecia que codifica la enzima para resultar en la producción de cantidades insecticidas de la proteína *Bacillus turingiensis*. Los genes estructurales pueden ser dirigidos por una variedad de promotores en los tejidos de la planta. Los promotores pueden ser constitutivos cercanos (por ejemplo ellos guían la transcripción del transgen en todos los tejidos), tal como el promotor sea CaMV 35S, o promotores desarrolladamente específicos de tejido que afectan los dicotes o monocotes. En donde el promotor es un promotor cerca de constitutivo tal como CaMV 35S o el FMV35S, se incrementa en la expresión de polipéptido que se encuentra en una variedad de tejidos de planta transforamda y en la mayoría de órganos de las plantas. (ejemplo, el tallos, las hojas, la semilla y la raíz). Las veersiones mejoradas o duplicadas de los promotores CaMV 35S Y FMV35S son particularmente útiles en la práctica de esta invención (Kay et al., 1987; Rogers, patente U. S. 5,378,619).

Aquellos versados en la técnica reconocerán que existe un número de promotores que son activos en células de plantas y han sido descritas en la literatura. Tales promotores pueden ser obtenidos a partir de plantas o de virus de plantas e incluyen, pero no están limitados a,

sintasa de nopalina (NOS) y octopina sintasa (OCS) (que son portados en plásmidos que inducen tumor de *Agrobacterium tumefaciens*), el virus del mosaico del coliflor (CaMV) 19S y 35S como promotores y el promotor inducible de luz a partir de una subunidad pequeña de ribulosa 1,5- bifosfato carboxilasa (ssRUBISCO, un polipéptido de planta muy abundante), el promotor Act1 del arroz y el virus de mosaico del Figwort (FMV) 35S promotor. Todos estos promotores han sido usados para crear diversos tipos de construcciones de ADN que han sido expresadas en plantas (ver por ejemplo McElroy et al., 1990, patente U. S. 5,463,175).

Adicionalmente, también es preferido llevar a cerca de la expresión de la δ -endotoxina *Bacillus thuringiensis* en tejidos específicos de las plantas usando vectores de integración de plantas que tienen un promotor específico de tejido. Los tejidos objetivo específicos pueden incluir las hojas, el tallo, la raíz, los tubérculos, las semillas, el fruto, etc. y los promotores escogidos deben tener el tejido deseado y la especificidad de desarrollo. Por lo tanto, la función promotor debe ser optimizada seleccionando un promotor con las capacidades de

expresión de tejido deseado y una fuerza de promotor aproximada y seleccionar un transformante que produce la actividad insecticida deseada en los tejidos objetivo. Esta selección se acerca al grupo de transformantes es empleada rutinariamente en la expresión de genes estructurales heterólogos en plantas ya que es una variación entre los transformantes que contienen el mismo gen heterólogo debido al sitio de inserción del gen dentro del genoma de la planta (comúnmente referido como el "efecto de posición"). Adicionalmente a los promotores que son conocidos por causar transcripción (constitutivo o específico de tejido) del ADN en células de planta, otros promotores pueden ser identificados para el uso en la invención actual por medio de ubicar una librería de cADN de planta para los genes que son expresados selectivamente o preferiblemente en los tejidos objetivos y entonces determinar las regiones promotoras.

Un promotor específico de tejido ejemplar es el promotor lectina, que es específico para tejidos de semilla. La proteína de Lectina en semillas de granos de soja está codificada por un gen único (Lel) y es solamente expresada durante la maduración de la semilla y tiene en cuenta entre 2 a cerca de 5% del total de mRNA

J/A

de semilla. El gen de Lectina y el promotor específico de la semilla han sido caracterizados completamente y usados para dirigir la expresión específica de semilla en plantas de tabaco transgénico (Vodkin et al., 1983; Linstrom et al., 1990). Un vector de expresión que contiene una región codificada que codifica un polipéptido de interés puede ser construida bajo control del promotor de lectina y aquel vector puede ser introducido en plantas usando, por ejemplo, un método de transformación de protoplasto (Dhir et al., 1991). La expresión del polipéptido entonces estaría dirigido específicamente a las semillas de la planta transgénica.

Una planta transgénica de la presente invención producida por una célula de planta transformada con un promotor específico de tejido puede ser cruzada con una segunda planta transgénica desarrollada a partir de una célula de planta transformada con un promotor específico de tejido diferente para producir una planta transgénica que muestra los efectos de la transformación en más de un tejido específico.

Otros promotores específicos de tejido ejemplares son la sintetasa de sucroisa de maíz 1 (yang et al.,

1990), la dehidrogenasa 1 de alcohol de maíz (Vogel et al., 1989), el complejo de cosecha ligera de maíz (Simpson et al., 1986), la proteína de choque de calor de maíz (Odell et al., 1985), la carboxilasa RuBP de subunidad pequeña de guisante pequeño (Poulsen et al., 1986; Cashmore et al., 1983), sintasa manopina de plásmido Ti (McBride y Summerfelt, 1989), sintasa nopalina de plásmido TI (Landgridge et al., 1989), isomeraza cchalcone de petunia (Van Tunene et al., 1988), proteína rica en glicina de frijol 1 (Keller et al., 1989), transcripto de CaMV 35S (Odell et al., 1985) y patatina de papa (Wenzler et al., 1989). Los promotores preferidos son el virus de mosaico de coliflor (CaMV 35S) y el promotor de carboxilasa RuBP de subunidad pequeña del S-E9.

Los promotores usados en las construcciones ADN en la presente invención pueden ser modificados, si se desea, para afectar sus características de control. Por ejemplo, el promotor CaMV 35S puede ser ligado a la porción del gen ssRUBISCO que represa la expresión del ssRUBISCO en la ausencia de luz, para crear un promotor que es activo en las hojas pero no en la raíz. El promotor quimérico resultante puede ser usado como se

describe aquí. Para propósitos de esta descripción, la frase promotor "CaMV 35S" incluye así variaciones del CaMV del promotor caMV 35S, por ejemplo, promotores derivados por medio de ligación con regiones operadoras, aleatorias o controladas de mutagénesis, etc. más aún, los promotores pueden ser alterados par contener múltiples "secuencias mejoradoras" para ayudar a elevar la expresión del gen,. Los ejemplos de tales secuencias mejoradoras han sido reportadas por Kay et al., (1987). El cloropasto o los promotores específicos de plástido son conocidos en la técnica (Daniel et al., patente US No. 5,693,507, incorporada aquí como referencia), por ejemplo promotores obtenibles a partir de genes de cloroplasto, tales como el gen psbA de la espinaca o del guisnate, la región promotora rbcL y atpB del maíz, y los promotores de rARN. Cualquier cloroplasto o promotor operable de plástido está dentro del alcance de la presente invención.

El ARN producido por una construcción ADN de la presente invención también contiene una secuencia líder no traducida 5'. Esta secuencia puede ser derivada a partir del promotor seleccionado para expresar el gen, y puede ser modificada específicamente de manera que se

114

incrementa la translación del gen del mRNA. Las regiones no traducidas 5' también pueden ser obtenidas a partir de AARN virales, a partir de genes eucarióticos adecuados, o a partir de una secuencia de gen sintético. La presente invención no está limitada a construcciones en donde la región no traducida es derivada de la secuencia no traducida 5' que acompaña la secuencia promotora. Como se muestra más abajo, una secuencia líder de gen de planta que es útil en la presente invención es la proteína de choque de calor de petunia 70 (hsp 70) (Winter et al., 1988).

Una modalidad ejemplar de la invención involucra el plástido de objetivo o plástido de localización de la secuencia de aminoácido del *Bacillus turingiensis*. Las secuencias de objetivo de plástido han sido aisladas a partir de genes de planta codificados nucleares numerosos y han sido mostrados para dirigir la importación de proteínas sintetizadas citoplásmicamente en plástidos (revisado en Keesgtra y Olsen, 1989). Una variedad de secuencias de objetivo de plástico, bien conocida en la técnica, incluye pero no está limitada a ADPGPP, sintasa EPSP, o ssRUBISCO, puede ser empleada en la práctica de esta invención. En modalidades alternativas preferidas,

las secuencias objetivo plastídicas (péptido y ácido nucleico) para plantas monocotiledinosas puede consistir de un fragmento de codificación genómico que contiene una secuencia intron lo mismo que un sitio de enclavado proteolítico duplicado en las secuencias objetivo plastídicas codificadas.

Las tablas 5 a 7 dan una lista de promotores que son ilustrativos de aquellos versados en la técnica, pero que no significa que están limitados a ellos.

Tabla 5
Promotores de planta

Promotor	Referencia
Viral	
Virus de mosaico de Figwort (FMV)	Patente U. S. No. 5,378,619
Virus de mosaico de coliflor (Camv)	Patente U. S. No. 5,530,196
	Patente U. S. No. 5,097,025
	Patente U. S. No. 5,110,732
Planta	
Factor de elongación	Patente U. S. No. 5,177,011
De la Histona Arabidopsis de	Patente U. S. No. 5,442,052
poligalacturonasa de tomate	Patente U. S. No. 5,491,288
H4 faseolina grupo 2	Patente U. S. No. 5,504,200
Ubiquitin P119 α -amilasa	Patente U. S. No. 5,608,144
	Patente U. S. No. 5,614,399
	Patente U. S. No. 5,633,440
	Patente U. S. No. 5,712,112
Mejorador viral/promotor de planta	
Mejorador CaMV 35S/promotor de sintasa de manopina	Patente U. S. No. 5,106,739

116

Tabla 6
Promotores de planta específico

Promotor de tejido específico	Tejidos	Referencia
Blec	Epidermis	Patente U. S. No. 5,646,333
Maleato sintasa	Semillas; siembras	Patente U. S. No. 5,689,040
Sisocitrato liasa	Semillas; siembras	Patente U. S. No. 5,689,040
Patatina	Tubérculos	Patente U. S. No. 5,436,393
ZRP2	raíz	Patente U. S. No. 5,633,363
ZRP2(2,0)	raíz	Patente U. S. No. 5,633,363
ZRP2(1,0)	raíz	Patente U. S. No. 5,633,363
Rb7	raíz	Patente U. S. No. 5,459,252
SodA1	raíz	Patente U. S. No. 5,401,836
SodA2	fruta	Patente U. S. No. 4,943,674
CHS15	meristem	Patente U. S. No. 5,589,583
Psam-1	célula de guarda	Patente U. S. No. 5,538,879
ACT11	estambre	Patente U. S. No. 5,589,610
zmGBS	polen;	Van cap et al., 1996
zmZ27	capa media;	Van cap et al., 1996
osAGP	estomio de antenas	Faktor et al., 1996
osGT1	manojos vasculares; estoma	Huang et al., 1997
RolC	brotos axilares;	Rusell y Fromm, 1997
Sh	periclos;	Rusell y Fromm, 1997
CMd	estomio;	Rusell y Fromm, 1997
Bnm 1	polen;	Rusell y Fromm, 1997
Virus baciliforme de	flores; puntas de raíz; tejido	Graham et al., 1997
Arroz tungro	floem; corteza;	Graham et al., 1997
S2-Rnasa	puntas de raíz	Grosset et al., 1997
LeB4	tejidos alargados y órganos;	Treacy et al., 1997
Gf-2,8	polen; polen óvulos; endosperma	Yin et al., 1997a; 1997b
	endosperma	Flicker et al., 1988
	endosperma	Baumlein et al., 1991
	endosperma	Berna and Bernier, 1997
	tejido floem; manojos de vainas;	
	tejido floem parenquima vascular	
	endosperma	
	polen	
	floem	
	polen	
	semillas	
	semillas;siembras	

La habilidad para expresar genes en un tejido específico de manera en plantas ha llevado a la producción de plantas estériles macho y hembra. Generalmente, la producción de plantas estériles macho envuelve el uso de promotores específicos de anteras operablemente enlazados con genes heterólogos que

117

disrumpen en la formación del polen (patente U. S. No. 5,689,051; 5,689,049; 5,659,124). La patente estadounidense No. 5,633,441 describe un método para producir plantas con esterilidad genética hembra. El método comprende el uso de células de estilo, células de estigma o células de estilo y estigma de promotores específicos que expresan polipéptidos que, cuando son producidos en las células de las plantas matan o afectan significativamente el metabolismo funcionamiento o desarrollo de las células.

Tabla 7
Promotores de Planta Inducibles

Promotor	Referencia
Promotor de choque de calor	Patente U. S. No. 5,447,858
Em	Patente U. S. No. 5,139,954
Adhl	Kyozoka et al., 1991
HMG2	Patente U. S. No. 5,689,056
Sinamil alcohol dehidrogenasa	Patente U. S. No. 5,633,439
Asparagina sintasa	Patente U. S. No. 5,595,896
GST-II-27	Patente U. S. No. 5,589,614

4.13.5. Secuestro y Objetivo de Cloroplasto

Otra enseñanza para incrementar la expresión de genes en plantas han sido demostrada en la transformación del cloroplasto de tabaco. Altos niveles de expresión de una proteína de cristal no modificada de *Bacillus thuringiensis* que codifica genes en el tabaco ha sido reportada por McBride et al., (1995).

Adicionalmente, los métodos para marcar proteínas en el cloroplasto han sido desarrollados. Esta técnica, utiliza el péptido de tránsito de cloroplasto del guisante, ha sido usado como objetivo o para ubicar las enzimas del trayecto de síntesis de polihidroxibutirato hacia el cloroplasto (Nawrath et al., 1994). También, esta técnica negada negó la necesidad de modificación de la región de codificación diferente a agregar una secuencia objetivo apropiada.

La patente estadounidense 5,576,198 describe composiciones y métodos útiles para ingeniería genética para células de plantas para suministrar un método para controlar la temporización o el patrón de tejido de la expresión de secuencias de ADN extrañas insertadas en los

genomas de plástido de plantas. Las construcciones incluyen aquellas para las transformaciones nucleares que suministran para la expresión de una subunidad única viral de polimeraza ARN en tejidos de plantas, y marca la proteína de polimeraza expresada dentro de los plásticos de células de planta. También se han incluido construcciones de expresión de plásticos que comprenden una región promotora de gen viral que es específica a la polimeraza de ARN expresada a partir de las construcciones de expresión nuclear descritos anteriormente y un gen heterólogo de interés para ser expresado en las células de plástido transformadas.

4.13.6. Efectos de las regiones 3' sobre expresión de transgen

las regiones de extremo 3' de transgenes han sido encontradas que tienen un efecto grande sobre la expresión transgen en las plantas (Ingel brecht et al., 1989). En este estudio, diferentes extremos 3' fueron enlazados operativamente a la neomicina fosfotransferasa II (NptII) como gen reporte y expresada en tabaco transgénico. Los diferentes extremos 3' usados fueron obtenidos a partir del gen de octopina sintasa, la

proteína de semilla 2S a partir de Arabidopsis, la subunidad pequeña de rbcS a partir de Arabidopsis, la extensión de forma de zanahoria, y la chalcona sintasa de antirinum. En los transformantes de tabaco estable, había cerca de 60 dobles de diferencia entre la mejor construcción de expresión (subunidad pequeña rbcS extremo 3') y la construcción de expresión inferior (chalcona sintasa en el extremo 3').

4.14. Composiciones de anticuerpos y métodos para fabricarlos

en modalidades particulares los inventores contemplaron el uso de anticuerpos, sea monoclonales o policlonales que se enlazan a uno o más de los polipéptidos descritos aquí. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica ver, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988). Los métodos para generar anticuerpos monoclonales (mAbs) generalmente se inician a lo largo de las mismas líneas que aquellos para preparar anticuerpos policlonales. El mAbs puede ser fácilmente preparado por medio del uso de técnicas bien conocidas, tales como aquellas ejemplificadas en la patente estadounidense, 4,196,265. El uso de anticuerpos

es bien conocido en la técnica y puede ser usado para purificación, inmunoprecipitación, ELISA y western blot para resolver la presencia de moléculas que tienen epítopos identificables. Aquellos versados en la técnica no encontrarán experimentación indebida al usar anticuerpos y tales métodos para odilatrar, identificar y caracterizar genes y proteínas expresados a partir de tales genes como se contempla aquí. Los métodos de detección con base en inmunología para uso en conjunto con el conteo western incluye anticuerpos secundarios marcados enzimáticamente-, radiomarcados-, o fluorescentemente contra las partes de toxina que son consideradas de uso particular a este respecto.

4.15. Equivalentes Funcionales Biológicos

La modificación y cambios pueden ser hechos en una estructura de péptidos de la presente invención y las secuencias de ADN que las codifican y todavía obtener una molécula funcional que codifica una proteína o péptido con características deseables. La siguiente es una discusión con base en cambios de aminoácidos de una proteína para crear un equivalente o aún una molécula de segunda generación mejorada. En modalidades particulares

de la invención, las proteínas de cristal mutado son contempladas como útiles para incrementar la actividad insecticida de la proteína y consecuentemente incrementar la actividad insecticida y/o la expresión de los genes recombinantes en una célula de planta. Los cambios de aminoácido pueden ser logrados cambiando los codones de la secuencia de ADN, de acuerdo con los codones dados en la tabla 8.

Tabla 8

Amino Ácidos	Abreviaciones de Codon			Codones				
	1							
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCC	GCU		
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Aspargina	Asn	N	AAC	AAU				
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU				
Cisteína	Cis	C	UGC	UGU				
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG				
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG				
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidina	His	H	CAC	CAU				
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Lisina	Lis	K	AAA	AAG				
Metionina	Met	M	AUG	UUG				
				+				
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU				
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Triptofan	Trp	W	UGG					
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU				
Valina	val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		

*El codón UUG también es utilizado como un codón de iniciación como una parte del tIC851 de secuencia de codificación.

- 1- el código de tres letras y la letra única correspondiente al código son abreviaciones.

Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de la capacidad de enlace interactivo con las estructuras tales como, por ejemplo, regiones de enlace de antígenos de anticuerpos o sitios de enlace sobre moléculas de sustrato. Ya que esta es la capacidad interactiva y la naturaleza que define aquella actividad funcional biológica de la proteína, ciertas sustituciones de secuencia de aminoácido pueden hacerse en una secuencia de proteína y, por supuesto, su secuencia de codificación de ADN subyacente y sin tener en cuenta la obtención de una proteína con propiedades similares. Por lo tanto se contempla por los inventores que diversos cambios pueden ser hechos en las secuencias de péptidos de las composiciones descritas o las secuencias de ADN correspondientes con la codificación de

124

dichos péptidos sin pérdida apreciable de su actividad o utilidad biológica.

Al hacer tales cambios, el índice hidropático de los aminoácidos puede ser considerado. La importancia del índice hidropático del aminoácido al conferir una función biológica interactiva sobre una proteína generalmente se entiende en la técnica. (Kyte and Doolittle, 1982, incorporado aquí como referencia). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.

Cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático sobre la base de su hidrofobicidad y características de carga (Kyte and Doolittle, 1982), estas son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptofan (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2)

glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5);
aspargina (-3,5); lisina(-3,9); y arginina (-4,5).

Es conocido en la técnica que ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen un índice hidropático similar o marcación y todavía resulta en una proteína con una actividad biológica similar, por ejemplo, todavía se obtiene una proteína equivalente funcionalmente biológica. Al hacer tales cambios, la sustitución de los aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 se prefiere, aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos que están dentro de $\pm 0,5$ aún son más preferidos.

Se sabe en la técnica que la substitución de aminoácidos similares puede ser hecha sobre la base de la hidrofiliidad. La patente estadounidense 4,554,101 incorporada aquí como referencia, dice que la hidrofiliidad promedio local mayor de una proteína según se gobierna por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína.

Como se detalla en la patente estadounidense 4,554,101, los siguientes valores de hidrofiliidad han sido asignados a residuos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 $\pm$ 1); glutamato (+3,0 $\pm$ 1); serina (+0,3); aspargina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 $\pm$ 1); alanina -0,5); histidina (-0,r); cisteina (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptofan (-3,4).

Se sabe que un aminoácido puede ser sustituido por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y todavía obtener un equivalente biológicamente, y en particular una proteína equivalente inmunológicamente. En tales cambios, la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 se prefieren aquellos que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos que están dentro de $\pm 0,5$ son particularmente preferidos.

