

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I.		☒ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)		IDENTIFICACIÓN	
Nombre: The Regents of the University of California		C.C. ☐ NIT: ☐	
Dirección: 1111 Franklin Street, 12th Floor Oakland, California 94607-5200 Estados Unidos		C.E. ☐ OTRO ☐	
Nacionalidad o domicilio: Oakland, California		Cual	
Lugar de constitución: Oakland, California, Estados Unidos		NÚMERO	
Teléfono:		Fax:	
E. Mail:			
3) REPRESENTANTE APODERADO		IDENTIFICACIÓN	
Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN		C.C. ☒ NIT: ☐	
Dirección: Carrera 11 N°. 93-43 Of. 404 Santafé de Bogotá D.C.		C.E. ☐ OTRO ☐	
Teléfono: 6350835 Fax: 6350824		NÚMERO: 41.654.882	
E. Mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co		TP: 20824 CSJ	
4) INVENTOR (ES) (72)			
Nombre: 1) FEDERICI, Brian, A.; 2) BIDESHI, Dennis, K; 3) PARK Hyun-Woo; 4) WIRTH, Margaret, C.; 5) HWANG, Sung-Hel			
Dirección: 1) 4995 Chicago Avenue, Riverside, CA 92507 USA. 2) 1093 Mako Lane, Perris, CA 92571 USA. 3) 802 Grape Street, Riverside, CA 92507 USA. 4) 2094 Bronson Way, Riverside, CA 92508 USA. 5) 10963 Evans, Street, Loma Linda, CA 92354 USA			
Nacionalidad o Domicilio: California, Estados Unidos			
5) PCT (86)			
Solicitud Internacional No. PCT/US1/25543 Fecha: Agosto 14, 2001			
Publicación Internacional No. WO 02/13806 A3 Fecha: Febrero 21, 2002			
6) Título (54) BACTERIA INSECTICIDA MEJORADA Y MÉTODOS PARA ELABORARLA Y USARLA			
7) Clasificación Internacional (51) A01N 63/00, C12N 1/21, 15/32, 15/31, 15/83, 15/67, 15/75			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ N ☐		Estados Unidos	Ago. 14/2000
9) Comprobante de pago N° 03-1.127 Fecha: Enero 8, 2003			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página			



2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900170009-2

Radicación : 83812578 00000000

Folios: 175

Fecha (MM): 2003-02-14 16:18:45

Trámite : 811 PCT-PATENT 379 FASE NAC1 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 1,127
FECHA : ENERO 3 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	V. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	5001703	08/01/2003	895,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITIVO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
	TOTAL :	400,000.00

CON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N.º. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☒ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☒ Copia del ~~examen~~ preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ 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 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros
 1. Notificación de la presentación y transmisión de la prioridad
 2. Publicación Internacional WO 02/13606 A3
 3. Notificación de la transmisión del examen preliminar
 4. Reporte de búsqueda internacional

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:

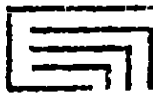
12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.182 de Bogotá TP. 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina



Clarke, Modet & Co.

E-MAIL: clarkemo@colomnet.net.co
SANTAFÉ DE BOGOTÁ, A.A. 92397
COLOMBIA

17 258

4

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s) **Julie Serracino**

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legal(es) de
The Regents of the University of California
una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, California 94607-520 USA
y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a
favor de **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, con Cédula de
Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y
CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía
No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Santa
Fé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en
nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante
cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente
ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo,
Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otra en lo
referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutela y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistír, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistír a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 6) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 7) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de de

By: *Julie Serracino*
Firma / signature

Name: **Julie Serracino**
Title: **Business Manager**

Recibo:
Claudio Lucio Carro
C.P. 40.017.374 Tunja
T.P. 36.448 C.S. 107

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned **Julie Serracino**

legal representative(s) of **THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA**

an organization existing under the laws of
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, California 94607-5200, US.
and in present execution of its business activity, domiciled at

do hereby grant **POWER OF ATTORNEY** to **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, Identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, tp. 36448, Identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Santa Fé de Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models, Designs, vegetal varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewal, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewal or extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 6) To ratify or not the officious agency.
- 7) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at **San Francisco, CALIF**

on this **14th** day of **December**, 1999

Esta copia coincide con original que se encuentra en la viala. Santa Fé de Bogotá.
03 ENE 2000
ALIRIO VIRVICAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (ENC)
[FTE.AVI]

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es SOCIEDAD)

(Poderes otorgados en: El Salvador, Estados Unidos, México y Venezuela)

A los _____ días del mes de _____ de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado _____ firmó de su puño y letra el documento que antecede.

2. Conoce al (a la) otorgante y que este (a) está legalmente capacitado para el otorgamiento.

3. El otorgante ha firmado el referido documento en su carácter de _____ de la persona jurídica _____

4. La citada persona jurídica con sede en _____ está legalmente constituida, que tiene actualmente existencia legal y que el acto para el cual se ha otorgado este poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. El otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta, que esta es legítima y que está facultado para otorgar este poder.

6. Las anteriores certificaciones de los puntos 3, 4 y 5, me constan porque he tenido a la vista los documentos auténticos.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consol de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

CERTIFICADO NOTARIAL (Cuando el solicitante es INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____ de _____, el Notario que suscribe DA FE de que:

1. _____
(nombre de la persona que firma el poder)

mayor de edad y domiciliado en _____ firmó en su presencia el documento que antecede, conoce al otorgante y que este está legalmente capacitado para el otorgamiento.

Notario Público

NOTA: A continuación de lo anterior, el Consol de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

Para todos los demás países el Señor Consol de Colombia o ante quien se otorgue, debe expedir una certificación dejando constancia 1) de la existencia legal de la sociedad, 2) de que esta ejerce actualmente su objeto social, y 3) de que la persona o personas que otorgan el poder están facultadas para hacerlo, dejando constancia así mismo de que tuvo a la vista las pruebas que acreditan tales circunstancias.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is a CORPORATION)

(Powers of attorney granted in: El Salvador, Mexico, U.S.A. and Venezuela)

This _____ day of _____ the undersigned Notary CERTIFIES that:

1. _____
(name of the person who signs the power of attorney)

_____ of legal age and domiciled in _____ set his hand on the foregoing document.

2. The grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

3. The grantor has executed the foregoing document in his capacity of _____ of the juridical person _____

4. The mentioned juridical person with place of business in _____

is duly organized, has actual legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. The grantor has in fact the referred quality and that his/her representation is legal and that he/she is empowered to grant this power of attorney.

6. I have based the above certifications 3, 4 and 5, on the authentic documents which for such purpose were exhibited to me.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consol must legalize the signature of the Notary Public.

NOTARIAL CERTIFICATE (When the applicant is an INDIVIDUALS)

On this _____ day of _____ the undersigned Notary CERTIFIES that:

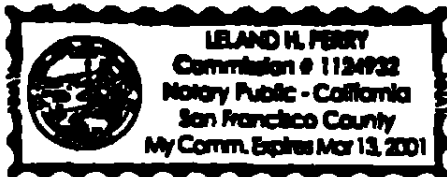
1. _____
(name of the person who signs the Power of Attorney)

_____ of legal age and domiciled at _____ signed in his presence the foregoing document, the grantor is to him personally known and that he/she has legal capacity to execute the document.

Notary Public

NOTA: Then the Colombian Consol must legalize the signature of the Notary Public.

For all other countries the Colombian Consol or before whom it is granted must issue a certification stating 1) the legal existence of the corporation, 2) that the corporate purposes are actually being accomplished, 3) that the person or persons who grant this Power of Attorney are empowered to do it. The Consol will certify also that the documents evidencing those circumstances were exhibited to him.



STATE OF CALIFORNIA
CITY AND COUNTY OF SAN FRANCISCO

GENERAL-PURPOSE
ACKNOWLEDGEMENT

ON December 14 1999 BEFORE ME LELAND H. PERRY
THE UNDERSIGNED NOTARY PUBLIC, PERSONALLY APPEARED
JULIE SARRACINO

PERSONALLY KNOWN TO ME (OR PROVED TO ME ON THE BASIS OF SATISFACTORY EVIDENCE) TO BE THE PERSON(S) WHOSE NAME(S) IS/ARE SUBSCRIBED TO THE WITHIN INSTRUMENT AND ACKNOWLEDGED TO ME THAT HE/SHE/ THEY EXECUTED THE SAME IN HIS/HER/ THEIR AUTHORIZED CAPACITY(IES) AND THAT BY HIS/HER/ THEIR SIGNATURE(S) ON THE INSTRUMENT THE PERSON(S) OR THE ENTITY UPON BEHALF OF WHICH THE PERSON(S) ACTED, EXECUTED THE INSTRUMENT.

WITNESS MY HAND
AND OFFICIAL SEAL

State of California
City and County of San Francisco

I, Edwin M. Lee, Acting County Clerk in and for the City and County of San Francisco, DO HEREBY CERTIFY: That

LELAND H. PERRY

whose name is subscribed to the attached certificate of acknowledgment, proof or affidavit, was at the time of taking said acknowledgment, proof or affidavit, a Notary Public in and for the City and County of San Francisco, duly commissioned and sworn in said City and County, and was on such, an officer of said State, duly authorized by the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify the proof and acknowledgment of deeds and other instruments in writing to be recorded in said State, and that full faith and credit are and ought to be given to his or her official acts; that the certificate of such officer is required to be under seal; that the impression of his or her official seal is not required by law to be on file in the office of the County Clerk. I further certify that I am well acquainted with the handwriting of said notary and verily believe that the signature to the attached certificate is genuine, and further that the annexed instrument is executed and acknowledged according to the laws of the State of California.

In witness whereof, I have hereunto set my hand and entered the seal of the County Clerk, in and for the City and County of San Francisco.

Dated:

DEC 14 1999

Edwin M. Lee
Acting County Clerk

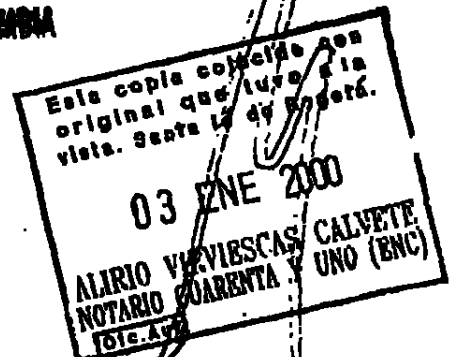
3419



CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
San Francisco, California

Fecha 15 DE DICIEMBRE DE 1999 No. 3823
El suscrito Consul General de Colombia CERTIFICA que EDWIN M. LEE quien autoriza el presente documento, ejercia legalmente, en la fecha alli expresada, las funciones de SUPERVISOR DE NOTARIOS DE SAN FRANCISCO, CALIFORNIA y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales. El Consulado no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento.

FORNIA NOTARIO
CONSUL GENERAL DE COLOMBIA



PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE
Y DERECHOS CONSULARES

US \$ 22.-

signed: 6

LEWIS & CLARK
Commission
of the
United States
of America

27

[Signature]

SECRET
1959 DEC 27 08 23
REPUBLICAN REPUBLIC

[Signature]

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Esta copia coincide con
original por tener a la
vista. Se da fe de ello.
03 ENE 2000
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (ENC)
1010-400

NOTORIAL CERTIFICATE

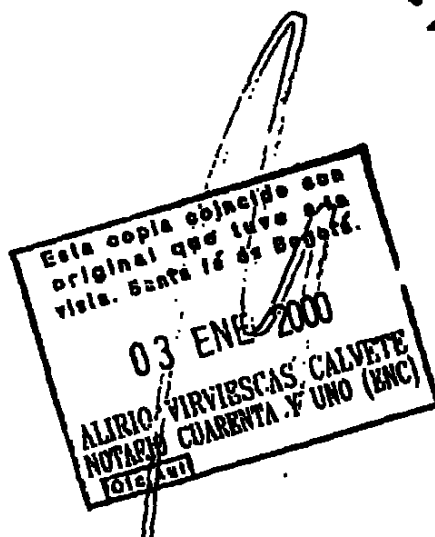
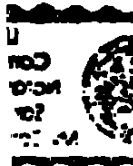
I, Julie Sarracino, have the legal capacity to sign all documents related to the filing and prosecution of United States and Foreign utility and design Patent Applications on behalf of The Regents of the University of California, a corporation duly organized and existing under the laws of the State of California, whose home office is located in Oakland, California, USA.

I, Julie Sarracino, am authorized to sign all documents in the name of said corporation and that the purposes for which said instrument is granted are within the scope of the object or activities of said corporation.

The foregoing is based on a letter dated March 17, 1999 from J. Michael Bishop, M.D., Chancellor of The Regents of the University of California, and an Attestation dated June 2, 1999 from Joel Kirschbaum, Interim Director of the Office of Technology Management of The Regents of the University of California.

Signed: *Julie Sarracino*

Dated: 12/14/99



2

TRADUCCION OFICIAL No.1033/99.-

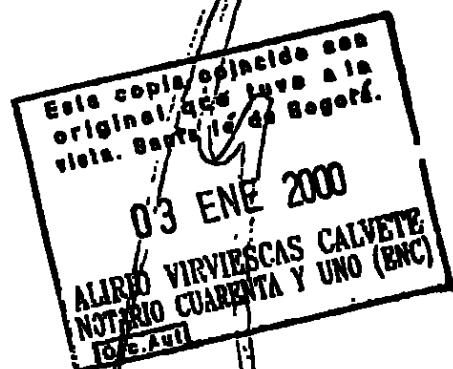
EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS, Y LLEVA EL SELLO Y LA FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGUN RESOLUCION No. 3613 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE APARECEN EN EL PODER OTORGADO POR JULIE SARRACINO, REPRESENTANTE LEGAL DE THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA, UNA SOCIEDAD QUE EXISTE BAJO LAS LEYES DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, DOMICILIADA EN EL 1111 FRANKLIN STREET, PISO 12, OAKLAND, CALIFORNIA 94607-5200, ESTADOS UNIDOS, A LAS DOCTORAS DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN Y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, OTORGADO Y FIRMADO EN SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, EL 14 DE DICIEMBRE DE 1999.
FIRMADO: JULIE SARRACINO, GERENTE COMERCIAL

CERTIFICADO NOTARIAL

Yo, Julie Sarracino, tengo la condición legal para firmar todos los documentos relacionados con la radicación y obtención de Solicitudes de Patente de utilidad y diseño de los Estados Unidos y Extranjeras a nombre de The Regents of the University of California, una sociedad debidamente organizada y existente bajo las leyes del Estado de California, cuya casa matriz está situada en Oakland, California, Estados Unidos de América.

1



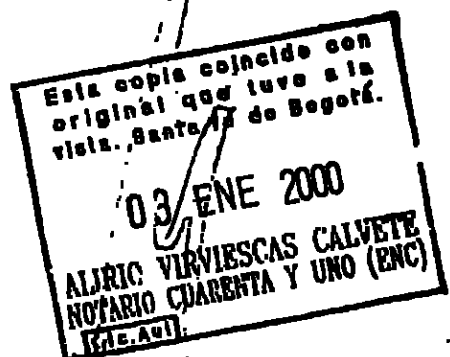
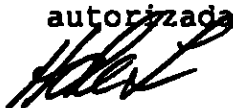
Yo, Julie Sarracino, estoy autorizada para firmar todos los documentos a nombre de dicha sociedad y los fines para los cuales se otorga dicho instrumento están dentro del alcance del objeto o actividades de la mencionada sociedad.

Lo anterior está basado en una carta de fecha 17 de marzo de 1999 de J. Michael Bishop, M.D., Canciller de The Regents of the University of California y en una autenticación de fecha junio 2 de 1999 de Joel Kirschbaum, Director Interino de la Oficina de Administración Tecnológica de The Regents of the University of California.

FIRMADO POR: JULIE SARRACINO FECHA: 12/14/99

ESTADO DE CALIFORNIA - CIUDAD Y CONDADO DE SAN FRANCISCO
AUTENTICACION PARA PROPOSITOS GENERALES

El 14 de diciembre de 1999, ante mi Leland H. Perry, el suscrito Notario Público, compareció personalmente JULIE SARRACINO a quien conozco personalmente (o quien me probó sobre la base de evidencia satisfactoria) como la persona cuyo nombre suscribe el anterior instrumento y reconoció ante mi que ella suscribió el mismo en su condición autorizada y que mediante su firma en el instrumento



mencionado la persona o entidad en cuyo nombre actuó la persona, suscribió el instrumento.