Como se establece anteriormente, las sustituciones de aminoácidos se hacen generalmente con base en la

similaridad de los sustituyentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Las sustituciones ejemplares que tienen varias de las anteriores características en consideración son bien conocidas por aquellos versados en la técnica e incluyen Arginina y glicina, glutamato y aspartato, serina y treonina; glutamina y asparagina y valina, leucina y isoleucina.

5.0. Ejemplos

los siguientes ejemplos están incluidos para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Debe apreciarse por aquellos expertos en la técnica que las técnicas distintas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención,, y por lo tanto pueden ser consideradas que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, aquellos versados en la técnica a la luz de la presente descripción darse cuenta que muchos cambios pueden ser hechos en las modalidades específicas que están siendo descritas y

todavía obtenerse un resultado similar o parecido sin salirse del espíritu y alcance de la invención.

Ejemplo 1 - Cepas de *Bacillus turingiensis* con secuencias relacionadas con cRYET70

Previamente se había identificado una cepa de *Bacillus turingiensis* que expresa una proteína la cual nosotros designamos CryET70. La proteína CryET70 tenía una bioactividad específica de coleopterán cuando se suministró unos estudios de alimentación de bioneso a larvas de gusanos de raíz del maíz western pero no contra las larvas de gusanos de maíz del sur. Estuvimos interesados en identificar cepas adicionales de *Bacillus turingiensis* que contenían ADN que codifica el CryET70 y géneros relacionados cercanamente. Experimentos de hibridación de brotes de colonia fueron compeltados como se indica más abajo, usando una probeta preparada a partir de ADN cryET70. Las cepas tipo salvage *Bacillus turingiensis* fueron marcadas sobre placas lb e incubadas a 30° C durante 300. Un filtro de membrana circular (82 mm Nytran® Maximum-Strength Plus (Schleicher y schuell, keene, NH) fue entonces colocada sobre las placas y las placas y filtron fueron incubados a 25° C durante la

noche. Los filtros, los cuales contenían una réplica exacta de las marcas, y fueron colocados sobre placas frescas y los y las placas originales fueron incubados a 30° C durante 4 horas para permitir el crecimiento de las colonias. Para liberar el ADN de las células de *Bacillus turingiencis* sobre los filtros de nitrocelulosa, los filtros fueron colocados, con la colonia hacia arriba, sobre un papel de cromatografía Whatman 3 MM (Whatman International LTD., Maidstone, Inglaterra) empapado con NaOH al 0,5%, 1,5 m de NaCl durante 156 minutos. Los filtros fueron entonces neutralizados por medio de colocar los filtros, con la colonia hacia arriba sobre papel Whatman empapado con NH₄ al 1 M-acetato, 0,02 M de NaOH durante 10 minutos. Los filtros fueron entonces enjuagados en 3X SSC, 0,1% de SDS, secado con aire y horneado durante una hora a 80° C en un horno al vacío para prepararlos para la hibridización.

Los imprimadores de oligonucleótidos fueron diseñados con base en la secuencia cryET70 SEC ID NO:1:

AM34: 5'GACATGATTTTACTTTTAGAGC-3'

(SEC ID NO:3)

AM43: 5'CATCACTTTCCCATAGC-3'

(SEC ID NO:4)

Un PCRTM con imprimadores AM 34 y AM 43 fue usado para amplificar un fragmento CryET70 a partir del ADN pEG1648. Este productoPCRTM fue marcado con [α -³²P]dATP usando el kit a-Gene® (Promega Corporation, Madison, WI) para generar una probeta específica para cryET70. Las hibridizaciones fueron llevadas a cabo durante la noche con la temperatura de hibridización a 63° C. Los filtros fueron lavados en 1X SSC, 0,1% de SDS a 63° C. Las colonias hibridizadas fueron detectadas por autoradiografía usando una película de rayos X Koda X-omat AR. Los resultados indicaron que varias cepas de *B. turionigenis* en nuestra colección contenida en secuencias de ADN que hibridizadas a la secuencia de cryET70 bajo condiciones especificadas. Las cepas identificadas por la hibridización blot de la colonia se dan en la tabla 9.

5.2. Ejemplo 2 - producción de Anticuerpos para CryET70

anticuerpo policlonal específico para CryET70 fue preparado de manera que las proteínas que contenían los epítomos relacionados con CriETyo pudieron identificarse usando métodos inmunológicos. Las cepas de *Bacillus turingiensis turingiensis* recombinantes EG11839 contenían el plásmido pEG1648 el CryET70 fueron hechos crecer en el medio C2 durante 4 días a 25° C. Las esporas y cristales resultantes fueron lavados en 2,5 volumen y resuspendidos en un volumen del original de 1:20 en 0,005% de Tritón X-100. La suspensión de espora- cristal pero entonces cargada en una sucrosa por etapas de gradiente que consistía de 79%, 72% y 5% de sucrosa. El gradiente fue hecho girar durante la noche en una Beckman SW28 a 18000 rpm. Los cristales de CryET70 quedaron entre 79 % y el 72% de tapas de sucrosa. Los cristales de CryET70 lavados varias veces en H₂O y resuspendidos en 0,05% de Tritón X-100. Los cristales purificados fueron entonces solubilizados en carbonato de sodio 50 mM (pH 10), 5mM de DTT, y cualquier célula o espora vegetativa contaminante fueron removidas por centrifugación. El sobrenadante fue neutralizado con ácido bórico a un pH de

8,4 y los cristales solubilizados fueron enviados a los laboratorios Rockland (Gilbertsville, PA) para la producción de anticuerpos en conejos de acuerdo con los procedimientos estándar. Los conejos recibieron dos inyecciones intradérmicas en los días 0 y 7 con 50% de la proteína CryET70 en una solución salina cargada con sulfato estéril 50% de adyuvante Freund completo. Dos cargas adicionales fueron dadas subcutáneamente en los días 14 y 28 antes de un ensayo de sangre en el día 38. 250 µg de CryET70 fueron usados por conejo para la inyección inicial, y 125 µg de CryET70 fueron usadas por conejo para las inyecciones subsecuentes. En el día 56 los conejos fueron reforzados nuevamente como en lo anterior, antes de una producción de sangre en el día 71. El refuerzo final fue con 160 µg de Cry Et70 en el día 80 seguido por un desangramiento de terminación en el día 90.

5.3. Ejemplo 3 - análisis Blot del sur del oeste

Las cepas identificadas en el ejemplo 1 ya que contenían secuencias relacionadas con el cryET70 fueron examinadas adicionalmente por análisis su y oeste.

El ADN total fue preparado a partir de la cepas por el siguiente procedimiento. Las células vegetativas fueron resuspendidas en una carga de lisis que contenía 50 mM de glucosa, 25 mM de glucosa, 25 mM de tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, y 4 mg/ml lisozoma. La suspensión fue incubada a 37° por una hora. Luego de la incubación, se agregó SDS al 1%. La suspensión fue entonces extraída con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamilo (50:48:2). El ADN fue precipitado a partir de la fase acuosa por la adición de un décimo del volumen de acetato de sodio a 3M, y dos volúmenes de 100% de etanol.

El ADN precipitado fue recolectado con una varilla de vidrio, lavado con 70% de etanol, y resuspendido con dH₂O.

El ADN total fue digerido con EcoRI y separado sobre un gel de agarosa al 0,8% en una carga TAE (40 mM tris-acetato, 2 mM Na₂EDTA, pH 8). El ADN fue secado sobre un filtro Immobilon-NC de nitrocelulosa (Milipore Corp, Bedford, MA) de acuerdo con el método del sur (1975). El ADN fue fijado al filtro por medio de hornear a 80° C en un horno al vacío.

El secado fue entonces hibridizado con la probeta CryET70 descrita en el ejemplo 1. Los filtros fueron expuestos a la pelota marcada diluidos en 3X SSC, 0,1% SDS, 10X de reactivo Denhardt (0,2% de albúmina de suero de bovino (BSA), 0,2% de polivinilpirrolidona (0,2% de polivinilpirrolidona, 0,2% de Ficoll®), 0,2 mg/ml de heparina e incubado durante la noche a 60° C. Luego de la incubación, los filtros fueron lavados en tres cambios de 3X SSC, 0,1% de SDS a 60° C. Los filtros fueron secados y expuestos a una película de rayos X Kodak X-OMAT AR (Eaastman Kodak Company, Rochester, NY) durante la noche a -70io C con un tamizado de intensificación Fisher Biotech, Pittsburgh, PA). Las cepas contienen fragmentos de ADN hibridizantes se dan en la tabla 9.

Par el análisis de secado western, las cepas *Bacillus turingiencis* fueron hechas crecer en el medio C2 (Donovan et al., 1988) a 25° C durante 4 días hasta la esporulación y hasta qu4e ocurrió la lisis de las células. Las esporas y cristales resultantes fueron cosechados por centrifugación, lavado aproximadamente 2,5 veces el volumen original con H₂O, y resuspendidos en 0,05% de Tritón X-100® a un décimo del volumen original.

Las proteínas a partir de cultivos concentrados 10 veces de las cepas fueron corridas en un gel de poliacrilamida al 10% de ADA (Owl Separation System, Woburn, MA). Veinte μ l de cultivo fue agregado a 10 μ l de una carga Laemmli 3x y calentada a 100° C durante 5 minutos. 15 μ l fueron cargados por pista. Luego de la electroforesis el gel fue secado a nitrocelulosa seguido de los procedimientos de secado western estándar (Towbin et al., 1979). El filtro fue bloqueado con TBSN (10 mM Tris, pH 7,8 0,9% NaCl, 0,1% de BSA libre de globulina, 0,03% de NaN₃) + 2% de BSA. El filtro fue entonces lavado con TBSN dos veces y luego incubado con antisuero de conejo anti-CryET70 diluido en 1/1.000 en TBSN). El filtro fue entonces lavado en TBSN e incubado con fosfatasa alcalina conjugada de oveja e IgG anticono (1/1000 en dilución TBSN). Después de lavado en TBSN, las proteínas relacionadas antigénicamente con el CryET70 fueron detectadas con Immunopure® un kit de sustrato NBT/BCIP (Pierce, Rockford, IL). Las cepas de *Bacillus turingiensis* produjeron proteínas antigénicamente relacionadas con el CryET70 según se juzgó por el análisis blot western según se indicó en la tabla 9.

5.4. Ejemplo 4 - Evaluación de Bioensayo de las cepas *Bacillus turingiensis*

Los bioensayos con insectos fueron usados para caracterizar las cepas *Bacillus turingiensis* que tenían actividad directamente contra la larva del gusano de raíz western. Las cepas de *Bacillus turingiensis* fueron hechas crecer en el medio C2 (Donovan et al., 1988) a 25° C durante 4 días. En dicho tiempo ocurrió la esporulación y la lisis. Las esporas y cristales resultantes fueron cosechados por centrifugación lavados en aproximadamente 2,5 veces el volumen original con agua, y resuspendidas en 0,005% de Tritón X-100® a un décimo del cultivo original. Las suspensiones de spora - cristales fueron usadas directamente en el bioensayo.

La actividad insecticida contra la larva WCRW fue determinada a través de un ensayo de contaminación superficial sobre una dieta artificial (20 g de agar, 50 g de germen de trigo, 39 g de sucrosa, 32 g de caseína, 14 g de fibra, 9 g de una mezcla de sales wesson, 1 g de metilparabeno, 0,5 g de ácido sórbico, 0,06 g de colesterol, 9 g de mezcla de vitaminas Vaaderzant, 0,5 ml de aceite de semilla, 2,5 ml de ácido

fosfórico/propiónico por litro) en una copa de alimentación plástica (175 m² de superficie). Todos los bioensayos fueron llevados a cabo usando bandejas con 128 pozos que contenían aproximadamente 1 ml de la dieta por pozo con unas cubiertas de lámina mylar perforadas (C-D International Inc., Pitman, NJ). Treinta y dos larvas, (una por pozo) fueron ensayadas pro el tamizado de bioensayo a 50 µl de la suspensión esporas cristal por pozo de dieta. Los resultados del tamizado de bioensayo se dan en la tabla 9.

Tabla 9

Resumen de los análisis sur, western, y de bioensayo

CEPAS	SECADO SUR	SECADO WESTERN	%Control WCRW
EG2929	+	+	26
EG3218	+/-	-	30
EG3221	+/-	-	63
EG3303	+/-	-	15
EG3304	+/-	-	0
EG3707	+	-	45
EG3803	-	-	0
EG3953	+	-	100
EG3966	+	-	7
EG4113	-	-	40
EG4135	+	+	45
EG4150	-	-	64
EG4268	-	+	46
EG4375	-	-	100
EG4447	+/-	-	0
EG4448	+	-	100
EG4503	+/-	-	56
EG4541	+/-	-	72
EG4580	+	+	33
EG4640	-	-	95
EG4737	-	-	72
EG4741	+	-	73
EG5233	-	-	52
EG5336	+	-	69
EG5370	-	-	16
EG5422	-	-	8

5.5. Ejemplo 5 - análisis de las ceps *Bacillus turingiensis* tipo silvestre

La secuencia del péptico CryET70 había previamente mostrado que compartía una identidad de secuencia de aminoácidos significativa con Cry22Aa. Con base en el nucleótido conocido y en la secuencia de aminoácido del

CryET70 y Cry22Aa, imprimadores de amplificación térmica fueron designados para las secuencias similares o idénticas del CryET70 y Cry22Aa de secuencias de codificación.

Tabla 10

Amplificación térmica de Alineación de secuencia de
Oligonucleótido en Cry22Aa y CryET70

Oligo ^a	Secuencia (5'-3') & SEC ID NO: correspondiente	Posición correspondiente de Oligo en:	
		Cry22Aa (SEC IN NO:9)	CryET70 (SEC IN NO:9)
2270-1	GCATTCATAGAGGATCAAT SEQ ID NO:5	262-281	350-369
2270-2	ATTGATCCTCTATGAAATGC SEQ ID NO:11	281-262	369-350
2270-3	GTTTCCCAAATGGATATCC SEQ ID NO:12	428-446	516-534
2270-4	GGATATCCATTTGGGAAAC SEQ ID NO:13	446-428	534-516
2270-5	ATCTAATAACCTACATCAGA SEQ ID NO:14	726-745	814-833
2270-6	TCTGATGTAGGTTATTAGAT SEQ ID NO:15	745-726	833-814
2270-7	TATGGGGAAAGTGATGAAA SEQ ID NO:16	973-992	1061-1080
2270-8	TTTTCATCACTTTCCCATATA SEQ ID NO:6	992-973	1080-1061
2270-9	ATGTTGAATTAGAAATAG SEQ ID NO:17	1280-1297	1368-1385
2270-10	CTATTTCTAATTCAACAT SEQ ID NO:18	1297-1280	1385-1358
2270-11	AAGTCCTTGTTCTAGGAGAA SEQ ID NO:19	1481-1500	1569-1588
2270-12	TTCTCCTAGAACAAGGACTT SEQ ID NO:20	1500-1481	1588-1569
2270-13	TATGTATTCTATGATTCTAG SEQ ID NO:21	1840-1859	1928-1947
2270-14	CTAGAATCATAGAATACATA SEQ ID NO:22	1859-1840	1947-1928

a: los oligonucleótidos numerados impares representan secuencias idénticas a la posición indicada para cada gen (SEC ID NO:), y los oligonucleótidos

141

numerados pares representan secuencias complementarias a la posición indicada para cada gen (SEC ID NO).

Los oligonucleótidos numerados pares fueron empatados con los oligonucleótidos numerados impares en diversas combinaciones en reacciones de amplificación térmica para poder confirmar el tamaño esperado de fragmentos a partir de la amplificación de secuencias tanto desde CryET70 y Cry22Aa. El ADN obtenido a partir de las cepas EG4135 y EG4268 también fue usado en las reacciones de separación térmica con los pares imprimadores. Mientras que todos los pares producían fragmentos de amplificación tanto CryET70 y Cry22Aa, el par imprimador de oligonucleótido que produjo un producto a partir del ADN de las cepas EG4135 y EG4268 fue el par imprimador 2270-1 y 2270-8 (SEC ID NO:5 & SEC ID NO:6 respectivamente).

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo usando "Taq-Beads" (Pharmacia Biotech), un Stratagen Robocycler™, y el siguiente régimen de ciclado: 94 C durante 30 segundos, 45 C durante 45 segundos, y 72 C durante 1 minuto por 30 ciclos. El termociclado fue

precedido por una incubación de 5 minutos a 94 C, seguido de una incubación de 5 minutos a 72 C. En los productos de amplificación producidos de las cepas EG4135 y EG4268 fueron clonadas como fragmentos de extremo blunt en sitios SmaI del pBluescript KSII(+) y secuenciados. Las secuencias de los insertos del ADN indicaron la presencia de una estructura de lectura abierta (ORF) que mostró aproximadamente 65% de la identidad de la secuencia en la región correspondiente para cada CryET70 o Cry22Aa.

5.6. Ejemplo 6 - Análisis de Secuencia del Gen de Longitud Completa

Las librerías genómicas de ADN a partir de las cepas EG4135 y EG4268 fueron construidas en el vector Lambda Zap® II (Stratagene; La Jolla, CA) y fue usada para aislar clones recombinantes que contenían el ORF completo identificado en el ejemplo 5. El ORF codifica una proteína de 632 aminoácidos, designada tIC851. La secuencia de nucleótido acompaña el gen tIC851 (SEC ID NO:7) no mostrada en seguida:

AAATATTTTT AAAGGGGGAT ACGTAATTTTG AATTCTAAAT CTATCATCGA AAAAGGGGTA 60
 CAAGAGAATC AATATATTGA TATTCGTAAC ATATGTAGCA TTAATGGTTC TGCTAAATTT 120
 GATCCTAATA CTAACATTAC AACCTTAACA GAAGCTATCA ATTCTCAAGC AGGAGCGATT 180
 GCTGGAAAAA CTGCCCTAGA TATGAGACGT GATTTTACTC TCGTAGCAGA TATATACCTA 240
 GGGTCTAAAA GTAGTGGAGC TGATGGTATT GCTATAGCGT TTCATAGAGG ATCAATTGGT 300
 TTTATCGGTA CCATGGGTGG AGGCTTAGGG ATTCTAGGAG CACCAAACGG GATAGGATTT 360
 GAAATAGATA CGTATTGGAA AGCAACTTCA GATGAAACAG GCGATTCATT TGGACATGGT 420
 CAAATGAATG GAGCACATGC GGGATTTGTA AGTACAAATC GAAATGCAAG CTATTTAACA 480
 GCCTTAGCTC CTATGCAAAA AATACCTGCA CCTAATAATA AATGGCGGGT TCTAACTATC 540
 AATTGGGATG CGCGTAACAA CAACTAACA GCACGGCTTC AAGAGAAAAG TAATGATGCT 600
 TCTACTAGCA CTCCTAGTCC AAGATATCAA ACATGGGAAC TATTAAATCC TCGTTTTGAT 660
 TTAAATCAGA AATATACTTT TATTATCGGC TCAGCTACAG GGGCTGCTAA TAACAAGCAT 720
 CAGATTGGAG TTACTTTGTT TGAAGCATAC TTTACAAAAC CAACTATAGA GGCAAATCCT 780
 GTTGATATTG AACTAGGCAC AGCGTTTGAT CCATTAAACC ATGAGCCAAT TGGACTCAAA 840
 GCAACAGATG AAGTAGATGG AGATATAACA AAGGACATTA CGGTAGAATT TAATGACATA 900
 GATACCTCCA AACCAGGTGC ATACCGTGTA ACATATAAAG TAGTAAATAG TTATGGAGAA 960
 AGTGATGAGA AAACAATAGA AGTCGTAGTA TACACGAAAC CAACTATAAC TGCACATGAT 1020
 ATTACGATTA AGAAAGACTT AGCATTTGAT CCATTAAACT ATGAACCAAT TGGACTCAAA 1080
 GCAACCGATC CAATTGATGG AGATATAACA GATAAAATCG CTGTAAATTT TAATAATGTC 1140
 GATACCTCTA AACCAGGTAA ATACCATGTA ACATATAAAG TGATAAATAG TTATGAAAAA 1200
 ATTGATGAAA AAACAATAGA GGTACAGTA TATACGAAAC CATCTATAGT GGCACATGAT 1260
 GTTGAGATTA AAAAAGATAC GGCATTTGAT CCGTTAAACT ATGAACCAAT TGGGCTCAAA 1320
 GCAACCGATC CAATTGATGG AGATATAACA GATAAAATTA CGGTAGAATC TAATGATGTT 1380
 GATACCTCTA AACCAGGTGC ATATAGTGTG AAATATAAAG TAGTAAATAA TTATGAAGAA 1440
 AGTGACGAAA AAACAATTGC CGTTACAGTA CCTGTTATAG ATGATGGGTG GGAGAATGGC 1500
 GATCCGACAG GATGGAAATT CTTCTCTGGT GAAACCATTA CTCTAGAAGA TGATGAAGAG 1560
 CATGCTCTTA ATGGTAAATG GGTATTTTAT GCTGATAAAC ATGTAGCAAT ATACAAACAA 1620
 GTAGAGTTGA AGAATAATAT CCTTATCAA ATTACAGTAT ATGTTAAACC AGAAGATGAA 1680
 GGAAGTGTGG CACACCATAT TGTTAAAGTA TCTTTCAAAT CTGATTCTGC TGGTCCAGAA 1740
 AGTGAAGAAG TTATAAATGA AAGATTAATT GATGCAGAAC AGATACAAA AGGATACAGA 1800
 AAGTTAACAA GTATTCCATT TACACCAACA ACCATTGTTT CCAACAAAA ACCAGTGATA 1860
 ATTGTTGAAA ACTTTTTACC AGGATGGATA GGTGGAGTTA GAATAATTGT AGAGCCTACA 1920
 AAGTAAGAAT TATAAACTAG CTTTAAATAA ATATATTTAA AAAAT 1965