EN EVIDENCIA DE LO CUAL, pongo mi firma y sello oficial.

FIRMADO Y SELLADO POR: LELAND H. PERRY, NOTARIO PUBLICO
- CALIFORNIA, CONDADO DE SAN FRANCISCO. COMISION #
1124932, EXPIRA EL 13 DE MARZO DEL 2001.

ESTADO DE CALIFORNIA - CIUDAD Y CONDADO DE SAN FRANCISCO

Yo, Edwin M. Lee, Funcionario del Condado Encargado en y para la Ciudad y Condado de San Francisco, POR EL PRESENTE CERTIFICO que LELAND H. PERRY, cuyo nombre suscribe el certificado de autenticación, prueba, o declaración juramentada del instrumento anexo, era en el momento de tomar dicha autenticación, prueba, o declaración juramentada, Notario Público en y para la ciudad y Condado de San Francisco, debidamente, comisionado y juramentado, en dicha ciudad y condado y como tal estaba un funcionario de dicho estado debidamente autorizado por las leyes de dicho Estado, para tomar y certificar el mismo, así como hacer y tomar autenticaciones y pruebas de escrituras y otros instrumentos por escrito que deban ser reportados en el mencionado estado y que a sus actos oficiales debe



TRADUCCION OFICIAL N .1033/99.-

dárseles plena fe y credibilidad; que el certificado de dicho funcionario se requiere que sea expedido bajo su sello; que no se requiere por ley que la impresión de su sello oficial esté registrado en este despacho. Certifico además que estoy familiarizado con la letra del mencionado Notario Público y creo fielmente que la firma que aparece en el certificado adjunto es auténtica y además que el instrumento adjunto está suscrito y autenticado de conformidad con las leyes del Estado de California.

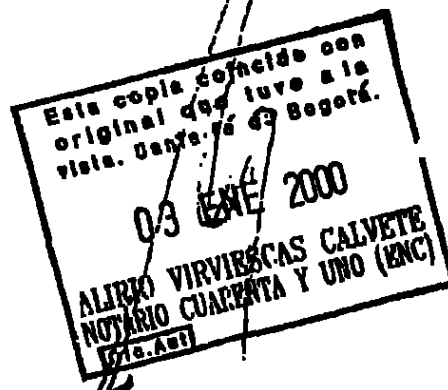
EN EVIDENCIA DE LO CUAL, he puesto mi firma y el sello del Funcionario del Condado en y para la Ciudad y Condado de San Francisco.

Fecha: Diciembre 14 de 1999.

FIRMADO POR: EDWIN M. LEE. HAY SELLO EN RELIEVE DEL FUNCIONARIO DEL CONDADO Y LA CIUDAD DE SAN FRANCISCO.

SIGUE AUTENTICACION DE LA FIRMA QUE PRECEDE POR EL CONSULADO DE COLOMBIA EN SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, BAJO EL NUMERO 3823 Y AUTENTICACION DE LA FIRMA DEL CONSUL POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA EN BOGOTA, BAJO EL NUMERO 433709 DEL 27 DE DICIEMBRE DE 1999

LA TRADUCTORA OFICIAL
Alfredo Virviescas Calvete



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

347017

HELCAN 02/11/55

HA APARECIDO EN EL
DIA DESEMPENA
INDICADAS

DE
DEL TEXTO

09 DIC 55 A 11:55

ELIZACIONES
SANTA DE MICHUAN D. F.

Este copia colgada con
original que tuvo a la
vista. Conto de la
03 ENE 2000
ALIRIO VIRVIESCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (BNC)
1972.10.17

State of California

SECRETARY OF STATE CERTIFICATE OF STATUS

I, BILL JONES, Secretary of State of the State of California, hereby certify:

That on the 18th day of June, 1868,

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

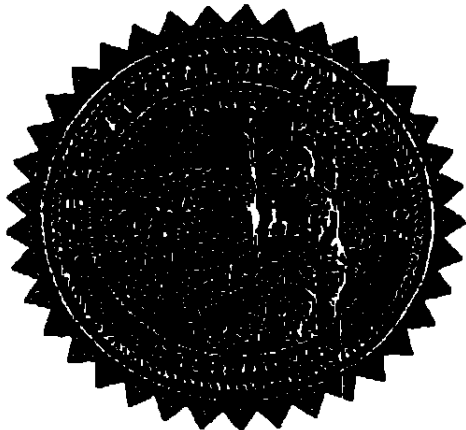
(Corporate number C0008116)

became incorporated under an Act of Legislature of the State of California entitled, "An Act to Create and Organize the University of California"; and,

That the corporation is governed by the provisions of Article IX, Section 9 of the Constitution of the State of California and Education Code Sections 92000, et seq; and,

That no record exists in this office of a certificate of dissolution of said corporation nor of a court order declaring dissolution thereof, nor of a merger or consolidation which terminates its existence; and,

That no information is available in this office on the financial condition, business activity or practices of this corporation.

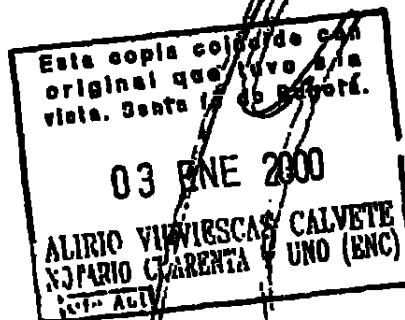


*IN WITNESS WHEREOF, I execute
this certificate and affix the Great
Seal of the State of California this*

19th day of May, 1898

Bill Jones
Secretary of State

CS- 17 3576



12.

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
595 MARKET STREET, SUITE 2130
SAN FRANCISCO, CALIFORNIA 94105

LA SUSCRITA CONSUL GENERAL DE COLOMBIA

SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

**No. 2079
CERTIFICA:**

Que el señor **BILL JONES**, quien autoriza el PODER ADJUNTO, ejercía legalmente en la fecha allí indicada las funciones de **SECRETARIO DE ESTADO** del Estado de **CALIFORNIA** y que la firma y sello que en el documento aparecen como suyos son los que usa y acostumbra en sus actos oficiales.

Que tuvo a la vista las pruebas de que la corporación "**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA**" tiene su domicilio en el número 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, California, Zip Code 94607-5200 de los Estados Unidos de America, que existe legalmente y que ejerce su objeto social de acuerdo con las leyes del Estado de California, Estados Unidos de América.

Que el señor **JULIE SARRACINO**, está autorizado para representar a la corporación "**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA**", así como para firmar y presentar los documentos de carácter legal, diseñar Patentes y en fin realizar todos los actos necesarios en beneficio de la corporación antes citada.

Esta certificación se expide en cumplimiento al artículo No. 480 del Código de Comercio de la República de Colombia.

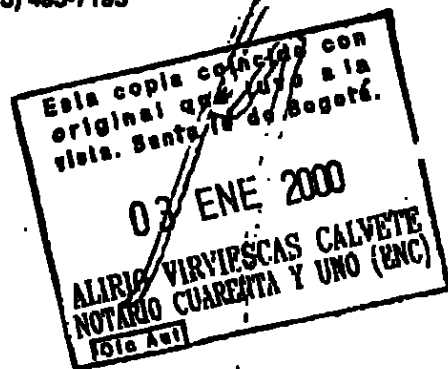
La Cónsul no asume responsabilidad por el contenido ni la legalidad de los documentos presentados para la expedición de ésta certificación.

Se firma en San Francisco, a los Quince (15) días del mes de DICIEMBRE de mil Novecientos Noventa y Nueve (1999).