El codón de iniciación de tIC851 del ORF es el TTG iniciando en el nucleótido 28 de la secuencia mostrada anteriormente. La secuencia de aminoácido deducida (SEC ID NO:8) de la proteína tIC851 es mostrada abajo, según se tradujo a partir del ORF descrito anteriormente:

```

MNSKSIIEKG VQENQYIDIR NICSINGSAX FDPNTNITTL TEAINSQAGA IAGKTALDMR 60
RDFTLVADIY LGSKSSGADG IAIAPHRGSI GFIGTMGGGL GILGAPNGIG FEIDTYWKAT 120
SDETGDSFGH GQMGAGHAGF VSTNRNASYL TALAPMQKIP APNNKWRVLT INWDARNNKL 180
TARLQEKSNQ ASTSTPSPRY QTWELLNPAP DLNQKYTFII GSATGAANNK HQIGVTLFEA 240
YFTKPTIEAN FVDIELGTAF DPLNHEFIGL KATDEVGDI TKDITVEFND IDTSKPGAYR 300
VTYKVVNSYG ESDEKTIEVV VYTKPTITAH DITIKIDLAF DPLNYEPIGL KATDPIDGDI 360
TDKIAVKFNN VDTSKPGKYH VTYKVINSYE KIDEKTIEVT VYTKPSIVAH DVEIKNDTAF 420
DPLNYEPIGL KATDPIDGDI TDKITVESND VDTSKPGAYS VKYKVVNYYE ESDEKTIQVT 480
VPVIDDGWEN GDPTGNKFFS GETITLEDDE EHALLNGKWF YADKHVAIYK QVELNNIPY 540
QITVYVKPED EGTVAHHIVX VSPKSDSAGP ESEEVINERL IDAEQIQKGY RKLTSIPFTP 600
TTIVPMKKPV IIVENFLPGW IGGVRIIVEP TK 632

```

El peso molecular predicho para esta proteína es 69.398 Daltons.

Las secuencias de aminoácido del tIC851, CryET70, y Cry22Aa fueron alineadas según se muestra abajo usando el programa de alineación CLUSTAL (PC/GENE®). La proteína tIC851 compartía aproximadamente 56% de la identidad de secuencia de aminoácido con la CryET70 y aproximadamente 57% de la identidad de secuencia de aminoácido con

145

Cry22Aa. De acuerdo con las reglas de nomenclatura de proteína de cristal de *Bacillus turingiensis*, la proteína tIC851 podía ser asignada a una nueva clase secundaria de proteínas Cry.

Para la alineación de tres vías, el valor K-tuple fue establecido en 1, el valor de espacio de penalización fue establecido en 5, el tamaño de la ventana fue establecido en 10, el nivel de filtrado fue establecido en 2,5, el costo del espacio abierto fue establecido en 10, y el costo del espacio de unidad fue establecido en 10. Un "*" indica que una posición en la alineación está conservada perfectamente, y un "." indica que una posición fue bien conservada.

tIC851	AGFVSTNRNASYLTALAPMQKIPAPNNKWRVLTINWDARNNKL TARLQE-	186
	*****.*.*.***.*.*.***.*.*.***.*.*.***.*.*.	
Cry22Aa	TFNDITVGEKPRTPRTATWRLVNP AFELDQKYTFVIGSATGASNNLHQIG	250
ET70	TFNDSTVLVKPRTPRYARWELSNP AFELDQKYTFVIGSATGASNNLHQIG	249
tIC851	--KNDASTSTPSPRYQTWELLNPAFDLNQKYTFIIGSATGAANNKHQIG	234
	** . * * ****.*.*****.*****.* * ****	
Cry22Aa	IIEFDAYFTKPTIEANNVNVFVGATFNP KTYPGINLRATDEIDGOLTSKI	300
ET70	IIEFDAYFTKPTIEANNVSVFVGATFNP KTYPGINLRATDEIDGOLTSEI	299
tIC851	VTLFEAYFTKPTIEANPVDIELGTAFDPLNHEPIGLKATDEVGDITKDI	284
	.. *.*****.*.*.* .. *.*****.*.*.***.*.*.	
Cry22Aa	IVKANNVNTSKTGYYVYTYVENS YGESDEKTIEVTVFSNPTIIASDVEI	350
ET70	IVTDMNVNTSKSGVYNVYTYVENS YGESDEKTIEVTVFSNPTIIASDVEI	349
tIC851	TVEFNDIDTSKPGAYRVTYKVWNS YGESDEKTIEVVVYTKPTITAH DITI	334
	.*.*.*.*. *** * *****.*.*****.*.*	
Cry22Aa	EKGESFNPLTDSRVGLSAQDSL GNDITQNVKVKSSNVDTSKPGEYEVVFE	400
ET70	EKGESFNPLTDSRVRLSAQDSL GNDITSKVVKVKSSNVDTSKPGEYDVVFE	399
tIC851	KKDLAFDPL-----NYE----	346
	.*. .*.**	
Cry22Aa	VTDSFGGKA EKDFKVTVLGQPS IEANNVELEIDDSL DPLTDAKVGLRAKD	450
ET70	VTDNFGGKA EKEIKVTVLGQPS IEANDVELEIGOLF NPLTDSQVGLRAKD	449
tIC851	-----PIGLKATD	354
	*	
Cry22Aa	SLGNDITKDIKVKFNNVDTS NSGKYEVIFEVTD RFGKKAESIEVLVLGE	500
ET70	SLGKDITNDVKVKSSNVDT SKPGEYEVVFEVTD RFGKKAESIKVLVLGE	499
tIC851	PIDGDITDKIAVKFNNVDTS SKPGKYHVTYKVINSY EKIDEKTIEVTVYTK	404
	... ***... ** .*****.*.*.** .***.*.*. *	
Cry22Aa	PSIEANDVEVNKGETFEPLTDSRVGLRAKDSL GNDITKDVVKIKSSNVDT S	550
ET70	PSIEANNVEIEKDERFDPLTDSRVGLRAKDSL GKDITNDVKVKSSNVDT S	549
tIC851	PSIVAH DVEIKKDTAFDPLNYEPIGLKATDPIDGDITDKITVESNDVDTS	454
	*** *.....*.*.*.*.*.*.*.....*.....*	

48

Cry22Aa	KPGYEYVVFVETDRFGKYVEKTIGVIVPVIDDEWEDGNVNGWKFYAGQDI	600
ET70	KPGYEYVVFVETDRFGKYVKKLIIVVIVPVIDDEWEDGNVNGWKFYAGQDI	599
tIC851	KPGAYSVKYKVVVNYEESDEKTIAVTVPVIDDGWENGDPFGWKFFSGETI	504
	.*.* ..*..... .* * *.**.*.*.*.*.*	
Cry22Aa	KLKDPDKAYKGDYVFFYDSRHVAISKTIPLTDLQINTNYEITVYAKAES-	649
ET70	TLLKDPEKAYKGEYVFFYDSRHAAISKTIPTDLQVGGNYEITVYVKAES-	648
tIC851	TLEDDEEHALNGKVVFFYADKHVAIYKQV---ELKNIPYQITVYVKPEDE	551
	.* .* ..* ..*.....*.*.* * . .*. . .*.*****.*.*.	
Cry22Aa	---GDHHLKVITYKKDPAGPEEPPVFNRLISTGTLVEKDYRELKGT-FRVT	695
ET70	---GDHHLKVITYKKDPKGPPEEPPVFNRLISTGKLVEKDYRELKGT-FRVT	694
tIC851	GTVAHHIVKVSFKSDSAGPESEKVINERLIDAEQIQGYRKLTSIPFTPT	601
	..* ..*.....*.*. ***. *.**.*****. * *	
Cry22Aa	EL--NKAPLIIVENFGAGYIGGIRIV--KIS	722
ET70	EL--NQAPLIIVENFGAGYIGGIRIV--KIS	721
tIC851	TIVPNKKFVIIIVENFLPGWIGGVRIIVEPTK	632
	.. *.*****.*.***.*.*: ..	

5.7. Ejemplo 7 - Expresión de la proteína tIC851 en Bacillus turingiensis y la Evaluación del Bioensayo

La región de codificación para el tIC851 fue clonada dentro del vector de disparo del Bacillus turingiensis pEG597 (Baum et al., 1990) junto con cerca de 0,6 kb de ADN nativo de flanco tanto aguas arriba como aguas abajo del ORF, dando nacimiento a los plásmidos recombinantes pIC17501 y pIC17502. Estos plásmidos contienen un gen que confiere resistencia al cloramfenicol en una célula

huésped *Bacillus turingiensis*. El plásmido pMON56207, contenía la secuencia de codificación del CryET70, que confiere resistencia a la eritorimicina a un huésped *Bacillus turingiensis*. Estos plásmidos fueron introducidos dentro de la cepa Cry-*Bacillus turingiensis* EG10650 por electroporación. El crecimiento de recombinantes de los plásmidos correctos fueron seleccionados por el crecimiento sobre un medio de almidón agar suplementado con antibiótico apropiado.

Los recombinantes fueron hechos crecer en el medio C2 durante 72 a 96 horas, en cuyo tiempo los cultivos fueron esporulados y las células lisadas. Los plásmidos pIC17501 y pIC17502, diferían solamente con respecto a la orientación del inserto del gen tIC851, directamente la producción de una proteína con una masa molecular aparente de aproximadamente 75 kDa, según se juzgó por la electroforesis de gel de poliacrilamida SDS los recombinantes EG10650 del vector de clonación EG597 no produjeron una proteína cristal. El plásmido pMON56207 dirigió la producción de CryET70 con una masa molecular aparente de aproximadamente 80 kDa.

El tIC851 fue ensayado contra la larva weevil boll y gusano de raíz de maíz western (WCRW) en un bioensayo de alimentación de insectos y n mostró ninguna actividad contra el WCRW, pero sorprendentemente una muy buena actividad contra el weevil boll. Basado en la similaridad del tIC851 al CryET70 y al Cry22Aa, estas dos proteínas fueron también ensayadas contra el Weevil boll. Un estudio de respuesta a dosis sobre la susceptibilidad al weevil boll a estas toxinas *Bacillus turingiensis* fue llevada a cabo por incorporación de dieta (Stone et al., 1991). Una serie de tres a ocho concentraciones preparadas por dilución serial fue usada en cada instante. La primera larva instar fue infestada manualmente dentro de la dieta. Las medidas de mortalidad y peso fueron registradas 10 días después de la infestación. Las larvas que estuvieron muertas o que todavía estaban en un estado neonatal fueron consideradas muertas en la tabulación de respuesta larval a las proteínas individuales. Las regresiones concentración-mortalidad fueron estimadas asumiendo el modelo probit (SAS software 1995). Los registros de peso fueron usados para calcular las concentraciones efectivas usando un modelo de regresión no lineal (SAS 1995).

Sorprendentemente, el Cry22Aa también se encontró que tenía una toxicidad significativa para larva weevil boll comparable a aquella del CryET70 según se indicó en la tabla 11. Este es el primer reporte de que el Cry22Aa y el CryET70 tenían actividad contra la peste de insecto objetivo.

Tabla 11.

Bioensayo de weevil boll del algodón

Proteína	LC ₅₀ (µg/pozo)	EC ₅₀ (µg/pozo)
CryET70	3,12 (1,95-5,00)	1,92 ± 0,37
Cry22Aa	0,72 (0,022-1,70)	0,36 ± 0,18

La toxina codificada por el gen tIC851 tenía similitudes interesantes lo mismo que diferencias cuando se comparó con las toxinas codificadas por el CryET70 y el Cry22Aa. Tanto el CryET70 como el Cry22Aa tenían dentro de su secuencia primaria cuatro regiones repetidas de aproximadamente 80 aminoácidos cada una, alineadas de una manera de cabeza a cola. La secuencia del tIC851 mostró que la proteína tIC851 tenía solamente 3 de 4 "dominios repetidos" encontrados en el CryET70 y el Cry22Aa. Esto tiene en cuenta la mayoría de los 90

aminoácidos aproximadamente por el cual la secuencia codificadora del tIC851 es más corta que cualquiera de las CryET70 o Cry22Aa. A pesar de esta diferencia en la estructura el tIC851 tenía una actividad significativa sobre la larva weevilboll. La estructura modular novedosa de estas tres toxinas Bt deberían ser de valor en variantes de ingeniería semiracional que podrían ver incrementada su potencia o actividad de espectro.

5.8. Ejemplo 8 - plantas transgénicas que expresan el tIC851.

Uno o más transgénicos, cada uno conteniendo una secuencia de codificación estructural de la presente invención pueden ser insertados dentro del genoma de una planta por cualquier método adecuado tal como se detalla aquí. Los vectores de transformación de plantas adecuados incluyen aquellos derivados de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* lo mismo que aquellos descritos por Herrera-Estrella (1983), Bevan (1983), Klee (1985) y Eur. Pt. Appl. Publ. No. EP120516. Adicionalmente a los vectores de transformación de planta derivados a partir del Ti o de plásmidos reductores de raíz (Ri) de *agrobacterium*, métodos alternativos pueden ser usados

para insertar las construcciones de ADN de esta invención dentro de las células de la planta. Tales métodos pueden involucrar, por ejemplo, el uso de liposomas, electroporación, químicos que incrementan la toma libre de ADN, bombardeo con microprojectiles via suministro de Adn libre, y transformación usando virus o polen (Fromm et al., 1986; Armstrong et al., 1990; Fromm et al., 1990). Para la expresión eficiente de los polinucleótidos descritos aquí en plantas transgénicas, la región de secuencia seleccionada que codifica el polipéptido insecticida debe tener una composición de secuencia adecuada (Diehn et al., 1996).

La expresión de la proteína tIC851 a partir dentro de un vector de expresión de planta es entonces confirmada en los protoplastos de planta por electroporación dentro de los protoplastos seguido por el secado de proteína y el análisis ELISA. Este vector puede ser introducido dentro del ADN genómico de los embriones de planta tal como el algodón por bombardeo con pistola de partículas seguido por una selección de paromomicina para obtener plantas de algodón que expresan el gen Cry esencialmente como se describió en la patente estadounidense No. 5,424,412. Por ejemplo, la

153

transformación de la planta y el vector de expresión pueden ser introducidos vía el cobombardeo o resistencia a la hidromicina conferida por el plásmido dentro de la transformación susceptible del tejido de algodón, seguido por la selección de hidromicina, y regeneración. Las líneas de algodón transgénico que expresan en tIC851 pueden entonces ser identificadas por el análisis ELISA. La semilla de la progenie a partir de estos eventos puede entonces subsecuentemente ser ensayada en cuanto a protección de insectos susceptible.

Los polipéptidos de *Bacillus turingiensis* descritos aquí son principalmente localizados en el citoplasma de la planta de la célula, y esta localización citoplásmica resulta en plantas que son efectivas insecticidamente. Sin embargo, en ciertas modalidades, puede ser ventajoso dirigir el polipéptido de *Bacillus turingiensis* a otros compartimentos de la celda de la célula de la planta. Localizar las proteínas de *Bacillus turingiensis* en compartimentos distintos del citoplasma pueden resultar en una menor exposición de las proteínas del *Bacillus turingiensis* a las proteasas citoplásmicas que manejan a la mayor acumulación de proteínas que provocan un mejoramiento en la actividad insecticida.

155

Utilizando las secuencias SSU CTP para localizar las proteínas cristal en el cloroplasto puede también ser ventajoso. La localización de las proteínas de cristal de *Bacillus turingiensis* en el cloroplasto podría proteger a estos de las proteasas encontradas en el citoplasma. Estos podría estabilizar las proteínas y conllevar a mayores niveles de acumulación de la toxina activa. Los genes Cry que contienen el CTP pueden ser usados en combinación con los promotores SSU o con otros promotores tales como el CaMV35S.

La adición al tIC851 de la expresión en planta se describe aquí. Es específicamente el propósito que el Cry22Aa y CryET70 puedan ser usados solos o en combinación uno con otro o en combinaciones junto con tIC851 en plantas para proteger las plantas de la infestación del weevil boll y en particular las combinaciones para impedir el establecimiento de la resistencia a los weevil boll a cualquiera de las proteínas cuando se usa solo.

Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados aquí pueden ser hechos y ejecutados sin

experimentación adicional a la luz de la presente descripción. Mientras que las composiciones y métodos de esta invención han sido descritas en términos de modalidades preferidas, será evidente para aquellos versados en la técnica que variaciones pueden ser aplicadas a la composición, métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito aquí sin salirse del concepto, espíritu y alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que son tanto químicamente como fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos aquí mientras que los mismos o sus resultados similares se pueden lograr. Todos los sustitutos similares y modificaciones similares evidentes para aquellos versados en la técnica están dentro del alcance y espíritu y concepto de la invención según se define en las reivindicaciones adjuntas. De acuerdo a lo anterior, los derechos exclusivos buscados a ser patentados se describen en las reivindicaciones que siguen.

6.0. REFERENCIAS

Las siguientes referencias, al grado que muestran procedimientos u otros detalles suplementarios

ilustrativos a los aquí descritos, se incorporan a la presente como referencias.

Patente U.S 4,196,265, publicada Abril 1,1980.

Patente U.S 4,237,224, publicada Diciembre 2,1980.

Patente U.S 4,554,101, publicada Noviembre 19,1985.

Patente U.S 4,683,195, publicada Julio 28,1987.

Patente U.S 4,683,202, publicada Julio 28,1987.

Patente U.S 4,757,011, publicada Julio 12,1988.

Patente U.S 4,766,203, publicada Agosto 23,1988.

Patente U.S 4,769,061, publicada Septiembre 6,1988.

Patente U.S 4,771,131, publicada Septiembre 13,1988.

Patente U.S 4,797,279, publicada Enero 10, 1989.

Patente U.S 4,800,159, publicada Enero 24,1989.

Patente U.S 4,883,750, publicada Noviembre 28,1989.

Patente U.S 4,910,016, publicada Marzo 20,1990.

Patente U.S 4,940,835, publicada Febrero 23, 1990.

Patente U.S 4,943,674, publicada Julio 24,1990.

Patente U.S 4,965,188, publicada Octubre 23, 1990

Patente U.S 4,966,765, publicada Octubre 30, 1990.

Patente U.S 4,971,908, publicada Noviembre 20, 1990.

Patente U.S 4,987,071, publicada Enero 22, 1991.

Patente U.S 4,996,155, publicada Febrero 26, 1991.

Patente U.S 4,999,192, publicada Marzo 12, 1991.