FANNY MARGARITA MONCAYO DUQUE
CONSUL GENERAL DE COLOMBIA

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES US\$107.00

Cables: CONSULBIA SANFRANCISCO - Telefono: (415) 495-7195
email: colombia@pacbell.net
Tele Fax: (415) 777-3731



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

SECRETARÍA DE RELACIONES
EXTERIORES

1530 CCF 27 15 12-13

SECRETARÍA DE RELACIONES
EXTERIORES

Este copia coincide con
original que fue
visto. Fecha de
03 ENE 2013
ALIRIO VIVIERCAS CALVETE
NOTARIO CUARENTA Y UNO (ENC)

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

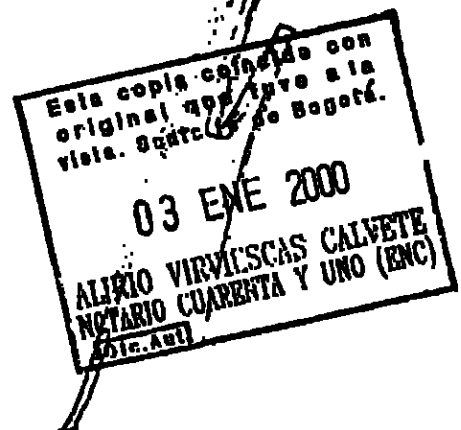
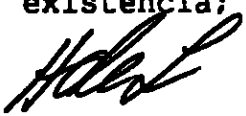
CERTIFICADO DE CONDICION LEGAL

Yo, BILL JONES, Secretario de Estado del Estado de California, por el presente certifico: Que el día 18 de junio de 1868, THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (Número Corporativo C0008116)

fue constituida bajo una Ley de la Legislatura del Estado de California titulada "Una Ley para Crear y Organizar a la Universidad de California", y,

Que la sociedad está regida por las disposiciones del Artículo IX, Sección 9 de la Constitución del Estado de California y las Secciones del Código de Educación 92000 y siguientes; y,

Que no existe ningún registro en este despacho de un certificado de disolución de dicha sociedad ni de una orden judicial declarando la disolución de la misma, ni de una fusión o consolidación que de por terminada su existencia; y,



TRADUCCION OFICIAL N .1033/99.-

Que no hay información disponible en este despacho sobre la condición financiera, la actividades o prácticas comerciales de esta sociedad.

EN EVIDENCIA DE LO CUAL, suscribo este certificado e impongo el Gran Sello del Estado de California, hoy día 19 de Mayo de 1998.

FIRMADO POR: BILL JONES, SECRETARIO DE ESTADO

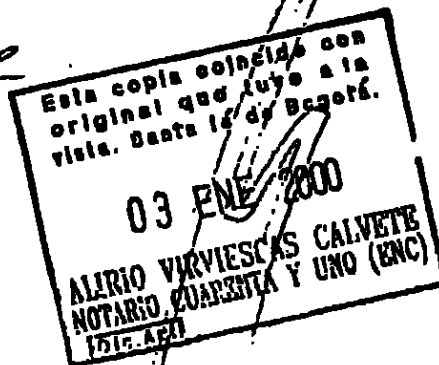
HAY SELLO EN RELIEVE DEL SECRETARIO DE ESTADO

SIGUE CERTIFICACION (EN ESPAÑOL) EXPEDIDA POR EL CONSULADO DE COLOMBIA EN SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, BAJO EL NO. 2079 Y AUTENTICACION DE LA FIRMA DEL CONSUL POR EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA EN BOGOTA, BAJO EL NUMERO 433710 DEL 27 DE DICIEMBRE DE 1999

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helen White de Lencina

6



CM
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HYMAN, Laurence, J.
Townsend and Townsend and Crew LLP
Two Embarcadero Center
Eighth Floor
San Francisco, CA 94111
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2001 (23.10.01)	
Applicant's or agent's file reference 2307O-1135PC	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US01/25543 ✓	International filing date (day/month/year) 14 August 2001 (14.08.01) ✓
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 14 August 2000 (14.08.00) ✓
Applicant THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(a) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
14 Augu 2000 (14.08.00)	09/639,576	US	27 Sept 2001 (27.09.01)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Carlos NARANJO Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

Form PCT/IB/304 (July 1998)

004381883
RM

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US01/25543

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SH
HYMAN, Laurence, J.
Townsend and Townsend and Crew LLP
Two Embarcadero Center
Eighth Floor
San Francisco, CA 94111
United States of America

Date of mailing (day/month/year)

28 November 2002 (28.11.02)

Applicant's or agent's file reference

23070-1135PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US01/25543 ✓

International filing date (day/month/year)

14 August 2001 (14.08.01) ✓

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

PARK, Hyun-Woo
802 Grape Street
Riverside, CA 92507
United States of America

State of Nationality

KR

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

PARK, Hyun-Woo
7450 Northrop Dr.
Riverside, CA 92508
United States of America

State of Nationality

KR

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Laurence GALLAY

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Form PCT/IB/308 (March 1994)

005307185

AM

PATENT COOPERATION TREATY

1.01/0001/25543

17

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SZL

HYMAN, Laurence, J.
Townsend and Townsend and Crew LLP
Two Embarcadero Center
Eighth Floor
San Francisco, CA 94111
United States of America

Date of mailing (day/month/year)

28 November 2002 (28.11.02)

Applicant's or agent's file reference

23070-1135PC

International application No.

PCT/US01/25543 ✓

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

14 August 2001 (14.08.01) ✓

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

BIDESHI, Dennis, K.
1093 Mako Lane
Perris, CA 92571
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

BIDESHI, Dennis, K.
862 Pheasant Street
Corona, CA 92881
United States of America

State of Nationality

US

State of Residence

US

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the International Searching Authority



the International Preliminary Examining Authority



the designated Offices concerned



the elected Offices concerned



other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Laurence GALLAY

LG

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

17
23070-113500PC

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 February 2002 (21.02.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/13606 A3

(51) International Patent Classification¹: A01N 63/00.
C12N 1/21, 15/31, 15/32, 15/63, 15/67, 15/75

(21) International Application Number: PCT/US01/25543

(22) International Filing Date: 14 August 2001 (14.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/639,576 14 August 2000 (14.08.2000) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE
REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
[US/US]: 1111 Franklin Street, 12th Floor, Oakland, CA
94607-5200 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): FEDERICI, Brian,
A. [US/US]: 4995 Chicago Avenue, Riverside, CA 92507
(US). BIDESHI, Dennis, K. [US/US]: 1093 Moku Lane,
Perris, CA 92571 (US). PARK, Hyun-Woo [KR/US]:
802 Grape Street, Riverside, CA 92507 (US). WIRTH,
Margaret, C. [US/US]: 3094 Bronson Way, Riverside, CA
92506 (US). HWANG, Sung-Hel [US/US]: 10963 Evans
Street, Loma Linda, CA 92354 (US).

(74) Agents: HYMAN, Lawrence, J. et al.: Townsend and
Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, Eighth
Floor, San Francisco, CA 94111 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
6 June 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: IMPROVED INSECTICIDAL BACTERIA, AND METHODS FOR MAKING AND USING THEM

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid sequences comprising a Btl or Btl1 promoter, or a combination of a Btl and a Btl1 promoter, at least 6 contiguous nucleotides of a bacterial STAB-51) sequence, and a sequence encoding a polypeptide with at least 80% sequence identity to a 41.9 kD protein of the B. sphaericus ("Bs") binary toxin, which polypeptide has at least 50% of the toxicity of the native 41.9 kD protein. Optionally, the sequence further encodes a second polypeptide with at least 80% sequence identity to the 51.4 kD protein of the Bs binary toxin and which can function as a binding domain for the Bs 41.9 kD toxin protein. When the nucleic acid sequences are expressed in B. thuringiensis ("Bt") or Bs cells, they result in at least 10 times the production of Bs binary toxin compared to untransformed Bs cells. The invention provides nucleic acid sequences, expression vectors, host cells, and methods of increasing the toxicity of an insecticidal bacterium by transforming the bacterium with nucleic acid sequences of the invention. Further, the invention relates to the discovery that the Cyt1Aa1 protein of Bt subspecies israelensis ("Bti") reverses resistance to Bs binary toxin in larvae of Bs-resistant mosquitoes. The invention provides Bs cells expressing Bti Cyt1Aa1 protein, and methods of reducing resistance to Bs binary toxin by co-administering the Cyt1Aa1 protein with Bs binary toxin.

19

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
LAURENCE J. HYMAN
TOWNSEND AND TOWNSEND AND CREW LLP
TWO EMBARCADERO CENTER, EIGHTH FLOOR
SAN FRANCISCO, CA 94111-3834

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of Mailing
(day/month/year)

03 SEP 2002

Applicant's or agent's file reference

23070-1135PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/US01/25543 ✓

International filing date (day/month/year)

14 August 2001 (14.08.2001) ✓

Priority date (day/month/year)

14 August 2000 (14.08.2000) ✓

Applicant

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA ✓

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

2-14-03

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices)(Article 39(1))(see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. (703)305-3230

Form PCT/IPEA/416 (July 1992)

Authorized officer

Gabriele E. BUGAISKI

Telephone No. 703) 308-0196

PC-2PGR REC'D: 12-14-02
12/14/02

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 23070-1135PC	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/US01/25543	International filing date (day/month/year) 14 August 2001 (14.08.2001)	Priority date (day/month/year) 14 August 2000 (14.08.2000)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC IPC(7): A01N 63/00; C12N 1/21, 15/31, 15/32, 15/63, 15/67, 15/75 and US Cl.: 424/93.2, 435/69.1, 480, 485, 252.3, 252.31, 320.1, 480, 485; 536/23.7		
Applicant THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.
- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 0 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:
- I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of report with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 February 2002 (25.02.2002)	Date of completion of this report 30 July 2002 (30.07.2002)
Name and mailing address of the IPEA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Gabriele E. Bugaisky</i> Gabriele E. BUGAISKY Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/IPEA/409 (cover sheet)(July 1998)

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed.
- ☒ the description:
pages 1-46 _____ as originally filed
pages NONE _____, filed with the demand
pages NONE _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims:
pages 47-57 _____, as originally filed
pages NONE _____, as amended (together with any statement) under Article 19
pages NONE _____, filed with the demand
pages NONE _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings:
pages 1-5 _____, as originally filed
pages NONE _____, filed with the demand
pages NONE _____, filed with the letter of _____.
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages NONE _____, as originally filed
pages NONE _____, filed with the demand
pages NONE _____, filed with the letter of _____.

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in printed form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☒ the description, pages none
- ☒ the claims, Nos. none
- ☒ the drawings, sheets/fig none

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

22

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/US01/25543

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims <u>1-100</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>1-100</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-100</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

Claims 1-100 meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(4), because the prior art does not teach or fairly suggest the instant *B. t.* gene constructs. Please note that the sequence diskette submitted 12 November 2001 was defective so that no sequences were searched for the 210; this examination is based solely upon the word search.

23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US01/25543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A01N 63/00; C12N 1/21, 15/31, 15/32, 15/63, 15/67, 15/75		
US CL : 434/93.2, 435/69.1, 480, 485, 252.3, 252.31, 320.1, 480, 485; 536/23.7		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
U.S. : 424/93.2, 435/69.1, 697, 173.8, 480, 485, 252.3, 252.31, 320.1, 480, 485; 536/23.7, 24.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P. A	PARK et al. Construction and characterization of a recombinant <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> strain that produces CryI (B). <i>J. Invertebrate Pathology</i> , July 2001, Vol. 78, No. 1, pages 37-44, especially materials and methods.	1-100
A	PARK et al. Optimization of Cry3A Yields in <i>Bacillus thuringiensis</i> by Use of Sporulation-Dependent Promoters in Combination with the STAB-SD mRNA Sequence. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , October 1998, Vol. 64, No. 10, pages 3932-3938, entire document.	1-100
A	PONCET et al. Improvement of <i>Bacillus sphaericus</i> toxicity against dipteran larvae by integration, via homologous recombination, of the CryIIA toxin gene from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i> . <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , Nov. 1997, Vol. 63, No. 11, pages 4413-4420, entire document..	1-100
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special Categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" Later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier applications or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 March 2002 (26.03.2002)		16 APR 2002
Name and mailing address of the ISA/US Communications in Patents and Trademarks Box 1417 Washington, D.C. 20531		Authorized officer Gabriele E. HUGARSKY
Facsimile No. (703) 305-3230		Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US01/25543

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST databases USPT, PGPB, EPAB, JPAB, DWPI; DIALOG files 411, 155, 5, 357, 34, 434, 35, 76, (databases DIALINDEX [alliance]), MEDLINE, Biosis, Derwent Biotechnology Abs, SciSearch, Dissertation Abs Online, Life Sciences Collection,

search terms: sphaericus, duringiensis, fuv?, chimera?, stab?, binary, toxin, bin?3, hti, hti?, promoter, regulatory

25

```

      10      20      30      40      50      60
      *      *      *      *      *      *
GAATTCTATTTTCGATTTCAAATTTTCCAAACTTAAATATGATTGAATGCCTGAGAANG.

      70      80      90      100     110     120
      *      *      *      *      *      *
TAATAGAGATGTTTTAGTTTATTATGAAGTATTAGGGGCGTCTTTTAAATTCAATCTATC

      130     140     150     160     170     180
      *      *      *      *      *      *
AATTGTGAAATATATTACTCAAAACCCAATACCATTCTAAAACCTATTCAAAATATATA

      190     200     210     220     230     240
      *      *      *      *      *      *
TTGCTTTAAAGAGCATACTACTAAAAAACAGGCATCTTTCGAACTATAGCGCATAGA
                                -35  SIGMA E  -10

      250     260     270     280     290     300
      *      *      *      *      *      *
ATACTACGGTGAATCAAAAACAAATAAAATTTAGGAGGTATATTCAAGTATACAAAAAAA

      310     320     330     340     350     360
      *      *      *      *      *      *
CTTTAGTGTGAGGGGATTAGATAAAAAGTATTCGTTATCCTTATAAATTAATCTTAAA

      370     380     390     400     410     420
      *      *      *      *      *      *
-35  SIGMA E  -10
CATGCACCAATGTATACATTAAATAATATTATGTGAATTAAGTCTATCAATTTAATTTAT

      430     440     450     460     470     480
      *      *      *      *      *      *
TATGTTACTTTTATATTGATTAAATAATTGCAAGTTTAAAAATCATAATTTAATGTTGAAAG

      490     500     510     520     530     540
      *      *      *      *      *      *
GCCACTATTCTAATTAACCTAAGGAGTTGTTTATTGAGCTCGGTACCCGGGAGATAATct

      550     560     570     580     590     600
      *      *      *      *      *      *
STAB-SD
tGAAAGGAGGaatgccttaaaaacgaagaacattaaaaacatatatttgcacgctctaata

      610     620     630     640     650     660
      *      *      *      *      *      *
gatttatgaaaaatcattttatcaqtttgaattattatgtattatgataagaaagtctacg

      670     680     690     700     710     720
      *      *      *      *      *      *
ACGTTATTTAATGAACTTTTAGGTTTTAAATAATATAATGAGAAGTATTTTTTATCAAT

      730     740     750     760     770     780
      *      *      *      *      *      *
RBS      +1
GATAAGGAGATGAAGAAAGCATGTGCGATTCAAAGACAATTCTGGCGTTTCAGAAAAAT
MetCysAspSerLysAspAsnSerGlyValSerGluLys>
[ 51.4 kilodalton protein >>

      790     800     810     820     830     840
      *      *      *      *      *      *
GCGGAAAGAAATTTACTAATTACCGCTAAATACTACTCCTACAAGCCTAAATTATAACC
CysGlyLysLysPheThrAsnTyrProLeuAsnThrThrProThrSerLeuAsnTyrAsn>