Patente U.S 5,006,336, publicada Abril 9, 1991.
Patente U.S, 5,024,837 publicada Junio 18, 1991.
Patente U.S 5,055,293, publicada Octubre 8, 1991.
Patente U.S 5,055,294, publicada Octubre 8, 1991.
Patente U.S 5,097,025, publicada Marzo 17, 1992.
Patente U.S 5,106,739, publicada Abril 21, 1992.
Patente U.S 5,110,732, publicada Mayo 5, 1992.
Patente U.S 5,128,130, publicada Octubre 15, 1991.
Patente U.S 5,139,954, publicada Agosto 19, 1992.
Patente U.S 5,176,995, publicada Octubre 15, 1991.
Patente U.S 5,177,011, publicada Enero 5, 1993.
Patente U.S 5,187,091, publicada Octubre 15, 1991
Patente U.S 5,264,364, publicada Noviembre 23, 1993.
Patente U.S 5,286,486, publicada Febrero 15, 1994.
Patente U.S 5,334,711, publicada Agosto 2, 1994
Patente U.S 5,378,619, publicada Enero 3, 1995
Patente U.S 5,384,253, publicada Enero 24, 1995.
Patente U.S 5,401,836, publicada Marzo 28, 1995.
Patente U.S 5,436,393, publicada Julio 25, 1995.
Patente U.S 5,441,884, publicada Agosto 15, 1995.
Patente U.S 5,442,052, publicada Agosto 15, 1995.
Patente U.S 5,447,858, publicada Septiembre 5, 1995.
Patente U.S 5,459,252, publicada Octubre 17, 1995.
Patente U.S 5,491,288, publicada Febrero 13, 1996.

Patente U.S 5,504,200, publicada Abril 2, 1996.
Patente U.S 5,530,196, publicada Junio 25, 1996.
Patente U.S 5,538,897, publicada Julio 23, 1996.
Patente U.S 5,576,198, publicada Noviembre 19, 1996.
Patente U.S 5,589,583, publicada Diciembre 31, 1996.
Patente U.S 5,589,610, publicada Diciembre 31, 1996.
Patente U.S 5,589,614, publicada Diciembre 31, 1996.
Patente U.S 5,595,896, publicada Enero 21, 1997.
Patente U.S 5,608,144, publicada Marzo 4, 1997.
Patente U.S 5,614,399, publicada Marzo 25, 1997.
Patente U.S 5,631,359, publicada Mayo 20, 1997.
Patente U.S 5,633,363, publicada Mayo 27, 1997.
Patente U.S 5,633,439, publicada Mayo 27, 1997.
Patente U.S 5,633,440, publicada Mayo 27, 1997
Patente U.S 5,633,441, publicada Mayo 27, 1997
Patente U.S 5,646,333, publicada, Julio 8, 1997.
Patente U.S 5,659,124, publicada Agosto 19, 1997.
Patente U.S 5,689,040, publicada Noviembre 18, 1997.
Patente U.S 5,689,049, publicada Noviembre 18, 1997.
Patente U.S 5,689,051, publicada Noviembre 18, 1997.
Patente U.S 5,689,056, publicada Noviembre 18, 1997.
Patente U.S 5,700,922, publicada Diciembre 23, 1997.
Patente U.S 5,712,112, publicada Enero 27, 1998.

Patente U.S 4,996,155, publicada Febrero 26, 1991.

Patente U.S 4,996,155, publicada Febrero 26, 1991.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. PCT/us87/00880

Solic. de Pat. Internacional Public. No. PCT/US87/00880.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. PCT/US89/01025.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 84/02913.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 88/10315.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 89/06700.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 91/03162.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 92/07065.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 93/15187.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 93/23569.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 94/02595.

Solic. de Pat. Internacional Public. No. WO 94/13688.

Solic. De Pat. Europea public. No. EPO360257

Solic. De Pat. Europea public. No. EP 320,308.

Solic. De Pat. Europea public. No. EP 329,822.

Solic. De Pat. Europea public. No. 92110298,4.

Solic. De Pat. Británica public. No. GB 2,202,328.

Abdullah et al. , *Biotechnology*, 4: 1087, 1986.

Abbott, "A method for computing the effectiveness of an insecticide". *J Econ. Entomol.*

18:265-267, 1925.

Adelman et al., *DNA*, 2(3): 183-193, 1983.

- Allen and Choun, "Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system," *FEBS Lett.*, 223:42-46, 1987.
- Altschul, Stephen F. *et al.*, "Basic local alignment search tool," *J. Mol. Biol.*, 215:403-410, 1990.
- Armitage *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(23):12320-12325, 1997.
- Arvidson *et al.*, *Mol. Biol.*, 3:1533-1534, 1989.
- Baum *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:3420-3428, 1990.
- Baumlein, Boerjan, Nagy, Panitz, Inze, Wobus, "Upstream sequences regulating legumin gene expression in heterologous transgenic plants," *Mol. Gen. Genet.*, 225(1):121-128, 1991.
- Benbrook *et al.*, *In: Proceedings Bio Expo 1986*, Butterworth, Stoneham, MA, pp. 27-54, 1986.
- Berhnaard, *FEMS Microbiol. Lett.*, 33:261-265, 1986.
- Berna and Bernier, "Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco: oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein," *Plant Mol. Biol.*, 33(3):417-429, 1997.
- Boffa, Carpaneto, Allfrey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1901-1905, 1995.
- Boffa, Morris, Carpaneto, Louissaint, Allfrey, *J. Biol. Chem.*, 271:13228-13233, 1996.
- Bolivar *et al.*, *Gene*, 2:95, 1977.
- Boronat, Martinez, Reina, Puigdomenech, Palau, "Isolation and sequencing of a 28 kd gluteline-2 gene from maize: Common elements in the 5' flanking regions among zein and glutelin genes," *Plant Sci.*, 47:95-102, 1986.
- Brown and Whiteley, *J. Bacteriol.*, 174:549-557, 1992.
- Brussock and Currier, "Use of sodium dodecyl sulfate-polacryamide gel electrophoresis to quantify *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins," *In: Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*, L.A. Hickie and W.L. Fitch, (Eds), American Chemical Society, Washington DC, pp. 78-87, 1990.
- Bytebier *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:5345, 1987.
- Callis *et al.*, *Genes and Development*, 1:1183, 1987.

- Callis, Fromm, Walbot, "Introns increase gene expression in cultured maize cells," *Genes Devel.*, 1:1183-1200, 1987.
- Campbell, "Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology," Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Capecchi, "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells," *Cell*, 22(2):479-488, 1980.
- Carlsson *et al.*, *Nature*, 380:207, 1996.
- Cashmore *et al.*, *Gen. Eng. of Plants*, Plenum Press, New York, 29-38, 1983.
- Cech *et al.*, "In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of Tetrahymena: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence," *Cell*, 27:487-496, 1981.
- Chambers *et al.*, *J. Bacteriol.*, 173:3966-3976, 1991.
- Chang *et al.*, *Nature*, 375:615, 1978.
- Chau *et al.*, *Science*, 244:174-181, 1989.
- Chen *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20:4581-9, 1992.
- Cheng, Sardana, Kaplan, Altosaar, "Agrobacterium-transformed rice plants expressing synthetic cryIA(b) and cryIA(c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(6):2767-2772, 1998.
- Chowrira and Burke, *Nucl. Acids Res.*, 20:2835-2840, 1992.
- Christensen *et al.*, *J. Pept. Sci.*, 1(3):175-183, 1995.
- Christensen, Sharrock. Quail, "Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation," *Plant Mol. Biol.*, 18:675-689, 1992.
- Clapp, "Somatic gene therapy into hematopoietic cells. Current status and future implications," *Clin. Perinatol.*, 20(1):155-168, 1993.
- Collins and Olive, *Biochem.*, 32:2795-2799, 1993.
- Conway and Wickens, *In: RNA Processing*, p. 40, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Corey, *Trends Biotechnol.*, 15(6):224-229, 1997.

- Couvreux *et al.*, "Nanocapsules, a new lysosomotropic carrier." *FEBS Lett.*, 84:323-326, 1977.
- Couvreux, "Polyalkyleanoacrylates as colloidal drug carriers," *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 5:1-20, 1988.
- Crickmore *et al.*, *Abstr. 28th Annu. Meet. Soc. Invert. Pathol.*, Cornell University, Ithaca, NY, 1995.
- Cristou *et al.*, *Plant Physiol.*, 87:671-674, 1988.
- Curiel, Agarwal, Wagner, Cotten, "Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19):8850-8854, 1991.
- Curiel, Wagner, Cotten, Birnstiel, Agarwal, Li, Locchel, and Hu, "High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes," *Hum. Gen. Ther.*, 3(2):147-154, 1992.
- Daum, "Revision of two computer programs for probit analysis," *Bull. Entomol. Soc. Amer.*, 16:10-15, 1970.
- de Barjac, *In: Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, H. D. Burges, ed., Academic Press, London, 36-43, 1981.
- Dean *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 14(5):2229, 1986.
- Dennis, Gerlach, Pryor, Bennetzen, Inglis, Llewellyn, Sachs, Ferl. Peackocock, "Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase (*Adh1*) gene of maize." *Nucl. Acids Res.*, 12:3983-4000, 1984.
- Dhir, Dhir, Hepburn, Widholm, "Factors affecting transient gene expression in electroporated *Glycine-max* protoplasts," *Plant Cell Rep.*, 10(2):106-110, 1991a.
- Dhir, Dhir, Sturtevant, Widholm, "Regeneration of transformed shoots for electroporated soybean *Glycine-max* L. Merr. Protoplasts, *Plant Cell Rep.*, 10(2):97-101, 1991b.
- Donovan *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:3921-3927, 1992.
- Donovan *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 214:365-372, 1988.
- Dropulic *et al.*, *J. Virol.*, 66:1432-41, 1992.
- Dueholm *et al.*, *J. Org. Chem.*, 59:5767-5773, 1994.
- Egholm *et al.*, *Nature*, 365:566-568, 1993.
- Eglitis and Anderson, "Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells," *Biotechniques*, 6(7):608-614, 1988.

- Eglitis, Kantoff, Kohn, Karson, Moen, Lothrop, Blaise, Anderson, "Retroviral-mediated gene transfer into hemopoietic cells," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 241:19-27, 1988.
- Eichenlaub, *J. Bacteriol.*, 138(2):559-566, 1979.
- Elroy-Stein and Moss, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6743-7, 1990.
- English and Slatin, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22:1-7, 1992.
- Faktor, Kooter, Dixon, Lamb, "Functional dissection of a bean chalcone synthase gene promoter in transgenic tobacco plants reveals sequence motifs essential for floral expression," *Plant Mol. Biol.*, 32(5):849-859, 1996.
- Ficker, Kirch, Eijlander, Jacobsen, Thompson, "Multiple elements of the S2-RNase promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.) are required for cell type-specific expression in transgenic potato and tobacco," *Mol. Gen. Genet.*, 257(2):132-142, 1998.
- Fiers *et al.*, *Nature*, 273:113, 1978.
- Footer, Engholm, Kron, Coull, Matsudaira, *Biochemistry*, 35:10673-10679, 1996.
- Fraley *et al.*, *Biotechnology*, 3:629, 1985.
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:4803, 1983.
- French, Janda, Ahlquist, "Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plant cells," *Science*, 231:1294-1297, 1986.
- Frohman, *In: PCR™ Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 1990.
- Fromm, Taylor, Walbot, "Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(17):5824-5828, 1985.
- Fromm *et al.*, *Nature*, 319:791-793, 1986.
- Fujimura *et al.*, *Plant Tiss. Cult. Lett.*, 2:74, 1985.
- Fynan, Webster, Fuller, Haynes, Santoro, Robinson, "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(24):11478-11482, 1993.
- Gallie and Young, "The regulation of expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts," *Plant Physiol.*, 106:929-939, 1994.
- Gallie, Feder, Schimke, Walbot, "Post-transcriptional regulation in higher eukaryotes: the role of the reporter gene in controlling expression," *Mol. Gen. Genet.*, 228:258-264, 1991.

- Gallie, Lucas, Walbot, "Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation," *Plant Cell*, 1:301-311, 1989.
- Gallie, Sleat, Turner, Wilson, "Mutational analysis of the tobacco mosaic virus 5'-leader for altered ability to enhance translation," *Nucl. Acids Res.*, 16:883-893, 1988.
- Gallie, Sleat, Watts, Turner, Wilson, "A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo*," *Nucl. Acids Res.*, 15:8693-8711, 1987b.
- Gallie, Sleat, Watts, Turner, Wilson, "The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*," *Nucl. Acids Res.*, 15:3257-3273, 1987a.
- Gambacorti-Passerini *et al.*, *Blood*, 88:1411-1417, 1996.
- Gao and Huang, *Nucl. Acids Res.*, 21:2867-72, 1993.
- Gawron-Burke and Baum, *Genet. Eng.*, 13:237-263, 1991.
- Gefter *et al.*, *Somat. Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Gehrke, Auron, Quigley, Rich, Sonenberg, "5'-Conformation of capped alfalfa mosaic virus ribonucleic acid 4 may reflect its independence of the cap structure or of cap-binding protein for efficient translation," *Biochemistry*, 22:5157-5164, 1983.
- Genovese and Milcarek, *In: RNA Processing*, p. 62, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Gil and Proudfoot, *Nature*, 312:473, 1984.
- Gill *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:27277-27282, 1995.
- Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice," pp. 60-74. 2nd Edition, Academic Press, Orlando, FL, 1986.
- Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544, 1979.
- Goeddel *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 8:4057, 1980.
- Goelet, Lomonossoff, Butler, Akam, Gait, Karn, "Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:5818-5822, 1982.
- Gonzalez Jr. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 79:6951-6955, 1982.
- Good and Nielsen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 7(4):431-437, 1997.

- Graham, Craig, Waterhouse, "Expression patterns of vascular-specific promoters ROIC and Sh in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants," *Plant Mol. Biol.*, 33(4):729-735, 1997.
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J., "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5," *Virology*, 54(2):536-539, 1973.
- Green, *Nucl. Acids Res.*, 16(1):369, 1988.
- Griffith *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 117:831-832, 1995.
- Grochulski *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 254:447-464, 1995.
- Grosset, Alary, Gautier, Menossi, Martinez-Izquierdo, Joudrier, "Characterization of a barley gene coding for an alpha-amylase inhibitor subunit (Cmd protein) and analysis of its promoter in transgenic tobacco plants and in maize kernels by microprojectile bombardment," *Plant Mol. Biol.*, 34(2):331-338, 1997.
- Guerrier-Takada *et al.*, *Cell*, 35:849, 1983.
- Hasima, Lohse, Buchardt, Nielsen, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 35:1939-1942, 1996.
- Hampel and Tritz, *Biochem.*, 28:4929, 1989.
- Hampel *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:299, 1990.
- Hanvey *et al.*, *Science*, 258:1481-1485, 1992.
- Harlow and Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Henry-Michelland *et al.*, "Attachment of antibiotics to nanoparticles; Preparation, drug-release and antimicrobial activity *in vitro*," *Int. J. Pharm.*, 35:121-127, 1987.
- Herrnstadt *et al.*, *Bio/Technology*, 4:305-308, 1986.
- Herrnstadt *et al.*, *Gene*, 57:37-46, 1987.
- Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149, 1968.
- Hess, *Intern Rev. Cytol.*, 107:367, 1987.
- Hilber, Bodmer, Smith, Koller, "Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*," *Curr. Genet.*, 25(2):124-127, 1994.
- Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980.
- Höfte and Whiteley, *Microbiol. Rev.*, 53:242-255, 1989.
- Höfte *et al.* *Nucl. Acids Res.*, 15:7183, 1987.
- Holland *et al.*, *Biochemistry*, 17:4900, 1978.

- Honee *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 5:2799-2806, 1991.
- Hoover *et al.*, (Eds.), "Remington's Pharmaceutical Sciences," 15th Edition, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1975.
- Horsch, Fry, Hoffmann, Eichholtz, Rogers, Fraley, "A simple and general method for transferring genes into plants," *Science*, 227(4691):1229-1231, 1985.
- Horton *et al.*, *Gene*, 77:61-68, 1989.
- Huang, An, McDowell, McKinney, Meagher, "The *Arabidopsis* ACT11 action gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen and developing ovules," *Plant Mol. Biol.*, 33(1):125-139, 1997.
- Hudspeth and Grula, "Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis," *Plant Mol. Biol.*, 12:579-589, 1989.
- Hyrup and Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.*, 1996.
- Ingelbrecht, Herman, Dekeyser, Van Montagu, Depicker, "Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells," *Plant Cell*, 1:671-680, 1989.
- Itakura *et al.*, *Science*, 198:1056, 1977.
- Jaeger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7706-7710, 1989.
- Jameson and Wolf, "The Antigenic Index: A Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants," *Compu. Appl. Biosci.*, 4(1):181-6, 1988.
- Jensen *et al.*, *Biochemistry*, 36(16):5072-5077, 1997.
- Jobling and Gehrke, "Enhanced translation of chimaeric messenger RNAs containing a plant viral untranslated leader sequence," *Nature*, 325:622-625, 1987.
- Johnston and Tang, "Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization." *Methods Cell. Biol.*, 43(A):353-365, 1994.
- Jones, Dean, Gidoni, Gilbert, Bond-Nutter, Lee, Bedbrook, Dunsmuir, "Expression of bacterial chitinase protein in tobacco leaves using two photosynthetic gene promoters," *Mol. Gen. Genet.*, 212:536-542, 1988.
- Jones, *Genetics*, 85:12 1977.
- Jorgensen *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 207:471, 1987.
- Joshi, "An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes," *Nucl. Acids Res.*, 15:6643-6653, 1987.

- Kaiser and Kezdy, *Science*, 223:249-255, 1984.
- Kashani-Saber *et al.*, *Antisense Res. Dev.*, 2:3-15, 1992.
- Keller *et al.*, *EMBO J.*, 8:1309-14, 1989.
- Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141, 1979.
- Klee, Yanofsky, Nester, "Vectors for transformation of higher plants," *Bio-Technology*, 3(7):637-642, 1985.
- Klein *et al.*, *Nature*, 327:70, 1987.
- Klein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8502-8505, 1988.
- Knight *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:17765-17770, 1995.
- Koch *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 36:6933-6936, 1995.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495-497, 1975.
- Koppelhus, *Nucleic Acids Res.*, 25(11):2167-2173, 1997.
- Korn and Queen, *DNA*, 3:421-436, 1984.
- Kozak, *Nature*, 308:241-246, 1984.
- Kozziel, Beland, Bowman, Carozzi, Crenshaw, Crossland, Dawson, Desai, Hill, Kadwell, Launis, Lewis, Maddox, McPherson, Meghji, Merlin, Rhodes, Warren, Wright, Evola, "Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*, *Bio/technology*, 11:194-200, 1993.
- Kozziel, Carozzi, Desai, "Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events," *Plant Mol. Biol.*, 32(102):393-405, 1996.
- Kozziel, Fujimoto, Izawa, Shimamoto, "Anaerobic induction and tissue
- Kremsky *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 37:4313-4316, 1996.
- Krieg *et al.*, *AnzSchaed. lingskde. Pflanzenschutz. Umweltschutz*, 57:145-150, 1984.
- Krieg *et al.*, *In: Zangew. Ent.*, 96:500-508, 1983.
- Krieg *et al.*, *J. Appl. Ent.*, 104:417-424, 1987.
- Kuby, "Immunology" 2nd Edition. W. H. Freeman & Company, New York, 1994.
- Kunkel, Roberts, Zakour, "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection," *Methods Enzymol.*, 154:367-382, 1987.
- Kwoh, Davis, Whitfield, Chappelle, DiMichele, Gingeras, "Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-

- based sandwich hybridization format," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(4):1173-1177, 1989.
- Kyozuka, Fujimoto, Izawa, Shimamoto, "Anaerobic induction and tissue-specific expression of maize *Adh1* promoter in transgenic rice plants and their progeny," *Mol. Gen. Genet.*, 228(1-2):40-48, 1991.
- Kyte and Doolittle, "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein," *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- L'Huillier *et al.*, *EMBO J.*, 11:4411-8, 1992.
- Ladd Jr., *J. Econ. Entomol.*, 79:00668-671, 1986.
- Lambert *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2536-2642, 1992b.
- Lambert *et al.*, *Gene*, 110:131-132, 1992a.
- Landsdorp *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 5:685-691, 1996.
- Langridge *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3219-3223, 1989.
- Lee *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 216:306-312, 1995.
- Lieber *et al.*, *Methods Enzymol.*, 217:47-66, 1993.
- Lindstrom *et al.*, *Developmental Genetics*, 11:160, 1990.
- Liszewicz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:8000-4, 1993.
- Lorz *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:178, 1985.
- Lu. Xiao, Clapp, Li, Broxmeyer, "High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34(3+) hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood," *J. Exp. Med.*, 178(6):2089-2096, 1993.
- Luehrsen and Walbot, "Intron enhancement of gene expression and the splicing efficiency of introns in maize cells," *Mol. Gen. Genet.*, 225:81-93, 1991.
- Luo *et al.*, *Plant Mol. Biol. Reporter*, 6:165, 1988.
- Lutcke, Chow, Mickel, Moss, Kern, Scheele, "Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals," *EMBO J.*, 6:43-48, 1987.
- Maas, Laufs, Grant, Korfhage, Werr, "The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize *shrunk-1* gene with the following intron enhances reporter gene expression 1000-fold," *Plant Mol. Biol.*, 16:199-207, 1991.
- Macaluso and Mettus, *J. Bacteriol.*, 173:1353-1356, 1991.

- Maddock *et al.*, *Third International Congress of Plant Molecular Biology*, Abstract 372, 1991.
- Maloy, "Experimental Techniques in Bacterial Genetics" Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, 1990.
- Maloy *et al.*, "Microbial Genetics" 2nd Edition. Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA, 1994.
- Maniatis *et al.*, "Molecular Cloning: a Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1982.
- Marcotte *et al.*, *Nature*, 335:454, 1988.
- Mascarenhas, Mettler, Pierce, Lowe, "Intron mediated enhancement of heterologous gene expression in maize," *Plant Mol. Biol.*, 15:913-920, 1990.
- Masson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:20309-20315, 1995.
- McBride, Svab, Schaaf, Hogan, Stalker, Maliga, "Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco," *Bio/technology*, 13:362-365, 1995.
- McCabe *et al.*, *Biotechnology*, 6:923, 1988.
- McDevitt *et al.*, *Cell*, 37:993-999, 1984.
- McElroy, Zhang, Wu, "Isolation of an efficient promoter for use in rice transformation," *Plant Cell*, 2:163-171, 1990.
- McPherson *et al.*, *Bio/Technology*, 6:61-66, 1988.
- Mettus and Macaluso, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1128-1134, 1990.
- Michael, *Biotechniques*, 16:410-412, 1994.
- Mollegaard, Buchardt, Egholm, Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3892-3895, 1994.
- Nawrath, Poirier, Somerville, "Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:12760-12764, 1994.
- Neilsen, *In: Perspectives in Drug Discovery and Design 4*, Escom Science Publishers, pp. 76-84, 1996.
- Neuhaus *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 75:30, 1987.
- Nielsen *et al.*, *Anticancer Drug Des.*, 8(1):53-63, 1993b.
- Nielsen, Egholm, Berg, Buchardt, *Science*, 254:1497-1500, 1991.

- Norton *et al.*, *Plasmid*, 13:211-214, 1985.
- Norton, Piatyszek, Wright, Shay, Corey, *Nat. Biotechnol.*, 14:615-620, 1996.
- Norton, Waggenspack, Varnum, Corey, *Bioorg. Med. Chem.*, 3:437-445, 1995.
- Oard, Paige, Dvorak, "Chimeric gene expression using maize intron in cultured cells of breadwheat," *Plant Cell. Rep.*, 8:156-160, 1989.
- Odell *et al.*, *Nature*, 313:810, 1985.
- Ohkawa, Yuyama, Taira, "Activities of HIV-RNA targeted ribozymes transcribed from a 'shot-gun' type ribozyme-trimming plasmid," *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 27:15-6, 1992.
- Ojwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10802-6, 1992.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21:415-428, 1993.
- Orum, Nielsen, Egholm, Berg, Buchardt, Stanley, *Nucl. Acids Res.*, 21:5332-5336, 1993.
- Orum, Nielsen, Jorgensen, Larsson, Stanley, Koch, *BioTechniques*, 19:472-480, 1995.
- Pandey and Marzluff, *In "RNA Processing,"* p. 133, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1987.
- Pardridge, Boado, Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:5592-5596, 1995.
- Pena *et al.*, *Nature*, 325:274, 1987.
- Perlak, Deaton, Armstrong, Fuchs, Sims, Greenplate, Fischhoff, "Insect resistant cotton plants," *Bio/Technology*, 8:939-943, 1990.
- Perlak, Fuchs, Dean, McPherson, Fischhoff, "Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:3324-3328, 1991.
- Perlak, Stone, Muskopf, Peterson, Parker, McPherson, Wyman, Love, Reed, Biever, Fischhoff, "Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles," *Plant Mol. Biol.*, 22:313-321, 1993.
- Perrault *et al.*, *Nature*, 344:565, 1990.
- Perrotta and Been, *Biochem.*, 31:16, 1992.
- Perry-O'Keefe, Yao, Coull, Fuchs, Egholm, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:14670-14675, 1996.
- Petersen, Jensen, Egholm, Nielsen, Buchardt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5:1119-1124, 1995.
- Picken *et al.*, *Science*, 253:314, 1991.

- Poogin and Skryabin, "The 5' untranslated leader sequence of potato virus X RNA enhances the expression of the heterologous gene *in vivo*," *Mol. Gen. Genet.*, 234:329-331, 1992.
- Poszkowski *et al.*, *EMBO J.*, 3:2719, 1989.
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199:183, 1985.
- Poulsen *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 205:193-200, 1986.
- Prokop and Bajpai, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 646, 1991.
- Rogers *et al.*, In: *Methods For Plant Molecular Biology*. Weissbach and Weissbach, eds., Academic Press Inc., San Diego, CA 1988.
- Rogers *et al.*, *Methods Enzymol.*, 153:253-277, 1987.
- Rose, *Anal. Chem.*, 65(24):3545-3549, 1993.
- Rossi *et al.*, *Aids Res. Hum. Retrovir.*, 8:183, 1992.
- Rupar *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:3337-3344, 1991.
- Ruskowski *et al.*, *Cancer*, 80(12 Suppl):2699-2705, 1997.
- Russell and Fromm, "Tissue-specific expression in transgenic maize for four endosperm promoters from maize and rice," *Transgenic Res.*, 6(2):157-168, 1997.
- Sadofsky and Alwine, *Mol. Cell. Biol.*, 4(8):1460-1468, 1984.
- Sambrook *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, NY, 1989a.
- Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989b.
- Sanger *et al.*, "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 74(12):5463-5467, 1977.
- Saville and Collins, *Cell*, 61:685-696, 1990.
- Saville and Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8826-8830, 1991.
- Scanlon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:10591-5, 1991.
- Scaringe *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433-5441, 1990.
- Seeger *et al.*, *Biotechniques*, 23(3):512-517, 1997.
- Segal, "Biochemical Calculations" 2nd Edition. John Wiley & Sons, New York, 1976.
- Sekar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7036-7040, 1987.
- Shaw and Kamen, *Cell*, 46:659-667, 1986.

- Shaw and Kamen, *In: "RNA Processing"*, p. 220, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1987.
- Sick *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:1305, 1990.
- Simpson, *Science*, 233:34, 1986.
- Sleat, Gallie, Jefferson Bevan, Turner, Wilson, "Characterization of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation *in vitro*," *Gene*, 217:217-225, 1987.
- Sleat, Hull, Turner, Wilson, "Studies on the mechanism of translational enhancement by the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA," *Eur. J. Biochem.*, 175:75-86, 1988.
- Southern, *J. Mol. Biol.*, 98:503-517, 1975.
- Spielmann *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 205:34, 1986.
- Stetsenko, Lubyako, Potapov, Azhikina, Sverdlov, *Tetrahedron Lett.*, 37:3571-3574, 1996.
- Stone *et al.*, Insect rearing and the development of bioengineered crops. In T.E. Anderson & N.C. Leppla [eds]. *Advances in insect rearing for research and pest management*. West-view, Boulder, CO. 1991.
- Taira *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19:5125-30, 1991.
- Tanaka, Mita, Ohta, Kyojuka, Shimamoto, Nakamura, "Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron." *Nucl. Acids Res.*, 18:6767-6770, 1990.
- Thiede, Bayerdorffer, Blasczyk, Wittig, Neubauer, *Nucleic Acids Res.*, 24:983-984, 1996.
- Thisted, Just, Petersen, Hyldig-Nielsen, Godtfredsen, *Cell Vision*, 3:358-363, 1996.
- Thomson *et al.*, *Tetrahedron*, 51:6179-6194, 1995.
- Tomic, Sunjevaric, Savtchenko, Blumenberg, "A rapid and simple method for introducing specific mutations into any position of DNA leaving all other positions unaltered," *Nucl. Acids Res.*, 18(6):1656, 1990.
- Toriyama *et al.*, *Theor Appl. Genet.*, 73:16, 1986.
- Treacy, Hattori, Prud'homme, Barbour, Boutilier, Baszczynski, Huang, Johnson, Miki, "Bnm1, a *Brassica* pollen-specific gene," *Plant Mol. Biol.*, 34(4):603-611, 1997.
- Uchimiya *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 204:204, 1986.

274

- Ulmann, Will, Breipohl, Langner, Rytte, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 35:2632-2635, 1996.
- Upender, Raj, Weir, "Megaprimer method for *in vitro* mutagenesis using parallel templates," *Biotechniques*, 18:29-31, 1995.
- Usman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845-7854, 1987.
- Usman and Cedergren, *TIBS*, 17:34, 1992.
- Van Camp, Herouart, Willekens, Takahashi, Saito, Van Montagu, Inze, "Tissue-specific activity of two manganese superoxide dismutase promoters in transgenic tobacco," *Plant Physiol.*, 112(2):525-535, 1996.
- Van Tunen *et al.*, *EMBO J.*, 7:1257, 1988.
- Vander, Van Montagu, Inze, Boerjan, "Tissue-specific expression conferred by the S-adenosyl-L-methionine synthetase promoter of *Arabidopsis thaliana* in transgenic poplar," *Plant Cell Physiol.*, 37(8):1108-1115, 1996.
- Vasil *et al.*, "Herbicide-resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus," *Biotechnology*, 10:667-674, 1992.
- Vasil, *Biotechnology*, 6:397, 1988.
- Vasil, Clancy, Ferl, Vasil, Hannah, "Increased gene expression by the first intron of maize *shrunk-1* locus in grass species," *Plant Physiol.*, 91:1575-1579, 1989.
- Velten *et al.*, *EMBO J.*, 3:2723-2730, 1984.
- Velten and Schell, *Nucl. Acids Res.*, 13:6981-6998, 1985.
- Ventura *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21:3249-55, 1993.
- Veselkov, Demidov, Nielsen, Frank-Kamenetskii, *Nucl. Acids Res.*, 24:2483-2487, 1996.
- Vickers, Griffith, Ramasamy, Risen, Freier, *Nucl. Acids Res.*, 23:3003-3008, 1995.
- Vodkin *et al.*, *Cell*, 34:1023, 1983.
- Vogel, Dawe, Freeling, "Regulation of the cell type-specific expression of maize *Adhl* and *Shl* electroporation-directed gene transfer into protoplasts of several maize tissues," *J. Cell. Biochem.*, (Suppl. 0) 13:Part D, 1989.
- Wagner *et al.*, "Coupling of adenovirus to transferrin-polylysine/DNA complexes greatly enhances receptor-mediated gene delivery and expression of transfected genes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(13):6099-6103, 1992.
- Walker, Little, Nadeau, Shank, "Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(1):392-396, 1992.

175

- Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, 118:7667-7670, 1996.
- Watson, "Fluid and electrolyte disorders in cardiovascular patients," *Nurs. Clin. North Am.*, 22(4):797-803, 1987.
- Webb and Hurskainen, *J. Biomol. Screen.*, 1:119-121, 1996.
- Weerasinghe *et al.*, *J. Virol.*, 65:5531-4, 1991.
- Weissbach and Weissbach, *Methods for Plant Molecular Biology*. (eds.), Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1988.
- Wenzler *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 12:41-50, 1989.
- Wickens and Stephenson, *Science*, 226:1045, 1984.
- Wickens *et al.*, In: "RNA Processing," p. 9, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1987.
- Wilson, Flint, Deaton, Fischhoff, Perlak, Armstrong, Fuchs, Berberich, Parks, Stapp, "Resistance of cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin to pink bollworm (Lepidopteran: *Gelechiidae*) and other insects," *J. Econ. Entomol.*, 4:1516-1521, 1992.
- Wolf *et al.*, *Compu. Appl. Biosci.*, 4(1):187-91 1988.
- Wong and Neumann, "Electric field mediated gene transfer." *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 107(2):584-587, 1982.
- Woolf *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7305-7309, 1992.
- Wu and Dean, "Functional significance of loops in the receptor binding domain of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA delta-endotoxin," *J. Mol. Biol.*, 255(4):628-640, 1996.
- Yamada *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 4:85, 1986.
- Yang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4144-48, 1990.
- Yin, Chen, Beachy, "Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice," *Plant J.*, 12(5):1179-1188, 1997b.
- Yin, Zhu, Dai, Lamb, Beachy, "RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development," *EMBO J.*, 16(17):5247-5259, 1997a.
- Yu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6340-4, 1993.

Zatloukal, Wagner, Cotten, Phillips, Plank, Steinlein, Curiel, Birnstiel, "Transferrinfection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660:136-153, 1992.

Zhou *et al.*, *Methods Enzymol.*, 101:433, 1983.

Zhou *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:4529-37, 1990.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado y purificado que comprende la secuencia de aminoácido según se estableció en la SEC ID NO:8.
2. El polipéptido de la reivindicación 1 que exhibe actividad insecticida cuando es suministrado oralmente a una larva de insectos susceptible.
3. El polipéptido de la reivindicación 2 que exhibe actividad insecticida cuando se suministra en una dieta administrable oralmente a una larva de insecto coleóptero.
4. El polipéptido de la reivindicación 3 en donde dicha larva de insecto es una larva de weel boll de algodón.
5. El polipéptido de la reivindicación 1 codificado por la secuencia de ácido nucleico comprende por lo menos la estructura de lectura abierta según se establece en la SEC ID NO:7 a partir de la

128

posición 28 del nucleótido hasta la posición 1923 del nucleótido.

6. Una composición que comprende una cantidad efectiva insecticidamente del polipéptido de la reivindicación 1 cuando dicha composición es una célula bacterial que comprende una secuencia polinucleótida que codifica dicho polipéptido, dicha composición es seleccionada a partir del grupo que consiste de un extracto de célula, una suspensión de células, un homogenato de célula, un lisato de célula, un supernadante de célula, un filtrado de célula, o bolitas de células.
7. La composición de la reivindicación 6 en donde dicha célula bacteria es una especie bacterial seleccionada a partir del grupo que consiste de bacillus, escherichia, Salmonella, Agrobacterium, y Pseudomonas.
8. La composición de la reivindicación 7 en donde dicha célula bacterial se selecciona a partir del grupo que consiste de EG4135 y EG4268.

/ 29

9. Una composición que comprende una cantidad insecticidamente efectiva del polipéptido de la reivindicación 1 en donde dicha composición está formulada como un polvo, partículas, gránulos, rociado, emulsión, coloide o solución.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, preparada por la disección, liofilización, homogenización, extracción, filtración, centrifugación, sedimentación, o concentración.
11. La composición de la reivindicación 10 en donde dicho polipéptido está presente en una concentración de entre 0,001% a 99% en peso.
12. Una secuencia de polinucleótido purificada y aislada que codifica el polipéptido de SEC ID NO:8.
13. La secuencia de polinucleótido de la reivindicación 12 en donde dicho polipéptido exhibe actividad insecticida cuando se suministra oralmente a una larva de insecto susceptible.

/80

14.La secuencia de polinucleótido de la reivindicación 13 en donde dicho polipéptido exhibe actividad insecticida cuando se suministra en una dieta administrable oralmente o composición a una larva de insecto de coleóptero.

15.La secuencia de polinucleótido de la reivindicación 14 en donde dicha larva de insecto es una larva de weevil boll del algodón.

16.La secuencia de polinucleótido que es o está complementaria a la secuencia de polinucleótido de la reivindicación 15 y que hibridiza bajo condiciones estrictas a una secuencia de polinucleótido complementaria o codifica el polipéptido como se establece en la SEC ID NO:8.

17.Un método para proteger una planta de algodón de la infestación del weevil boll que comprende suministrar a un weevil boll en su dieta una planta transformada para expresar una proteína tóxica a dicho weevil en donde dicha proteína es expresada en cantidades suficientes en dichos tejidos de planta para controlar la infestación

del weevil boll y en donde dicha proteína se selecciona a partir del grupo que consiste de Cry22Aa, ET70, y tIC851.

18.Un método para proteger una planta de algodón de la infestación del weevil boll que comprende suministrar a un weevil boll en su dieta una planta o tejido de planta transformada para expresar una o más proteínas tóxicas a dicho weevil en donde dichas proteínas son expresadas en cantidades suficientes solas o en combinación para controlar la infestación de weevil boll y en donde dichas proteínas se seleccionan a partir del grupo que consiste de Cry22Aa, ET70, y tIC851.

19.Un vector para ser usado en la transformación de una célula huésped, en donde dicho vector comprende una secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido como se estableció en la SEC ID NO:8.

20.El vector de la reivindicación 19, en donde dicho vector es el plásmido pIC117501.

21.El vector de la reivindicación 19, en donde dicha célula huésped se selecciona a partir del grupo que consiste de una célula de planta y una célula bacterial.

22.Un tejido de planta transformado con una secuencia de polinucleótido que expresa el polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho tejido se selecciona a partir del grupo que consiste de una célula de planta, un tejido de planta embriónica, un tallo de planta, una hoja, un tallo de planta, una raíz de planta, una flor de planta, un fruto, un cuerpo de fruto, un boll y una semilla de planta.

23.El tejido de planta de la reivindicación 22 en donde dicho tejido comprende dicho polipéptido presente en una cantidad efectiva inhibitoria de insectos coleópteros.

24.El tejido de planta de la reivindicación 23 en donde dicho insecto coleóptero es un weevil boll del algodón.

25.El tejido de planta de la reivindicación 22 seleccionado a partir del grupo de plantas que consiste de maíz, trigo, algodón, soja, avena, arroz, sorgo, caña de azúcar, tomate, tabaco, kapok, flax, papa, barley, pasto turf, pasto de pastura, bosque de cerezas, árboles frutales, legumbres, vegetales, plantas ornamentales, shrub, cactus, suculentos, árbol de deciduos, y arboles siempreverdes.

26.Un método de hacer una planta transgénica resistente a la infestación de insectos coleópteros comprende incorporar dentro de un genoma de una célula de planta un polinucleótido que comprende por lo menos un promotor funcional de planta operablemente enlazado a una secuencia nucleótida que codifica el polipéptido de la SEC ID NO:8, aislar y propagar una célula de planta transformada con dicho polinucleótido, regenerar una planta a partir e dicha célula de planta transformada con dicho polinucleótido, y propagar dicha planta a partir de progenie, en donde dicha planta expresa una cantidad efectiva

insecticidamente de dicho polipéptido a partir de dicho polinucleótido.

27.El método de la reivindicación 26 en donde dicha célula de planta es una célula e planta monocotiledónea o dicotiledónea.

28.El método de la reivindicación 27 en donde dicha célula de planta monocotiledónea se selecciona a partir del grupo de células de plantas que consiste de maíz, trigo, rye, barley, arroz, banana, caña de azúcar, avena, flax, pasto turf, pasto de pastura, y células de sorgo.

29.El método de la reivindicación 27 en donde dicha célula de planta dicotiledónea se selecciona a partir del grupo de células de planta que consisten de algodón, soja, cáñula, papa, tomate, árbol frutal, shrub, vegetales, y células de mora.

30.Un anticuerpo aislado y purificado que se enlaza específicamente al péptido como se establece en la SEC ID NO:8 o a un epítipo de él, dicho

anticuerpo producido por el sistema inmune de un vertebrado en respuesta a la exposición de todos o una parte antigénica de dicho péptido al sistema inmune del animal.