```

Figure 1

850 860 870 880 890 900
* * * * * *
TTCCAGAAATATCAAAAAAATTTTATAACCTTAAGAATAAATATTACCGAATGGTTATG
LeuProGluIleSerLysLysPheTyrAsnLeuLysAsnLysTyrSerArgAsnGlyTyr>
910 920 930 940 950 960
* * * * * *
GTTTATCAAAAACCGAATTTTCCTTCAAGTATCGAAAATTGCCCATCTAACGAATATTCAA
GlyLeuSerLysThrGluPheProSerSerIleGluAsnCysProSerAsnGluTyrSer>
970 980 990 1000 1010 1020
* * * * * *
TAATGTATGATAATAAGATCCTCGATTCTTGATTCCGTTTTTATTAGATGATGTTAGAT
IleMetTyrAspAsnLysAspProArgPheLeuIleArgPheLeuLeuAspAspGlyArg>
1030 1040 1050 1060 1070 1080
* * * * * *
ATATTATTGCAGATAGAGACGATGGAGAAGTTTTTGATGAAGCACCTACTTATTTGGATA
TyrIleIleAlaAspArgAspAspGlyGluValPheAspGluAlaProThrTyrLeuAsp>
1090 1100 1110 1120 1130 1140
* * * * * *
ATAACAATCACCTATCATAAGTAGACATTATACCGGAGAAGAGAGACAAAAGTTTGAGC
AsnAsnAsnHisProIleIleSerArgHisTyrThrGlyGluGluArgGlnLysPheGlu>
1150 1160 1170 1180 1190 1200
* * * * * *
AGGTAGGTAGTGGAGATTATATTACGGGAGAGCAATTTTTTCAATTCTATACACAAAACA
GlnValGlySerGlyAspTyrIleThrGlyGluGlnPhePheGlnPheTyrThrGlnAsn>
1210 1220 1230 1240 1250 1260
* * * * * *
AAACACGTGTATTGTCAAATTGTAGGGCGCTTGACAGTAGGACAATATTACTATCTACTG
LysThrArgValLeuSerAsnCysArgAlaLeuAspSerArgThrIleLeuLeuSerThr>
1270 1280 1290 1300 1310 1320
* * * * * *
CAAAAATCTTCCCAATTTACCTCCAGCTTCTGAAACTCAACTAACAGCTTTTCGTTAATA
AlaLysIlePheProIleTyrProProAlaSerGluThrGlnLeuThrAlaPheValAsn>
1330 1340 1350 1360 1370 1380
* * * * * *
GTTCATTTTATGCTGCGCAATTCCTCAATTACCCCAACATCCTTACTTGAGAATATTTC
SerSerPheTyrAlaAlaAlaIleProGlnLeuProGlnThrSerLeuLeuGluAsnIle>
1390 1400 1410 1420 1430 1440
* * * * * *
CTGAGCCCTACTAGTCTCGATGATTCTGGAGTATTACCAAAAGATGCAGTAAGAGCAGTTA
ProGluProThrSerLeuAspAspSerGlyValLeuProLysAspAlaValArgAlaVal>
1450 1460 1470 1480 1490 1500
* * * * * *
AAGGAAGTGCCTATTACCTTGTATAATAGTACATGATCCTAATTTAAACAATTCGGATA
LysGlySerAlaLeuLeuProCysIleIleValHisAspProAsnLeuAsnAsnSerAsp>
1510 1520 1530 1540 1550 1560
* * * * * *
AAATGAAATTTAATACCTACTATCTTTTAGAATATAAAGAATACTGGCATCAATTATGGT
LysMetLysPheAsnThrTyrTyrLeuLeuGluTyrLysGluTyrTrpHisGlnLeuTrp>
1570 1580 1590 1600 1610 1620
* * * * * *
CACAAATTATACCTGCTCATCAAACTGTAAAAATACAGGAACGAACAGGAATATCTGAAG

Figure 2

27

SerGlnIleIleProAlaHisGlnThrValLysIleGlnGluArgThrGlyIleSerGlu>

1630 1640 1650 1660 1670 1680
* * * * *
TTGTACAAATAGCATGATTGAAGATTTAAATATGTATATTGG/ GCAGATTTTGGCATGC
ValValGlnAsnSerMetIleGluAspLeuAsnMetTyrIleGlyAlaAspPheGlyMet>

1690 1700 1710 1720 1730 1740
* * * * *
TTTTTTATTTTAGATCTAGTGGATTTAAGGAACAAATAACAAGGGGGCTAAATAGGCCTT
LeuPheTyrPheArgSerSerGlyPheLysGluGlnIleThrArgGlyLeuAsnArgPro>

1750 1760 1770 1780 1790 1800
* * * * *
TATCCCAAACGACCACTCAGTTAGGAGAAAGAGTAGAAGAAATGAGTATTATAATTCTA
LeuSerGlnThrThrThrGlnLeuGlyGluArgValGluGluMetGluTyrTyrAsnSer>

1810 1820 1830 1840 1850 1860
* * * * *
ATGATTTGGATGTTAGATATGTGAAATACGCATTGGCTAGAGAATTCACACTAAAACGCG
AsnAspLeuAspValArgTyrValLysTyrAlaLeuAlaArgGluPheThrLeuLysArg>

1870 1880 1890 1900 1910 1920
* * * * *
TTAATGGTGAAATTGTAAAAAATTGGGTTGCTGTAGATTATCGATTGGCAGGTATACAAT
ValAsnGlyGluIleValLysAsnTrpValAlaValAspTyrArgLeuAlaGlyIleGln>

1930 1940 1950 1960 1970 1980
* * * * *
CGTATCCTAATGCACCTATACTAATCCACTTACGCTAACAAAACATACAATTATTCGAT
SerTyrProAsnAlaProIleThrAsnProLeuThrLeuThrLysHisThrIleIleArg>

1990 2000 2010 2020 2030 2040
* * * * *
GTGAAAATAGTTACGATGGACACATATTTAAACACCTTTAATCTTTAAAAATGGTGAAG
CysGluAsnSerTyrAspGlyHisIlePheLysThrProLeuIlePheLysAsnGlyGlu>

2050 2060 2070 2080 2090 2100
* * * * *
TTATTGTAAAAACGAATGAAGAATTAATACCTAAAATTAACCACTGATACTTTAACTTCA
ValIleValLysThrAsnGluGluLeuIleProLysIleAsnGlnStop
> End 51.4 kilodalton protein]

2110 2120 2130 2140 2150 2160
* * * * *
AATATTCATTACCATGTTATTTAAATAGTAGATAGATGAAATAAATAGTATATATTAAG

2170 2180 2190 2200 2210 2220
* * * * *
ACAACAACCTTAATTTTGACACATAAGAATAATTTTAAATGTATAAATAGTATTTAGAGT

2230 2240 2250 2260 2270 2280
* * * * *
GTTATTGCAATATATTTTTTGAAGGGAGCTAAAAGACATGAGAAATTTGGATTTTATTG
MetArgAsnLeuAspPheIle>
[41.9 kilodalton

2290 2300 2310 2320 2330 2340
* * * * *
ATTCTTTTATACCCACAGAAGGAAAGTACATTTCGCGTTATGGATTTTATAATAGCGAGT
AspSerPheIleProThrGluGlyLysTyrIleArgValMetAspPheTyrAsnSerGlu>
protein >

Figure 1

2350 2360 2370 2380 2390 2400
* * * * * *
ATCCTTTCGTATACATGCACCCCTCAGCCCCTAATGGGGATATCATGACAGAAATCTGTA
TyrProPheCysIleHisAlaProSerAlaProAsnGlyAspIleMetThrGluIleCys>

2410 2420 2430 2440 2450 2460
* * * * * *
GCAGAGAAATAATCAATATTTTATTTTTCCTACTGATGATGGTCGAGTAATTATTG
SerArgGluAsnAsnGlnTyrPheIlePhePheProThrAspAspGlyArgValIleIle>

2470 2480 2490 2500 2510 2520
* * * * * *
CAATAGGCATAATGGGTCCGTTTTTACCGGAGAAGCCACAAGTGTAGTATCAGATATCT
AlaAsnArgHisAsnGlySerValPheThrGlyGluAlaThrSerValValSerAspIle>

2530 2540 2550 2560 2570 2580
* * * * * *
ATACTGGTAGCCCATACAGTTTTTTAGAGAGGTCAAAAGAACTATGGCAACTTATTATT
TyrThrGlySerProLeuGlnPhePheArgGluValLysArgThrMetAlaThrTyrTyr>

2590 2600 2610 2620 2630 2640
* * * * * *
TAGCGATACAAAATCCTGAATCCGCAACAGATGTGAGAGCTCTAGAACCACCATTCCTATG
LeuAlaIleGlnAsnProGluSerAlaThrAspValArgAlaLeuGluProHisSerHis>