31. Un método para detectar la presencia de un péptido como se establece en la SEC ID NO:8 en una muestra que comprende obtener una solución sospechosa de contener dicho péptido, probar dicha solución con un anticuerpo de la reivindicación 30, y detectar el enlace de dicho anticuerpo a dicho péptido.

32. Un kit para detectar la presencia del péptido de la SEC ID NO:8 en una muestra que comprende, un medio contenedor adecuado, un anticuerpo que enlaza con dicho péptido, reactivos necesarios para mezclar el péptido y el anticuerpo en una solución y, por lo menos un primer reactivo de inmunodetección suministrado por dicho anticuerpo junto con anticuerpo de control, antígeno control, y reactivos e instrucciones necesarias para detectar dicho enlace.

33. Un método para reducir una infestación de peste de insectos coleópteros en un campo de plantas de crecimiento de cosecha que comprende suministrar una serie de células de planta transformadas con una secuencia de polinucleótida que expresa uno o más de los polipéptidos que se establecen en la SEC ID NO:2, SEC ID NO:8, y SEC ID NO:10 o fragmentos insecticidas de los mismos a una peste de insectos coleópteros, en donde dichas células producen una cantidad de dicho uno o más polipéptidos efectivos para reducir dicha infestación de peste de insecto coleóptero.

34. El método de la reivindicación 33 en donde dicha peste de insecto coleóptero es un weevil boll de algodón y dichas células de planta son células de planta de algodón.

RESUMEN

Un gen novedoso que codifica una proteína de cristal insecticida inhibitoria de *Bacillus turingiensis* de los coleópteros se describe. La proteína, tIC851, es activa insecticidamente y suministra a la planta protección por lo menos del weevil boll del algodón, *Anthonomus grandis*, cuando se aplica a las plantas en una composición insecticidamente efectivamente.

SEQUENCE LISTING

110> Monsanto Company
 Isaac, Barbara
 Joyce, Elysia
 Mettus, Anne-Marie
 Moshiri, Farhad
 Sivasupramaniam, Sakuntala

120> POLYPEPTIDE COMPOSITIONS TOXIC TO ANTHONOMUS INSECTS, AND METHODS OF
 SE

130> 38-21(51932)

150> 60/204,367

151> 2000-05-15

160> 22

170> PatentIn version 3.0

210> 1
 211> 2148
 212> DNA
 213> Bacillus thuringiensis

220>
 221> CDS
 222> (1)..(2148)

400> 1

tg aaa gat tca att tca aag gga tat gat gaa ata aca gtg cag gca	48
at Lys Asp Ser Ile Ser Lys Gly Tyr Asp Glu Ile Thr Val Gln Ala	
5 10 15	
gt gat tat att gat att tca att ttt caa acg aat gga tct gca aca	96
ar Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Ile Phe Gln Thr Asn Gly Ser Ala Thr	
20 25 30	
tt aat tca acc act att aca act tta acg caa gct aca aat agt caa	144
ne Asn Ser Thr Thr Ile Thr Thr Leu Thr Gln Ala Thr Asn Ser Gln	
35 40 45	
cg gga gca att ggg aag aca gct tta gat atg aga cat gat ttt act	192
la Gly Ala Ile Gly Lys Thr Ala Leu Asp Met Arg His Asp Phe Thr	
50 55 60	
tt aga gct att ttt ctt gga act aaa agt aat gga gca gat ggt att	240
ne Arg Ala Ile Phe Leu Gly Thr Lys Ser Asn Gly Ala Asp Gly Ile	
70 75 80	
cg ata gca ttt cat aga gga tca att ggt ttt gtt ggg gag aag ggt	288
la Ile Ala Phe His Arg Gly Ser Ile Gly Phe Val Gly Glu Lys Gly	
85 90 95	
ja gga ggg att tta ggc gcc cta aaa ggt ata gga ttt gaa tta gac	336
ly Gly Gly Ile Leu Gly Ala Leu Lys Gly Ile Gly Phe Glu Leu Asp	
100 105 110	
ja tat gcg aat gct cct caa gat gaa caa gga gat tct ttt gga cat	384
ar Tyr Ala Asn Ala Pro Gln Asp Glu Gln Gly Asp Ser Phe Gly His	

115	120	125	
gga gca atg aga ggc cta ttc cct ggt ttc cca aat gga tat cca cat Gly Ala Met Arg Gly Leu Phe Pro Gly Phe Pro Asn Gly Tyr Pro His 130 135 140			432
gct ggt ttt gta agt acg gat aaa aat aga ggt tgg tta tct gcc tta Ala Gly Phe Val Ser Thr Asp Lys Asn Arg Gly Trp Leu Ser Ala Leu 145 150 155 160			480
gct cag atg cag cga ata gct gct cca aat ggg cgt tgg aga cgt ctg Ala Gln Met Gln Arg Ile Ala Ala Pro Asn Gly Arg Trp Arg Arg Leu 165 170 175			528
gcg att cat tgg gat gct cgc aat aaa aaa tta act gca aac ctt gag Ala Ile His Trp Asp Ala Arg Asn Lys Lys Leu Thr Ala Asn Leu Glu 180 185 190			576
gat tta act ttt aat gat tca acg gta tta gtg aaa cca cgt act cca Asp Leu Thr Phe Asn Asp Ser Thr Val Leu Val Lys Pro Arg Thr Pro 195 200 205			624
aga tat gca aga tgg gag tta tca aat cct gca ttt gaa ctt gat caa Arg Tyr Ala Arg Trp Glu Leu Ser Asn Pro Ala Phe Glu Leu Asp Gln 210 215 220			672
aag tat act ttt gtt att ggt tca gcg acg ggt gca tct aat aac cta Lys Tyr Thr Phe Val Ile Gly Ser Ala Thr Gly Ala Ser Asn Asn Leu 225 230 235 240			720
cat cag att ggt att ata gaa ttt gat gca tac ttt act aaa ccg aca His Gln Ile Gly Ile Ile Glu Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Lys Pro Thr 245 250 255			768
ata gag gcg aat aat gta agt gtt ccg gtg gga gca aca ttt aat ccg Ile Glu Ala Asn Asn Val Ser Val Pro Val Gly Ala Thr Phe Asn Pro 260 265 270			816
aaa aca tat cca gga ata aat tta aga gca act gat gaa ata gat ggt Lys Thr Tyr Pro Gly Ile Asn Leu Arg Ala Thr Asp Glu Ile Asp Gly 275 280 285			864
gat ttg aca tct gaa att att gtg aca gat aat aat gtt aat acg tcg Asp Leu Thr Ser Glu Ile Ile Val Thr Asp Asn Asn Val Asn Thr Ser 290 295 300			912
aaa tct ggt gtg tat aat gtg acg tat tat gta aag aat agc tat ggg Lys Ser Gly Val Tyr Asn Val Thr Tyr Tyr Val Lys Asn Ser Tyr Gly 305 310 315 320			960
gaa agt gat gaa aaa aca atc gaa gta act gtg ttt tca aac cct aca Glu Ser Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Thr Val Phe Ser Asn Pro Thr 325 330 335			1008
att att gca agt gat gtt gaa att gaa aaa ggt gaa tcg ttt aat cca Ile Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Glu Lys Gly Glu Ser Phe Asn Pro 340 345 350			1056
tta aca gac tca aga gtg agg ctg tct gca caa gat tca ttg ggt aat Leu Thr Asp Ser Arg Val Arg Leu Ser Ala Gln Asp Ser Leu Gly Asn 355 360 365			1104

180

at att act tca aaa gta aag gtg aaa tca agt aat gtg gat act tcg asp Ile Thr Ser Lys Val Lys Val Lys Ser Ser Asn Val Asp Thr Ser 370 375 380	1152
aa cca ggt gaa tat gat gtt gtg ttt gaa gtg acc gat aat ttt ggt ys Pro Gly Glu Tyr Asp Val Val Phe Glu Val Thr Asp Asn Phe Gly 385 390 395 400	1200
gg aaa gca gaa aaa gaa atc aag gtt aca gtt tta ggg cag cca agt ly Lys Ala Glu Lys Glu Ile Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Ser 405 410 415	1248
at gaa gcg aat gat gtt gaa tta gaa ata ggt gat tta ttt aat ccg le Glu Ala Asn Asp Val Glu Leu Glu Ile Gly Asp Leu Phe Asn Pro 420 425 430	1296
aa aca gat tca caa gta ggc ctt cgt gca aaa gac tca tta ggc aaa au Thr Asp Ser Gln Val Gly Leu Arg Ala Lys Asp Ser Leu Gly Lys 435 440 445	1344
at att acg aat gat gtg aaa gta aag tca agt aat gtg gat act tca sp Ile Thr Asn Asp Val Lys Val Lys Ser Ser Asn Val Asp Thr Ser 450 455 460	1392
aa cca gga gaa tat gaa gtt gta ttt gaa gtg acc gat cgt ttt gga ys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu Val Thr Asp Arg Phe Gly 465 470 475 480	1440
aa aaa gca gaa aaa agt atc aaa gtc ctt gtt cta gga gaa cca agc ys Lys Ala Glu Lys Ser Ile Lys Val Leu Val Leu Gly Glu Pro Ser 485 490 495	1488
at gaa gca aat aat gtt gag att gaa aaa gac gaa agg ttc gat cca le Glu Ala Asn Asn Val Glu Ile Glu Lys Asp Glu Arg Phe Asp Pro 500 505 510	1536
aa aca gat tca aga gta ggt ctc cgt gca aaa gac tca tta ggc aaa au Thr Asp Ser Arg Val Gly Leu Arg Ala Lys Asp Ser Leu Gly Lys 515 520 525	1584
at att acg aat gat gtg aaa gta aaa tca agt aat gtg gat act tca sp Ile Thr Asn Asp Val Lys Val Lys Ser Ser Asn Val Asp Thr Ser 530 535 540	1632
aa cca gga gaa tat gaa gtt gta ttt gaa gtg act gat cgt ttt ggt ys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu Val Thr Asp Arg Phe Gly 545 550 555 560	1680
aa tat gta aag aaa ttg att gta gtt ata gta cca gta att gat gat ys Tyr Val Lys Lys Leu Ile Val Val Ile Val Pro Val Ile Asp Asp 565 570 575	1728
aa tgg gaa gat gga aat gtg aat gga tgg aaa ttc tat gcg ggg caa au Trp Glu Asp Gly Asn Val Asn Gly Trp Lys Phe Tyr Ala Gly Gln 580 585 590	1776
atc atc aca ctg ttg aaa gat cct gaa aaa gca tat aaa gga gaa tat sp Ile Thr Leu Leu Lys Asp Pro Glu Lys Ala Tyr Lys Gly Glu Tyr 595 600 605	1824

191

pta ttc tat gat tct agg cat gct gct att tct aaa aca atc cca gta 1872
al Phe Tyr Asp Ser Arg His Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ile Pro Val
610 615 620

aca gat tta caa gtg gga ggg aat tat gaa att aca gta tat gtt aaa 1920
thr Asp Leu Gln Val Gly Gly Asn Tyr Glu Ile Thr Val Tyr Val Lys
625 630 635 640

aca gaa agc ggt gat cat cac cta aaa gtg acg tac aag aaa gac ccg 1968
la Glu Ser Gly Asp His His Leu Lys Val Thr Tyr Lys Lys Asp Pro
645 650 655

aa ggt ccg gag gaa cca cca gtt ttc aat aga ctt att agt aca ggg 2016
lys Gly Pro Glu Glu Pro Pro Val Phe Asn Arg Leu Ile Ser Thr Gly
660 665 670

aa ttg gtg gaa aaa gac tat aga gaa tta aaa gga aca ttc cgt gta 2064
lys Leu Val Glu Lys Asp Tyr Arg Glu Leu Lys Gly Thr Phe Arg Val
675 680 685

cg gaa tta aac caa gca cca ttg ata atc gta gag aat ttt ggt gct 2112
thr Glu Leu Asn Gln Ala Pro Leu Ile Ile Val Glu Asn Phe Gly Ala
690 695 700

ga tat ata ggt gga att aga att gtg aaa ata tcg 2148
ly Tyr Ile Gly Gly Ile Arg Ile Val Lys Ile Ser
705 710 715

210> 2
211> 716
212> PRT
213> Bacillus thuringiensis

400> 2

at Lys Asp Ser Ile Ser Lys Gly Tyr Asp Glu Ile Thr Val Gln Ala
5 10 15

ar Asp Tyr Ile Asp Ile Ser Ile Phe Gln Thr Asn Gly Ser Ala Thr
20 25 30

le Asn Ser Thr Thr Ile Thr Thr Leu Thr Gln Ala Thr Asn Ser Gln
35 40 45

la Gly Ala Ile Gly Lys Thr Ala Leu Asp Met Arg His Asp Phe Thr
50 55 60

le Arg Ala Ile Phe Leu Gly Thr Lys Ser Asn Gly Ala Asp Gly Ile
65 70 75 80

la Ile Ala Phe His Arg Gly Ser Ile Gly Phe Val Gly Glu Lys Gly
85 90 95

ly Gly Gly Ile Leu Gly Ala Leu Lys Gly Ile Gly Phe Glu Leu Asp

100	105	110
Thr Tyr Ala Asn Ala Pro Gln Asp Glu Gln Gly Asp Ser Phe Gly His		
115	120	125
Gly Ala Met Arg Gly Leu Phe Pro Gly Phe Pro Asn Gly Tyr Pro His		
130	135	140
Ala Gly Phe Val Ser Thr Asp Lys Asn Arg Gly Trp Leu Ser Ala Leu		
145	150	155
Ala Gln Met Gln Arg Ile Ala Ala Pro Asn Gly Arg Trp Arg Arg Leu		
165	170	175
Ala Ile His Trp Asp Ala Arg Asn Lys Lys Leu Thr Ala Asn Leu Glu		
180	185	190
Asp Leu Thr Phe Asn Asp Ser Thr Val Leu Val Lys Pro Arg Thr Pro		
195	200	205
Arg Tyr Ala Arg Trp Glu Leu Ser Asn Pro Ala Phe Glu Leu Asp Gln		
210	215	220
Lys Tyr Thr Phe Val Ile Gly Ser Ala Thr Gly Ala Ser Asn Asn Leu		
225	230	235
His Gln Ile Gly Ile Ile Glu Phe Asp Ala Tyr Phe Thr Lys Pro Thr		
245	250	255
Ile Glu Ala Asn Asn Val Ser Val Pro Val Gly Ala Thr Phe Asn Pro		
260	265	270
Lys Thr Tyr Pro Gly Ile Asn Leu Arg Ala Thr Asp Glu Ile Asp Gly		
275	280	285
Asp Leu Thr Ser Glu Ile Ile Val Thr Asp Asn Asn Val Asn Thr Ser		
290	295	300
Lys Ser Gly Val Tyr Asn Val Thr Tyr Tyr Val Lys Asn Ser Tyr Gly		
305	310	315
Glu Ser Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Thr Val Phe Ser Asn Pro Thr		
325	330	335
Ile Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Glu Lys Gly Glu Ser Phe Asn Pro		
340	345	350

Asp Ile Thr Leu Leu Lys Asp Pro Glu Lys Ala Tyr Lys Gly Glu Tyr
595 600 605

Val Phe Tyr Asp Ser Arg His Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ile Pro Val
610 615 620

Thr Asp Leu Gln Val Gly Gly Asn Tyr Glu Ile Thr Val Tyr Val Lys
625 630 635 640

Ala Glu Ser Gly Asp His His Leu Lys Val Thr Tyr Lys Lys Asp Pro
645 650 655

Lys Gly Pro Glu Glu Pro Pro Val Phe Asn Arg Leu Ile Ser Thr Gly
660 665 670

Lys Leu Val Glu Lys Asp Tyr Arg Glu Leu Lys Gly Thr Phe Arg Val
675 680 685

Thr Glu Leu Asn Gln Ala Pro Leu Ile Ile Val Glu Asn Phe Gly Ala
690 695 700

Gly Tyr Ile Gly Gly Ile Arg Ile Val Lys Ile Ser
705 710 715

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(18)
<223> completely synthesized

<400> 3
catcacttttc cccatagc

18

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> synthetic
<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(22)
<223> completely synthesized

<400> 4
gacatgattt tactttttaga gc

22

Glu Ala Ile Asn Ser Gln Ala Gly Ala Ile Ala Gly Lys Thr Ala Leu	
45 50 55	
gat atg aga cgt gat ttt act ctc gta gca gat ata tac cta ggg tct	246
Asp Met Arg Arg Asp Phe Thr Leu Val Ala Asp Ile Tyr Leu Gly Ser	
60 65 70	
aaa agt agt gga gct gat ggt att gct ata gcg ttt cat aga gga tca	294
Lys Ser Ser Gly Ala Asp Gly Ile Ala Ile Ala Phe His Arg Gly Ser	
75 80 85	
att ggt ttt atc ggt acc atg ggt gga ggc tta ggg att cta gga gca	342
Ile Gly Phe Ile Gly Thr Met Gly Gly Gly Leu Gly Ile Leu Gly Ala	
90 95 100 105	
cca aac ggg ata gga ttt gaa ata gat acg tat tgg aaa gca act tca	390
Pro Asn Gly Ile Gly Phe Glu Ile Asp Thr Tyr Trp Lys Ala Thr Ser	
110 115 120	
gat gaa aca ggc gat tca ttt gga cat ggt caa atg aat gga gca cat	438
Asp Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gly His Gly Gln Met Asn Gly Ala His	
125 130 135	
gcg gga ttt gta agt aca aat cga aat gca agc tat tta aca gcc tta	486
Ala Gly Phe Val Ser Thr Asn Arg Asn Ala Ser Tyr Leu Thr Ala Leu	
140 145 150	
gct cct atg caa aaa ata cct gca cct aat aat aaa tgg cgg gtt cta	534
Ala Pro Met Gln Lys Ile Pro Ala Pro Asn Asn Lys Trp Arg Val Leu	
155 160 165	
act atc aat tgg gat gcg cgt aac aac aaa cta aca gca cgg ctt caa	582
Thr Ile Asn Trp Asp Ala Arg Asn Asn Lys Leu Thr Ala Arg Leu Gln	
170 175 180 185	
gag aaa agt aat gat gct tct act agc act cct agt cca aga tat caa	630
Glu Lys Ser Asn Asp Ala Ser Thr Ser Thr Pro Ser Pro Arg Tyr Gln	
190 195 200	
aca tgg gaa cta tta aat cct gcg ttt gat tta aat cag aaa tat act	678
Thr Trp Glu Leu Leu Asn Pro Ala Phe Asp Leu Asn Gln Lys Tyr Thr	
205 210 215	
ttt att atc ggc tca gct aca ggg gct gct aat aac aag cat cag att	726
Phe Ile Ile Gly Ser Ala Thr Gly Ala Ala Asn Asn Lys His Gln Ile	
220 225 230	
gga gtt act ttg ttt gaa gca tac ttt aca aaa cca act ata gag gca	774
Gly Val Thr Leu Phe Glu Ala Tyr Phe Thr Lys Pro Thr Ile Glu Ala	
235 240 245	
aat cct gtt gat att gaa cta ggc aca gcg ttt gat cca tta aac cat	822
Asn Pro Val Asp Ile Glu Leu Gly Thr Ala Phe Asp Pro Leu Asn His	
250 255 260 265	
gag cca att gga ctc aaa gca aca gat gaa gta gat gga gat ata aca	870
Glu Pro Ile Gly Leu Lys Ala Thr Asp Glu Val Asp Gly Asp Ile Thr	
270 275 280	
aag gac att acg gta gaa ttt aat gac ata gat acc tcc aaa cca ggt	918
Lys Asp Ile Thr Val Glu Phe Asn Asp Ile Asp Thr Ser Lys Pro Gly	

atc cct tat caa att aca gta tat gtt aaa cca gaa gat gaa gga act 1686
Ile Pro Tyr Gln Ile Thr Val Tyr Val Lys Pro Glu Asp Glu Gly Thr
540 545 550

gtg gca cac cat att gtt aaa gta tct ttc aaa tct gat tct gct ggt 1734
Val Ala His His Ile Val Lys Val Ser Phe Lys Ser Asp Ser Ala Gly
555 560 565

cca gaa agt gaa gaa gtt ata aat gaa aga tta att gat gca gaa cag 1782
Pro Glu Ser Glu Glu Val Ile Asn Glu Arg Leu Ile Asp Ala Glu Gln
570 575 580 585

ata caa aaa gga tac aga aag tta aca agt att cca ttt aca cca aca 1830
Ile Gln Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Thr Ser Ile Pro Phe Thr Pro Thr
590 595 600

acc att gtt ccc aac aaa aaa cca gtg ata att gtt gaa aac ttt tta 1878
Thr Ile Val Pro Asn Lys Lys Pro Val Ile Ile Val Glu Asn Phe Leu
605 610 615

cca gga tgg ata ggt gga gtt aga ata att gta gag cct aca aag 1923
Pro Gly Trp Ile Gly Gly Val Arg Ile Ile Val Glu Pro Thr Lys
620 625 630

taagaatttat aaactagctt ttaataaata tatttaaaaa at 1965

<210> 8
<211> 632
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(30)
<223> alternative methionine initiation codon sequence

<400> 8

Leu Asn Ser Lys Ser Ile Ile Glu Lys Gly Val Gln Glu Asn Gln Tyr
1 5 10 15

Ile Asp Ile Arg Asn Ile Cys Ser Ile Asn Gly Ser Ala Lys Phe Asp
20 25 30

Pro Asn Thr Asn Ile Thr Thr Leu Thr Glu Ala Ile Asn Ser Gln Ala
35 40 45

Gly Ala Ile Ala Gly Lys Thr Ala Leu Asp Met Arg Arg Asp Phe Thr
50 55 60

Leu Val Ala Asp Ile Tyr Leu Gly Ser Lys Ser Ser Gly Ala Asp Gly
65 70 75 80

Ile Ala Ile Ala Phe His Arg Gly Ser Ile Gly Phe Ile Gly Thr Met

196

95	90	95
Gly Gly Gly Leu Gly Ile Leu Gly Ala Pro Asn Gly Ile Gly Phe Glu 100 105 110		
Ile Asp Thr Tyr Trp Lys Ala Thr Ser Asp Glu Thr Gly Asp Ser Phe 115 120 125		
Gly His Gly Gln Met Asn Gly Ala His Ala Gly Phe Val Ser Thr Asn 130 135 140		
Arg Asn Ala Ser Tyr Leu Thr Ala Leu Ala Pro Met Gln Lys Ile Pro 145 150 155 160		
Ala Pro Asn Asn Lys Trp Arg Val Leu Thr Ile Asn Trp Asp Ala Arg 165 170 175		
Asn Asn Lys Leu Thr Ala Arg Leu Gln Glu Lys Ser Asn Asp Ala Ser 180 185 190		
Thr Ser Thr Pro Ser Pro Arg Tyr Gln Thr Trp Glu Leu Leu Asn Pro 195 200 205		
Ala Phe Asp Leu Asn Gln Lys Tyr Thr Phe Ile Ile Gly Ser Ala Thr 210 215 220		
Gly Ala Ala Asn Asn Lys His Gln Ile Gly Val Thr Leu Phe Glu Ala 225 230 235 240		
Tyr Phe Thr Lys Pro Thr Ile Glu Ala Asn Pro Val Asp Ile Glu Leu 245 250 255		
Gly Thr Ala Phe Asp Pro Leu Asn His Glu Pro Ile Gly Leu Lys Ala 260 265 270		
Thr Asp Glu Val Asp Gly Asp Ile Thr Lys Asp Ile Thr Val Glu Phe 275 280 285		
Asn Asp Ile Asp Thr Ser Lys Pro Gly Ala Tyr Arg Val Thr Tyr Lys 290 295 300		
Val Val Asn Ser Tyr Gly Glu Ser Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Val 305 310 315 320		
Val Tyr Thr Lys Pro Thr Ile Thr Ala His Asp Ile Thr Ile Lys Lys 325 330 335		

Asp Leu Ala Phe Asp Pro Leu Asn Tyr Glu Pro Ile Gly Leu Lys Ala
340 345 350

Thr Asp Pro Ile Asp Gly Asp Ile Thr Asp Lys Ile Ala Val Lys Phe
355 360 365

Asn Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Lys Tyr His Val Thr Tyr Lys
370 375 380

Val Ile Asn Ser Tyr Glu Lys Ile Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Thr
385 390 395 400

Val Tyr Thr Lys Pro Ser Ile Val Ala His Asp Val Glu Ile Lys Lys
405 410 415

Asp Thr Ala Phe Asp Pro Leu Asn Tyr Glu Pro Ile Gly Leu Lys Ala
420 425 430

Thr Asp Pro Ile Asp Gly Asp Ile Thr Asp Lys Ile Thr Val Glu Ser
435 440 445

Asn Asp Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Ala Tyr Ser Val Lys Tyr Lys
450 455 460

Val Val Asn Asn Tyr Glu Glu Ser Asp Glu Lys Thr Ile Ala Val Thr
465 470 475 480

Val Pro Val Ile Asp Asp Gly Trp Glu Asn Gly Asp Pro Thr Gly Trp
485 490 495

Lys Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ile Thr Leu Glu Asp Asp Glu Glu His
500 505 510

Ala Leu Asn Gly Lys Trp Val Phe Tyr Ala Asp Lys His Val Ala Ile
515 520 525

Tyr Lys Gln Val Glu Leu Lys Asn Asn Ile Pro Tyr Gln Ile Thr Val
530 535 540

Tyr Val Lys Pro Glu Asp Glu Gly Thr Val Ala His His Ile Val Lys
545 550 555 560

Val Ser Phe Lys Ser Asp Ser Ala Gly Pro Glu Ser Glu Glu Val Ile
565 570 575

Asn Glu Arg Leu Ile Asp Ala Glu Gln Ile Gln Lys Gly Tyr Arg Lys
580 585 590

Leu Thr Ser Ile Pro Phe Thr Pro Thr Thr Ile Val Pro Asn Lys Lys
595 600 605

Pro Val Ile Ile Val Glu Asn Phe Leu Pro Gly Trp Ile Gly Gly Val
610 615 620

Arg Ile Ile Val Glu Pro Thr Lys
625 630

<210> 9
<211> 2172
<212> DNA
<213> Bacillus thuringiensis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2166)
<223> Cry22 Amino Acid Sequence

<400> 9
atg aaa gaa caa aat cta aat aaa tat gat gaa ata act gta caa gca 48
Met Lys Glu Gln Asn Leu Asn Lys Tyr Asp Glu Ile Thr Val Gln Ala
1 5 10 15

gca agc gat tat atc gac att cgt ccg att ttt caa aca aat gga tct 96
Ala Ser Asp Tyr Ile Asp Ile Arg Pro Ile Phe Gln Thr Asn Gly Ser
20 25 30

gct aca ttt aat tct aat acc aat att aca act tta aca caa gct ata 144
Ala Thr Phe Asn Ser Asn Thr Asn Ile, Thr Thr Leu Thr Gln Ala Ile
35 40 45

aat agt caa gca gga gca att gca gga aag act gct cta gat atg aga 192
Asn Ser Gln Ala Gly Ala Ile Ala Gly Lys Thr Ala Leu Asp Met Arg
50 55 60

cat gac ttt act ttt aga gca gat att ttt ctt gga act aaa agt aac 240
His Asp Phe Thr Phe Arg Ala Asp Ile Phe Leu Gly Thr Lys Ser Asn
65 70 75 80

gga gca gac ggt att gca atc gca ttt cat aga gga tca att ggg ttt 288
Gly Ala Asp Gly Ile Ala Ile Ala Phe His Arg Gly Ser Ile Gly Phe
85 90 95

gtt gga aca aaa ggc gga gga ctt gga ata tta ggt gca cct aaa ggg 336
Val Gly Thr Lys Gly Gly Gly Leu Gly Ile Leu Gly Ala Pro Lys Gly
100 105 110

ata ggg ttt gaa tta gac aca tat gcg aat gca cct gag gac gaa gta 384
Ile Gly Phe Glu Leu Asp Thr Tyr Ala Asn Ala Pro Glu Asp Glu Val
115 120 125

199

ggc gat tgc ttt ggg cat ggg gca atg aaa gga tca ttc cct agt ttc Gly Asp Ser Phe Gly His Gly Ala Met Lys Gly Ser Phe Pro Ser Phe 130 135 140	432
cca aat gga tat ccc cat gct ggc ttt gta agt act gat aaa aat agt Pro Asn Gly Tyr Pro His Ala Gly Phe Val Ser Thr Asp Lys Asn Ser 145 150 155 160	480
aga tgg tta tca gct cta gct cag atg cag cga atc gct gct cca aac Arg Trp Leu Ser Ala Leu Ala Gln Met Gln Arg Ile Ala Ala Pro Asn 165 170 175	528
ggg cgt tgg aga cgt ctg gag att cgt tgg gat gct cgt aat aaa gag Gly Arg Trp Arg Arg Leu Glu Ile Arg Trp Asp Ala Arg Asn Lys Glu 180 185 190	576
tta act gca aat ctt cag gat tta act ttt aat gac ata act gtt gga Leu Thr Ala Asn Leu Gln Asp Leu Thr Phe Asn Asp Ile Thr Val Gly 195 200 205	624
gag aag cca cgt act cca aga act gca act tgg agg tta gta aat cct Glu Lys Pro Arg Thr Pro Arg Thr Ala Thr Trp Arg Leu Val Asn Pro 210 215 220	672
gca ttt gaa ctt gat cag aag tat act ttt gtt att ggt tgc gcg acg Ala Phe Glu Leu Asp Gln Lys Tyr Thr Phe Val Ile Gly Ser Ala Thr 225 230 235 240	720
ggg gca tct aat aac cta cat cag att ggg att ata gaa ttt gat gca Gly Ala Ser Asn Asn Leu His Gln Ile Gly Ile Ile Glu Phe Asp Ala 245 250 255	768
tac ttt act aaa ccg aca ata gaa gcg aat aat gta aat gtc cca gtg Tyr Phe Thr Lys Pro Thr Ile Glu Ala Asn Asn Val Asn Val Pro Val 260 265 270	816
gga gca aca ttt aat cca aaa aca tat cca gga ata aat tta aga gca Gly Ala Thr Phe Asn Pro Lys Thr Tyr Pro Gly Ile Asn Leu Arg Ala 275 280 285	864
aca gat gag ata gat ggg gat ttg aca tgc aag att att gtg aaa gca Thr Asp Glu Ile Asp Gly Asp Leu Thr Ser Lys Ile Ile Val Lys Ala 290 295 300	912
aac aat gtt aat acg tgc aaa acg ggt gtg tat tat gtg acg tat tat Asn Asn Val Asn Thr Ser Lys Thr Gly Val Tyr Tyr Val Thr Tyr Tyr 305 310 315 320	960
gta gag aat agt tat ggg gaa agt gat gaa aaa aca atc gaa gta act Val Glu Asn Ser Tyr Gly Glu Ser Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Thr 325 330 335	1008
gtg ttt tca aac cct aca att att gca agt gat gtt gaa att gaa aaa Val Phe Ser Asn Pro Thr Ile Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Glu Lys 340 345 350	1056
ggg gaa tct ttt aac cca cta act gat tca aga gta ggt ctt tct gca Gly Glu Ser Phe Asn Pro Leu Thr Asp Ser Arg Val Gly Leu Ser Ala 355 360 365	1104
cag gat tca tta ggc aat gat att acc caa aat gta aag gta aaa tgc	1152

200

Gln Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile Thr Gln Asn Val Lys Val Lys Ser	
370 375 380	
agt aat gtg gat act tca aag cca ggg gaa tat gaa gtt gta ttt gaa	1200
Ser Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu	
385 390 395 400	
gtg aca gat agc ttt ggt gga aaa gca gaa aaa gat ttc aag gtt aca	1248
Val Thr Asp Ser Phe Gly Gly Lys Ala Glu Lys Asp Phe Lys Val Thr	
405 410 415	
gtt tta gga cag cca agt ata gaa gcg aat aat gtt gaa tta gaa ata	1296
Val Leu Gly Gln Pro Ser Ile Glu Ala Asn Asn Val Glu Leu Glu Ile	
420 425 430	
gat gat tca ttg gat cca tta aca gat gca aaa gta ggt ctc cgt gca	1344
Asp Asp Ser Leu Asp Pro Leu Thr Asp Ala Lys Val Gly Leu Arg Ala	
435 440 445	
aag gat tca tta ggt aat gat att acg aaa gac ata aaa gta aag ttc	1392
Lys Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile Thr Lys Asp Ile Lys Val Lys Phe	
450 455 460	
aat aac gta gat act tca aat tca gga aag tat gaa gtt ata ttt gaa	1440
Asn Asn Val Asp Thr Ser Asn Ser Gly Lys Tyr Glu Val Ile Phe Glu	
465 470 475 480	
gtg acg gac cgt ttt gga aaa aaa gca gaa aaa agt att gaa gtc ctt	1488
Val Thr Asp Arg Phe Gly Lys Lys Ala Glu Lys Ser Ile Glu Val Leu	
485 490 495	
gtt cta gga gaa cca agc att gaa gca aat gat gtt gag gtt aat aaa	1536
Val Leu Gly Glu Pro Ser Ile Glu Ala Asn Asp Val Glu Val Asn Lys	
500 505 510	
ggt gaa acg ttt gaa cca tta aca gat tca aga gtt ggc ctc cgt gca	1584
Gly Glu Thr Phe Glu Pro Leu Thr Asp Ser Arg Val Gly Leu Arg Ala	
515 520 525	
aaa gac tca tta ggt aat gat att acg aaa gat gtg aaa ata aaa tca	1632
Lys Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile Thr Lys Asp Val Lys Ile Lys Ser	
530 535 540	
agt aat gtg gat act tca aaa cca ggt gaa tat gaa gtt gta ttt gaa	1680
Ser Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu	
545 550 555 560	
gtg aca gat cgt ttt ggt aaa tat gta gaa aaa aca att gga gtt ata	1728
Val Thr Asp Arg Phe Gly Lys Tyr Val Glu Lys Thr Ile Gly Val Ile	
565 570 575	
gtg cca gta att gat gat gaa tgg gaa gat gga aat gtg aat ggt tgg	1776
Val Pro Val Ile Asp Asp Glu Trp Glu Asp Gly Asn Val Asn Gly Trp	
580 585 590	
aaa ttc tat gct ggg caa gat att aaa ctg ttg aag gat cct gat aaa	1824
Lys Phe Tyr Ala Gly Gln Asp Ile Lys Leu Leu Lys Asp Pro Asp Lys	
595 600 605	
gcc tat aaa ggc gat tat gta ttc tat gat tct aga cac gtt gct att	1872
Ala Tyr Lys Gly Asp Tyr Val Phe Tyr Asp Ser Arg His Val Ala Ile	

610	615	620	
tct aaa aca att cca cta acg gat ttg caa ata aat aca aac tat gaa			1920
Ser Lys Thr Ile Pro Leu Thr Asp Leu Gln Ile Asn Thr Asn Tyr Glu			
625	630	635	640
att aca gtg tat gct aaa gca gaa agc ggc gat cat cac tta aaa gtg			1968
Ile Thr Val Tyr Ala Lys Ala Glu Ser Gly Asp His His Leu Lys Val			
645	650		655
acg tat aag aaa gac ccg gca ggt cca gaa gag ccg cca gtt ttc aat			2016
Thr Tyr Lys Lys Asp Pro Ala Gly Pro Glu Glu Pro Pro Val Phe Asn			
660	665		670
aga ctg att agc aca ggc aca ttg gta gaa aaa gat tat aga gaa tta			2064
Arg Leu Ile Ser Thr Gly Thr Leu Val Glu Lys Asp Tyr Arg Glu Leu			
675	680		685
aaa ggg acg ttc cgc gta aca gaa tta aac aaa gca cca ttg ata atc			2112
Lys Gly Thr Phe Arg Val Thr Glu Leu Asn Lys Ala Pro Leu Ile Ile			
690	695		700
gta gag aat ttt gga gct gga tat ata ggt gga att aga att gtg aaa			2160
Val Glu Asn Phe Gly Ala Gly Tyr Ile Gly Gly Ile Arg Ile Val Lys			
705	710	715	720
ata tcg taataa			2172
Ile Ser			

<210> 10
 <211> 722
 <212> PRT
 <213> Bacillus thuringiensis

<400> 10

Met Lys Glu Gln Asn Leu Asn Lys Tyr Asp Glu Ile Thr Val Gln Ala
1 5 10 15

Ala Ser Asp Tyr Ile Asp Ile Arg Pro Ile Phe Gln Thr Asn Gly Ser
20 25 30

Ala Thr Phe Asn Ser Asn Thr Asn Ile Thr Thr Leu Thr Gln Ala Ile
35 40 45

Asn Ser Gln Ala Gly Ala Ile Ala Gly Lys Thr Ala Leu Asp Met Arg
50 55 60

His Asp Phe Thr Phe Arg Ala Asp Ile Phe Leu Gly Thr Lys Ser Asn
65 70 75 80

Gly Ala Asp Gly Ile Ala Ile Ala Phe His Arg Gly Ser Ile Gly Phe
85 90 95

Val Gly Thr Lys Gly Gly Gly Leu Gly Ile Leu Gly Ala Pro Lys Gly
100 105 110

Ile Gly Phe Glu Leu Asp Thr Tyr Ala Asn Ala Pro Glu Asp Glu Val
115 120 125

Gly Asp Ser Phe Gly His Gly Ala Met Lys Gly Ser Phe Pro Ser Phe
130 135 140

Pro Asn Gly Tyr Pro His Ala Gly Phe Val Ser Thr Asp Lys Asn Ser
145 150 155 160

Arg Trp Leu Ser Ala Leu Ala Gln Met Gln Arg Ile Ala Ala Pro Asn
165 170 175

Gly Arg Trp Arg Arg Leu Glu Ile Arg Trp Asp Ala Arg Asn Lys Glu
180 185 190

Leu Thr Ala Asn Leu Gln Asp Leu Thr Phe Asn Asp Ile Thr Val Gly
195 200 205

Glu Lys Pro Arg Thr Pro Arg Thr Ala Thr Trp Arg Leu Val Asn Pro
210 215 220

Ala Phe Glu Leu Asp Gln Lys Tyr Thr Phe Val Ile Gly Ser Ala Thr
225 230 235 240

Gly Ala Ser Asn Asn Leu His Gln Ile Gly Ile Ile Glu Phe Asp Ala
245 250 255

Tyr Phe Thr Lys Pro Thr Ile Glu Ala Asn Asn Val Asn Val Pro Val
260 265 270

Gly Ala Thr Phe Asn Pro Lys Thr Tyr Pro Gly Ile Asn Leu Arg Ala
275 280 285

Thr Asp Glu Ile Asp Gly Asp Leu Thr Ser Lys Ile Ile Val Lys Ala
290 295 300

Asn Asn Val Asn Thr Ser Lys Thr Gly Val Tyr Tyr Val Thr Tyr Tyr
305 310 315 320

Val Glu Asn Ser Tyr Gly Glu Ser Asp Glu Lys Thr Ile Glu Val Thr
325 330 335

Val Phe Ser Asn Pro Thr Ile Ile Ala Ser Asp Val Glu Ile Glu Lys
 340 345 350
 Gly Glu Ser Phe Asn Pro Leu Thr Asp Ser Arg Val Gly Leu Ser Ala
 355 360 365
 Gln Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile Thr Gln Asn Val Lys Val Lys Ser
 370 375 380
 Ser Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu
 385 390 395 400
 Val Thr Asp Ser Phe Gly Gly Lys Ala Glu Lys Asp Phe Lys Val Thr
 405 410 415
 Val Leu Gly Gln Pro Ser Ile Glu Ala Asn Asn Val Glu Leu Glu Ile
 420 425 430
 Asp Asp Ser Leu Asp Pro Leu Thr Asp Ala Lys Val Gly Leu Arg Ala
 435 440 445
 Lys Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile Thr Lys Asp Ile Lys Val Lys Phe
 450 455 460
 Asn Asn Val Asp Thr Ser Asn Ser Gly Lys Tyr Glu Val Ile Phe Glu
 465 470 475 480
 Val Thr Asp Arg Phe Gly Lys Lys Ala Glu Lys Ser Ile Glu Val Leu
 485 490 495
 Val Leu Gly Glu Pro Ser Ile Glu Ala Asn Asp Val Glu Val Asn Lys
 500 505 510
 Gly Glu Thr Phe Glu Pro Leu Thr Asp Ser Arg Val Gly Leu Arg Ala
 515 520 525
 Lys Asp Ser Leu Gly Asn Asp Ile Thr Lys Asp Val Lys Ile Lys Ser
 530 535 540
 Ser Asn Val Asp Thr Ser Lys Pro Gly Glu Tyr Glu Val Val Phe Glu
 545 550 555 560
 Val Thr Asp Arg Phe Gly Lys Tyr Val Glu Lys Thr Ile Gly Val Ile
 565 570 575
 Val Pro Val Ile Asp Asp Glu Trp Glu Asp Gly Asn Val Asn Gly Trp

204

580

585

590

Lys Phe Tyr Ala Gly Gln Asp Ile Lys Leu Leu Lys Asp Pro Asp Lys
595 600 605

Ala Tyr Lys Gly Asp Tyr Val Phe Tyr Asp Ser Arg His Val Ala Ile
610 615 620

Ser Lys Thr Ile Pro Leu Thr Asp Leu Gln Ile Asn Thr Asn Tyr Glu
625 630 635 640

Ile Thr Val Tyr Ala Lys Ala Glu Ser Gly Asp His His Leu Lys Val
645 650 655

Thr Tyr Lys Lys Asp Pro Ala Gly Pro Glu Glu Pro Pro Val Phe Asn
660 665 670

Arg Leu Ile Ser Thr Gly Thr Leu Val Glu Lys Asp Tyr Arg Glu Leu
675 680 685

Lys Gly Thr Phe Arg Val Thr Glu Leu Asn Lys Ala Pro Leu Ile Ile
690 695 700

Val Glu Asn Phe Gly Ala Gly Tyr Ile Gly Gly Ile Arg Ile Val Lys
705 710 715 720

Ile Ser

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)
<223> completely synthesized

<400> 11
attgatactc tatgaaatgc

20

<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide

205

<222> (1)..(19)
<223> completely synthesized

<400> 12
gtttcccaaa tggatatcc .