2650 2660 2670 2680 2690 2700
* * * * * *
AGCTGCCATCTCGCCTTTATTACACTAACAATATTGAAAATAATAGCAACATATTATT
GluLeuProSerArgLeuTyrTyrThrAsnAsnIleGluAsnAsnSerAsnIleLeuIle>

2710 2720 2730 2740 2750 2760
* * * * * *
CTAATAAGGAACAAATATATTTAACCTTGCCCTTCACTTCCAGAAAACGAGCAATACCCTA
SerAsnLysGluGlnIleTyrLeuThrLeuProSerLeuProGluAsnGluGlnTyrPro>

2770 2780 2790 2800 2810 2820
* * * * * *
AAACTCCAGTATTAAGCGGTATCGATGATATAGGACCTAATCAATCAGAGAAATCAATAA
LysThrProValLeuSerGlyIleAspAspIleGlyProAsnGlnSerGluLysSerIle>

2830 2840 2850 2860 2870 2880
* * * * * *
TAGGAAGTACTCTTATCCCATGTATAATGGTTTCGGATTTTATTAGTTTGGGGGAGAGAA
IleGlySerThrLeuIleProCysIleMetValSerAspPheIleSerLeuGlyGluArg>

2890 2900 2910 2920 2930 2940
* * * * * *
TGAAAACCACTCCATATTATTATGTAAAGCACACTCAATATTGGCAAAGCATGTGGTCCG
MetLysThrThrProTyrTyrTyrValLysHisThrGlnTyrTrpGlnSerMetTrpSer>

2950 2960 2970 2980 2990 3000
* * * * * *
CGCTCTTTCCACCCGGCTCTAAAGAGACAAAACTGAGAAATCAGGTATCACTGACACTT
AlaLeuPheProProGlySerLysGluThrLysThrGluLysSerGlyIleThrAspThr>

3010 3020 3030 3040 3050 3060
* * * * * *
CTCAATAAGTATGACTGACGGGATTAATGTTTCAATCGGAGCAGATTTCGGATTAAGGT
SerGlnIleSerMetThrAspGlyIleAsnValSerIleGlyAlaAspPheGlyLeuArg>

3070 3080 3090 3100 3110 3120
* * * * * *

Figure 1

TTGGAAATAAAACGTTTGAATTAAGGGGGGTTTCACCTATGATACAAAGACTCAAATAA
PheGlyAsnLysThrPheGlyIleLysGlyGlyPheThrTyrAspThrLysThrGlnIle>

3130 3140 3150 3160 3170 3180
* * * * * *
CTAATACCTCCCAATTGTTAATAGAAACAACTTATACTAGAGAATACACAAATACAGAAA
ThrAsnThrSerGlnLeuLeuIleGluThrThrTyrThrArgGluTyrThrAsnThrGlu>

3190 3200 3210 3220 3230 3240
* * * * * *
ATTTTCCTGTAGATATACAGGCTATGTTTTCGTCAGAAATTTACTTTACATCGTAGTG
AsnPheProValArgTyrThrGlyTyrValLeuAlaSerGluPheThrLeuHisArgSer>

3250 3260 3270 3280 3290 3300
* * * * * *
ATGGAACTCAGGTTAATACGATCCCATGGGTTGCTTTAAACGATAACTATACAACAATAG
AspGlyThrGlnValAsnThrIleProTrpValAlaLeuAsnAspAsnTyrThrThrIle>

3310 3320 3330 3340 3350 3360
* * * * * *
CAAGATATCCACATTTTGCAGTGAACCTTTACTAGGAAATACAAAGATTATTACAGATG
AlaArgTyrProHisPheAlaSerGluProLeuLeuGlyAsnThrLysIleIleThrAsp>
> end 41.9 kilodalton

3370 3380 3390 3400 3410 3420
* * * * * *
ATCAAACTAAATTTAAACAATATTCTTGAACCTAATAGATGTTAAATAGAACAATTAATA
AspGlnAsnStop
protein]

3430 3440 3450 3460 3470 3480
* * * * * *
ACAATTTAAGTACTTTTGGATTATAGTGAAGGGACCTATAAGCATAGCTTTTAGGTCCT

3490 3500 3510 3520 3530 3540
* * * * * *
TTTAAGTTGCTTTTTTTCGTTTTTGAATAGTATAGATAGGCTACACTACACTAAGTTGG

3550 3560 3570 3580 3590 3600
* * * * * *
ACAGATAAAATAAGGGGTTGTAACTTAGACTATTAAAAAAGGGAGAGTGCTACTATGAC

3610 3620 3630 3640 3650
* * * * *
ACGTCAACATCGAACTTTTACACTCGAATGTAAACTGTTGTTGTTTGGCTGCAG

Figure 1

BACTERIA INSECTICIDA MEJORADA, Y MÉTODOS PARA ELABORARLA
Y USARLA

REFERENCIAS CRUZADAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente estadounidense No. 09/639,576, presentada en agosto 14 de 2000, los contenidos de la cual se incorporan como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

A pesar de los avances en la ciencia médica y las nuevas drogas, la malaria, filariasis, dengue y la encefalitis viral subsisten como enfermedades importantes de los humanos, un estimado de 2 mil millones de personas en todo el mundo viviendo en áreas donde estas son endémicas (The World Health Report - 1999, World Health Organization, Ginebra, Suiza (1999)). Los agentes causantes de estas enfermedades son transmitidas por mosquitos, y por lo tanto los métodos de control de la enfermedad se han basado principalmente en un amplio espectro de insecticidas químicos para reducir las poblaciones de mosquitos. Sin embargo, el uso de

insecticidas químicos se está desfasando en muchos países debido al desarrollo de la resistencia al insecticida en las poblaciones de mosquitos. Adicionalmente, muchos gobiernos restringen el uso de estos químicos en razón de las preocupaciones sobre sus efectos sobre el ambiente, especialmente sobre insectos benéficos no objetivo, y vertebrados a través de la contaminación de alimentos y suministro de agua.

Como resultado de estos problemas, la organización mundial de la salud está facilitando el reemplazo de químicos con insecticidas basados en bacterias a través del desarrollo de estándares para su registro y uso (Guideline specifications for bacterial larvicides for public health use, WHO Document WHO/CDS/CPC/WHOPES/99.2, World Health Organization, Ginebra, Suiza (1999)). Algunos de los productos basados en bacterias se diseñan para controlar las larvas de los mosquitos, los dos más ampliamente utilizados son el Vectobac® y TEKNAR®, los cuales están basados en *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Además, el Vectolex®, un nuevo producto basado en *B. esfericus* ha llegado al mercado recientemente para controlar los vectores mosquitos de filariasis y enfermedades virales. Estos productos han

logrado un moderado éxito comercial, pero su alto costo baja eficacia comparada con muchos pesticidas químicos evitan que sean usados más extensivamente en muchos países en desarrollo. Más aún, han surgido preocupaciones acerca de su utilidad a largo plazo debido a la resistencia, la cual ya ha sido reportada por *B. esfericus* en poblaciones de campo de mosquitos *Culex* en India, Brasil, y Francia (Sinègre, et al. First field occurrence of *Culex pipiens* resistance to *Bacillus sphaericus* in southern France, VII European Meeting, Society for Vector Ecology, 5-8 Sept. Barcelona, España (1994); Rao et al., J Am. Mosq. Control Assoc. 11:1-5 (1995); Silva-Filha et al., J Econ. Entomot 88: 525-530 (1995)).

Las propiedades insecticidas de estas bacterias son debidas principalmente a proteínas insecticidas producidas durante la esporulación. En *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti), las proteínas clave son Cyt1A (27 kDa), Cry11A (72 kDa), Cry4A (128 kDa) y Cry4B (134 kDa), mientras el *B. esfericus* (Bs) produce proteínas 41- y 52-KDA que sirven, respectivamente como la toxina en los dominios ligantes de una toxina urinaria simple (Federici et al. in Bacterial Control Of Mosquitoes And Blackflies,

eds.: de Barjac & Sutherland, D. J, 11-44 (Rutgers University Press, New Brunswick, NJ) (1990); Baumann et al., Microbiot Rev. 55: 425-436 (1991)).

Diferencias bioquímicas y toxicológicas en las toxinas Bti y Bs sugieren que sería posible construir una bacteria mejorada al combinar sus toxinas en una bacteria simple. Se han hecho numerosos intentos de utilizar esta aproximación durante la pasada década para crear una bacteria recombinante con la toxicidad deseada. Varios grupos por ejemplo, han introducido genes de toxina Bti en Bs. Por ejemplo, Bar et al., J. Invertebrate Pathol. 57: 149-158 (1991) clonaron genes de endotoxina Bti en Bs 2362, pero encontraron que la actividad biológica del organismo recombinante era inferior que la de Bti. Poncet et al., Fems Microbiol Lett. 117: 91-96 (1994) clonaron los genes Cry4B y Cry11A de Bti en Bs 2297, y Poncet et al., Appl Environ. Microbiol. 63: 4413-4420 (1997) introdujeron el gen Cry11A en la misma cepa mediante recombinación homóloga. Thiery et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3910-3916 (1998) introdujeron un gen Bt cyt1Ab1 pero reportaron que el nivel de expresión del gen cyt1Ab1 era probablemente demasiado bajo para tener cualquier efecto significativo sobre la toxicidad.

Servant et al., Appl Environ Microbiol. 65: 3021-3026 (1999) introdujeron toxinas Cry11A and Cry11Ba Bt en Bs 2297 mediante recombinación in vivo, y mostraron que el campo de actividad del huésped se puede incrementar de esta forma. Bourgouin et al., Appl. Environ Microbiol. 56: 340- 344 (1990) introdujeron toxina Bs en Bti, pero no encontraron efecto sinérgico o aditivo entre las toxinas contra las larvas del mosquito. Los intentos para combinar las ventajas de Bs en Bt de otras maneras no han probado aparentemente su uso comercial. Cultivos de crecimiento simples de Bs y Bt y luego la combinación de los organismos, por ejemplo, no es efectiva porque las esporas de los dos organismos son consideradas para formar una proporción demasiado grande de la mezcla resultante en proporción a los pesos de las toxinas para suministrar una toxicidad adecuada.

El desarrollo comercial de los nuevos biopesticidas es costoso en parte porque las regulaciones de EPA requieren de ensayos extensivos, y los márgenes son relativamente bajos para, por ejemplo, agentes farmacéuticos. No parece que cualquiera de los organismos recombinantes reportados en la pasada década hayan mostrado suficiente mejora sobre las cepas Bti or

Bs comerciales para garantizar el desarrollo para uso comercial en el control de mosquitos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención suministra listas de secuencias de nucleótidos, vectores de expresión, células huésped y métodos para lograr el alto nivel de expresión de la toxina urinaria Bs, particularmente en células de especies de *Bacillus* y especialmente en células Bs y en Bt.

En particular, la invención suministra secuencias de ácido nucleico que comprenden, en el siguiente orden, una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden, un promotor de *B. thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, un promotor a BtII y una combinación de promotores BtI y BtII, 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión a ribosoma, y una secuencia que codifica un primer polipéptido con al menos 80% de identidad de secuencia a una proteína de toxina de 41,9 kD (SEC ID No.: 9) de la toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan

tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No.: 9. En modalidades más preferidas, el primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 9 y en la mayoría de las modalidades preferidas, el primer polipéptido tiene la SEC ID No. 9. La secuencia que codifica el p'rimero polipéptido puede comprender adicionalmente una secuencia que codifica un segundo polipéptido con, al menos, 80% de identidades de secuencia a una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No.: 8), cuyas funciones de polipéptido como un domonio ligante para la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No.: 9. En las modalidades preferias, el segundo polipéptido tien, al menos, 90% de idnetidad de secuencia con la SEC ID No.: 8 y en la modalidad más preferida, tiene la secuencia del SEC ID NO.: 5. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden adicionalmente una segunda secuencia de, al menos, 6 nulecleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial. En modalidades particularmente preferidas, las dos secuencias son secuencias SATB-SD bacteriales 9-mer y, en modalidades especialmente preferidas, las secuencias SATB-SD son 30-40 nucleótidos.

Los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia bacterial STAB-SD pueden ser 6, 7, o 8 oligonucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos. En las modalidades preferidas, los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial son una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos. En algunas modalidades preferidas, la secuencia STAB-SD bacterial se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6). El promotor de *B. thuringiensis* es un promotor cry y en particular puede ser un promotor cryI. Adicionalmente, el promotor de *B. thuringiensis* puede ser un cryIAa1, cryIAa2, cryIAa3, cryIAa4, cryIAa5, cryIAa6, cryIBa1, cryIBa2, cryICa1, cryICa2, cryICa3, cryICa4, cryICa5, cryICa6, cryICa7, cryIFa1, cryIFa2, cryIAa1, cytIAa2, cytIAa3, o cytIAa4. En algunas modalidades preferidas el promotor de *B. thuringiensis* es un promotor cytIAa1. El ácido nucleico puede tener tanto un promotor BTI como un promotor BtI, y los dos promotores se pueden traslapar.

La invención proporciona además vectores de expresión que comprenden los ácidos nucleicos descritos

anteriormente, las células huésped que comprenden los vectores de expresión. Las células huésped pueden comprender adicionalmente una proteína de 20 kD codificada por el operon Bti cryIIA. En las modalidades preferidas, la célula huésped es una célula de *B. thuringiensis* o una célula de *B. esfericus*.

La invención proporciona además una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden, un promotor de *B. thuringiensis* que se une a una proteína de factor sigma, 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, y una secuencia que codifica un primer polipéptido con al menos una identidad de secuencia del 80% a una proteína de toxina de 41,9 kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *B. esfericus* cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de la toxina 41.9 kD de la SEC ID NO.: 9. En las modalidades más preferidas, el primer polipéptido tiene al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 9 y en las modalidades más preferidas, el primer polipéptido tiene la secuencia del SEC ID No. 9. La secuencia que codifica el primer polipéptido puede adicionalmente comprender una secuencia que codifica un

segundo polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaaria de *B. esfericus* SEC ID No. 8, cuyo polipéptido funciona como un dominio de unión para la proteína de toxina de 41.9 kD de la SEC ID No.: 9. En las modalidades preferidas, el segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No.: 8 y en la mayoría de las modalidades preferidas tiene la secuencia del SEC ID No.: 8. Los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial pueden ser 6, 7, u 8 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos. Las modalidades preferidas, los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial son una seucnecia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos. En algunas modalidades preferidas, la seucnecia STAB-SD bacterial se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO : 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO : 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO : 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6). En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden adicionalmente una segunda secuencia de, al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial. En modalidades particularmente preferidas, las dos secuencias son ambas secuencias STAB-SD bacteriales

9-mer y, en modalidades especialmente preferidas, las secuencias STAB-SD están 30-40 nucleótidos aparte.

La invención suministra adicionalmente métodos para mejorar la producción de toxina binaria de *B. esfericus* en una célula bacterial huésped, dicho método comprende: (a) transformar la célula huésped con una secuencia de ácido nucleico que comprende el siguiente orden, un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor de BtI, un promotor BtII, y una combinación de un promotor BtI y un BtII, al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD, un sitio de unión de ribosoma, y una secuencia que codifica un primer polipéptido con al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 41,9 kD (SEC ID NO. : 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9; y (b) expresar dicha secuencia de ácido nucleico en la célula huésped; por medio de lo cual la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico mejora la producción de toxinas binarias de *B. esfericus* comparadas con la producción de toxina binaria de *B. esfericus* en una célula de *B. esfericus* tipo silvestre que no se

transforma con dicha secuencia de ácido nucleico. En las modalidades preferidas, el primer polipéptido tien, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 9. En modalidades particularmente preferidas, el primer polipéptido tiene la SEC ID No. 9. En algunas modalidades, la SEC ID No. que codifica dicho primer polipéptido codifica además un segundo polipéptido con al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), cuyas funciones de polipéptido como un dominio gigante para la proteína de la toxina de 41,9 de kD de la SEC ID No. 9. En modalidades preferidas, el segundo polipéptido tiene, al menos 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8, y en modalidades particularmente preferidas, el segundo polipéptido tiene la SEC ID No. del SEC ID No. 8. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden adicionalmente una segunda secuencia de, al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial. En modalidades particularmente preferidas, las dos secuencias son ambas secuencias STAB-SD bacteriales 9-