19

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(19)
<223> completely synthesized

<400> 13
ggatatccat ttgggaaac

19

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)
<223> completely synthesized

<400> 14
atctaataac ctacatcaga

20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)
<223> completely synthesized

<400> 15
tctgatgtag gttattagat

20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)

<223> completely synthesized

<400> 16
tatggggaaa gtgatgaaa

20

<210> 17
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(18)
<223> completely synthesized

<400> 17
atgttgaatt agaaatag

18

<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(18)
<223> completely synthesized

<400> 18
ctattttctaa ttcaacat

18

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)
<223> completely synthesized

<400> 19
aagtccttgt tctaggagaa

20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)
<223> completely synthesized

209

<400> 20
ttctcctaga acaaggactt 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)
<223> completely synthesized

<400> 21
tatgtattct atgattctag 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> synthetic

<220>
<221> synthetic oligonucleotide
<222> (1)..(20)
<223> completely synthesized

<400> 22
ctagaatcat agaatacata 20

FIG. 1

FIG. 1A
FIG. 1B
FIG. 1C
FIG. 1D
FIG. 1E
FIG. 1F
FIG. 1G

FIG. 2

FIG. 2A
FIG. 2B
FIG. 2C
FIG. 2D

aaatattttt aaaggggat acgtaat ttg aat tct aaa tct atc atc gaa aaa	54
Leu Asn Ser Lys Ser Ile Ile Glu Lys	
1 5	
ggg gta caa gag aat caa tat att gat att cgt aac ata tgt agc att	102
Gly Val Gln Glu Asn Gln Tyr Ile Asp Ile Arg Asn Ile Cys Ser Ile	
10 15 20 25	
aat ggt tct gct aaa ttt gat cct aat act aac att aca acc tta aca	150
Asn Gly Ser Ala Lys Phe Asp Pro Asn Thr Asn Ile Thr Thr Leu Thr	
30 35 40	
gaa gct atc aat tct caa gca gga gcg att gct gga aaa act gcc cta	198
Glu Ala Ile Asn Ser Gln Ala Gly Ala Ile Ala Gly Lys Thr Ala Leu	
45 50 55	
gat atg aga cgt gat ttt act ctc gta gca gat ata tac cta ggg tct	246
Asp Met Arg Arg Asp Phe Thr Leu Val Ala Asp Ile Tyr Leu Gly Ser	
60 65 70	
aaa agt agt gga gct gat ggt att gct ata gcg ttt cat aga gga tca	294
Lys Ser Ser Gly Ala Asp Gly Ile Ala Ile Ala Phe His Arg Gly Ser	
75 80 85	

2/12

FIG. 1A

209

att ggt ttt atc ggt acc atg ggt gga ggc tta ggg att cta gga gca Ile Gly Phe Ile Gly Thr Met Gly Gly Gly Leu Gly Ile Leu Gly Ala 90 95 100 105	342
cca aac ggg ata gga ttt gaa ata gat acg tat tgg aaa gca act tca Pro Asn Gly Ile Gly Phe Glu Ile Asp Thr Tyr Trp Lys Ala Thr Ser 110 115 120	390
gat gaa aca ggc gat tca ttt gga cat ggt caa atg aat gga gca cat Asp Glu Thr Gly Asp Ser Phe Gly His Gly Gln Met Asn Gly Ala His 125 130 135	438
gcg gga ttt gta agt aca aat cga aat gca agc tat tta aca gcc tta Ala Gly Phe Val Ser Thr Asn Arg Asn Ala Ser Tyr Leu Thr Ala Leu 140 145 150	486
gct cct atg caa aaa ata cct gca cct aat aat aaa tgg cgg gtt cta Ala Pro Met Gln Lys Ile Pro Ala Pro Asn Asn Lys Trp Arg Val Leu 155 160 165	534
act atc aat tgg gat gcg cgt aac aac aaa cta aca gca cgg ctt caa Thr Ile Asn Trp Asp Ala Arg Asn Asn Lys Leu Thr Ala Arg Leu Gln	582

3/12

FIG. 1B

2/0

gag aaa agt aat gat gct tct act agc act cct agt cca aga tat caa	630
Glu Lys Ser Asn Asp Ala Ser Thr Ser Thr Pro Ser Pro Arg Tyr Gln	
190 195 200	
aca tgg gaa cta tta aat cct gcg ttt gat tta aat cag aaa tat act	678
Thr Trp Glu Leu Leu Asn Pro Ala Phe Asp Leu Asn Gln Lys Tyr Thr	
205 210 215	
ttt att atc ggc tca gct aca ggg gct gct aat aac aag cat cag att	726
Phe Ile Ile Gly Ser Ala Thr Gly Ala Ala Asn Asn Lys His Gln Ile	
220 225 230	
gga gtt act ttg ttt gaa gca tac ttt aca aaa cca act ata gag gca	774
Gly Val Thr Leu Phe Glu Ala Tyr Phe Thr Lys Pro Thr Ile Glu Ala	
235 240 245	
aat cct gtt gat att gaa cta ggc aca gcg ttt gat cca tta aac cat	822
Asn Pro Val Asp Ile Glu Leu Gly Thr Ala Phe Asp Pro Leu Asn His	
250 255 260 265	

4/12

FIG. 1C

271

gag cca att gga ctc aaa gca aca gat gaa gta gat gga gat ata aca Glu Pro Ile Gly Leu Lys Ala Thr Asp Glu Val Asp Gly Asp Ile Thr 270275280	870
aag gac att acg gta gaa ttt aat gac ata gat acc tcc aaa cca ggt Lys Asp Ile Thr Val Glu Phe Asn Asp Ile Asp Thr Ser Lys Pro Gly 285290295	918
gca tac cgt gta aca tat aaa gta gta aat agt tat gga gaa agt gat Ala Tyr Arg Val Thr Tyr Lys Val Val Asn Ser Tyr Gly Glu Ser Asp 300305310	966
gag aaa aca ata gaa gtc gta gta tac acg aaa cca act ata act gca Glu Lys Thr Ile Glu Val Val Val Tyr Thr Lys Pro Thr Ile Thr Ala 315320325	1014
cat gat att acg att aag aaa gac tta gca ttt gat cca tta aac tat His Asp Ile Thr Ile Lys Lys Asp Leu Ala Phe Asp Pro Leu Asn Tyr 330335340345	1062
gaa cca att gga ctc aaa gca acc gat cca att gat gga gat ata aca Glu Pro Ile Gly Leu Lys Ala Thr Asp Pro Ile Asp Gly Asp Ile Thr 350355360	1110

5/12

FIG. 1D

8/2

gat	aaa	atc	gct	gta	aaa	ttt	aat	aat	gtc	gat	acc	tct	aaa	ccg	ggt	1158
Asp	Lys	Ile	Ala	Val	Lys	Phe	Asn	Asn	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Pro	Gly	
		365						370						375		
aaa	tac	cat	gta	aca	tat	aaa	gtg	ata	aat	agt	tat	gaa	aaa	att	gat	1206
Lys	Tyr	His	Val	Thr	Tyr	Lys	Val	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Lys	Ile	Asp	
		380					385							390		
gaa	aaa	aca	ata	gag	gtc	aca	gta	tat	acg	aaa	cca	tct	ata	gtg	gca	1254
Glu	Lys	Thr	Ile	Glu	Val	Thr	Val	Tyr	Thr	Lys	Pro	Ser	Ile	Val	Ala	
		395				400					405					
cat	gat	gtt	gag	att	aaa	aaa	gat	acg	gca	ttt	gat	ccg	tta	aac	tat	1302
His	Asp	Val	Glu	Ile	Lys	Lys	Asp	Thr	Ala	Phe	Asp	Pro	Leu	Asn	Tyr	
410					415				420					425		
gaa	cca	att	ggg	ctc	aaa	gca	acc	gat	cca	att	gat	gga	gat	ata	aca	1350
Glu	Pro	Ile	Gly	Leu	Lys	Ala	Thr	Asp	Pro	Ile	Asp	Gly	Asp	Ile	Thr	
			430					435						440		
gat	aaa	att	acg	gta	gaa	tct	aat	gat	gtt	gat	acc	tct	aaa	cca	ggt	1398
Asp	Lys	Ile	Thr	Val	Glu	Ser	Asn	Asp	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Pro	Gly	
		445						450						455		

FIG. 1E

6/12

gca tat agt gtg aaa tat aaa gta gta aat aat tat gaa gaa agt gac	1446
Ala Tyr Ser Val Lys Tyr Lys Val Val Asn Asn Tyr Glu Glu Ser Asp	
460 465 470	
gaa aaa aca att gcc gtt aca gta cct gtt ata gat gat ggg tgg gag	1494
Glu Lys Thr Ile Ala Val Thr Val Pro Val Ile Asp Asp Gly Trp Glu	
475 480 485	
aat ggc gat ccg aca gga tgg aaa ttc ttc tct ggt gaa acc att act	1542
Asn Gly Asp Pro Thr Gly Trp Lys Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ile Thr	
490 495 500 505	
cta gaa gat gat gaa gag cat gct ctt aat ggt aaa tgg gta ttt tat	1590
Leu Glu Asp Asp Glu Glu His Ala Leu Asn Gly Lys Trp Val Phe Tyr	
510 515 520	
gct gat aaa cat gta gca ata tac aaa caa gta gag ttg aag aat aat	1638
Ala Asp Lys His Val Ala Ile Tyr Lys Gln Val Glu Leu Lys Asn Asn	
525 530 535	
atc cct tat caa att aca gta tat gtt aaa cca gaa gat gaa gga act	1686
Ile Pro Tyr Gln Ile Thr Val Tyr Val Lys Pro Glu Asp Glu Gly Thr	
540 545 550	

7/12

FIG. 1F

214

gtg gca cac cat att gtt aaa gta tct ttc aaa tct gat tct gct ggt	1734
Val Ala His His Ile Val Lys Val Ser Phe Lys Ser Asp Ser Ala Gly	
555 560 565	
cca gaa agt gaa gaa gtt ata aat gaa aga tta att gat gca gaa cag	1782
Pro Glu Ser Glu Glu Val Ile Asn Glu Arg Leu Ile Asp Ala Glu Gln	
570 575 580 585	
ata caa aaa gga tac aga aag tta aca agt att cca ttt aca cca aca	1830
Ile Gln Lys Gly Tyr Arg Lys Leu Thr Ser Ile Pro Phe Thr Pro Thr	
590 595 600	
acc att gtt ccc aac aaa aaa cca gtg ata att gtt gaa aac ttt tta	1878
Thr Ile Val Pro Asn Lys Lys Pro Val Ile Ile Val Glu Asn Phe Leu	
605 610 615	
cca gga tgg ata ggt gga gtt aga ata att gta gag cct aca aag	1923
Pro Gly Trp Ile Gly Gly Val Arg Ile Ile Val Glu Pro Thr Lys	
620 625 630	
taagaattat aaactagctt ttaataaata tatttaaaaa at	1965

8/12

FIG. 1G

2/5

Cry22Aa	MKEQNLNKYDEITVQAASDYIDIRPIFQTNGSATFNSNTNITTLTQAINS	50
ET70	MKDSISKGYDEITVQA-SDYIDIRSIFQTNGSATFNSTTNITTLTQATNS	49
tIC851	MN---SKSIEKGVQE-NQYIDIRNICSINGSAKFDPNTNITTLTEAINS	46
	*. . . * . ** . . . ***** * . ***** . * . **	
Cry22Aa	QAGAIAGKTALDMRHOFTRADIFLGTKSNGADGIAIAFHRSIGFVGTK	100
ET70	QAGAIAGKTALDMRHOFTRADIFLGTKSNGADGIAIAFHRSIGFVGEK	99
tIC851	QAGAIAGKTALDMRRDFTLVADIYLGSKSSGADGIAIAFHRSIGFIGTM	96
	*****.***.***.***.***.*****.***.	
Cry22Aa	GGGLGILGAPKGIGFELDTYANAPEDEVGDSFGHGAMKGSFSPFNGYPH	150
ET70	GGGLGILGALKGIGFELDTYANAPQDEQGDSFGHGAMRGLFPGFNGYPH	149
tIC851	GGGLGILGAPNGIGFEIDTYWKATSDETGDSFGHGQMNG-----AH	137
	*****.*****.***. *. ** *****. *. *	
Cry22Aa	AGFVSTDKNRWLSALAQMORIAAAPNGRWRRLEIRWDARNKELTANLQDL	200
ET70	AGFVSTDKNRGWLSALAQMORIAAAPNGRWRRLAHWDARNKKLTANLEDL	199
tIC851	AGFVSTNRNASYL TALAPMQKIPAPNNKWRVLTINWDARNNKL TARLQE-	186
	*****. * . * . *** . ** . * . *** . ** * . * . ***** . *** . *	

9/12

FIG. 2A

2/6

Cry22Aa	TFNDITVGEKPRTPRTATWRLVNPAFELDQKYTFVIGSATGASNNLHQIG	250
ET70	TFNDSTVLVKPRTPRYARWELSNPAFELDQKYTFVIGSATGASNNLHQIG	249
tIC851	--KSNDASTSTPSPRYQTWELLNPAFDLNQKYTFIIGSATGAANNKHQIG	234
	 ** . * * **** . * . **** . **** . * * ****	
Cry22Aa	IIEFDAYFTKPTIEANNVNPVGATFNPKTYPGINLRATDEIDGDLTSKI	300
ET70	IIEFDAYFTKPTIEANNVSPVGATFNPKTYPGINLRATDEIDGDLTSEI	299
tIC851	VTLFEAYFTKPTIEANPVDIELGTAFDPLNHEPIGLKATDEVGDITKDI	284
	.. * . **** . * . . * . * . * . * . * . **** . * . * . *	
Cry22Aa	IVKANNVNTSKTGVYYVTTYVNSYGESDEKTIEVTVFSNPTIIASDVEI	350
ET70	IVTDNNVNTSKSGVYNVTTYVKNSYGESDEKTIEVTVFSNPTIIASDVEI	349
tIC851	TVEFNDIDTSKPGAYRVTYKVVNSYGESDEKTIEVVVYTKPTITAHDTI	334
	. * . * . . * . * . * * * * * * * * * . * . . * . * . * . *	
Cry22Aa	EKGESFNPLTDSRVGLSAQDSLGNITQNVKVKSSNVDTSKPGEYEVVFE	400
ET70	EKGESFNPLTDSRVRLSAQDSLGNITSKVKVKSSNVDTSKPGEYDVVFE	399
tIC851	KKDLAFDPL -----NYE-----	346
	. * . * . * . * . * . * .	

10/12

FIG. 2B

Cry22Aa	KLLKDPDKAYKGDYVFYDSRHVAISKTIPLTDLQINTNYEITVYAKAES-	649
ET70	TLLKDPEKAYKGEYVFYDSRHAAISKTIPTDLDQVGGNYEITVYVKAES-	648
tIC851	TLEDDEEHALNGKWVFYADKHVAIYKQV---ELKNNIPYQITVYVKPEDE	551
	. * . * . . * . . . * * * . . . * . . . * . * * * * . * .	
Cry22Aa	---GDHHLKVTYKKDPAGPEEPPVFNRLISTGTLVEKDYRELKGT-FRVT	695
ET70	---GDHHLKVTYKKDPKGPEEPPVFNRLISTGKLVEKDYRELKGT-FRVT	694
tIC851	GTVAHHIVKVSFKSDSAGPESEEVINERLIDAEQIQGYRKLTSIPFTPT	601
	. . * . * * . . * . * * * . * * . . . * . * .	
Cry22Aa	EL--NKAPLIIVENFGAGYIGGIRIV--KIS	722
ET70	EL--NQAPLIIVENFGAGYIGGIRIV--KIS	721
tIC851	TIVPNKKPVIIIVENFLPGWIGGVRIIVEPTK	632
	. . * . * . * * * * * . * . * * * *	

12/12

FIG. 2D

219



223
220

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 01030451 00000000 Folios: 224
Fecha (H/M): 2001-05-15 17:24:52
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 21,053
FECHA : ABRIL 2 DE 2001

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2749343	02/04/2001	17,100,960.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	356,640.00
	TOTAL :	\$ 356,640.00

SOM: TRESCIENTOS CINCUENTA Y SEIS MIL SEISCIENTOS CUARENTA PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 12746-801-001-3

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



224
221

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 01030451 00000000

Folios: 224

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 01 - 16,207
FECHA : MARZO 12 DE 2001

Fecha (AMB): 2001-05-15 17:54:52

Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2749335	12/03/2001	36,451,460.00

***** CONCEPTO *****

CANT. HISTORICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	82 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN RU	100,000.00
	TOTAL :	\$ 1,000.00

SOM: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Colo 12746-801-001-3

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 350 5220
e-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

225
A 22

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

REQUISITOS MINIMOS PAR

Radicación : 01030451 00000000 Folios: 224
Fecha (MD): 2001-05-15 17:24:52
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [4]

MODELO DE UTILIDAD []

- 1 Indicación de que se solicita la concesión de una patente [4]
- 1 Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [4]
- 2 Descripción de la invención [4]
- Dibujos de ser estos pertinentes []
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [4]

223-224.

COMPLETA [4]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

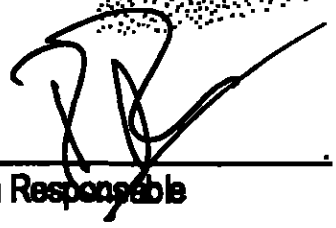
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. []
- Representación gráfica del esquema de trazado []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@ic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

2020
Bogotá, D.C.

Doctor
EMILIO FERRERO

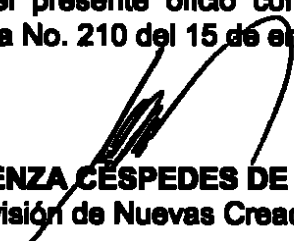
REFERENCIA:	Radicación No.	01-38451
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio No.	1717
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar el poder otorgado al abogado que aparece en la solicitud como apoderado, con el lleno de los requisitos exigidos en el Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredite la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.
- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 26-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

07 JUN. 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de esta plaza, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202027/202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador: 382 0840
Fax: 382 2695
E-mail: info@sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia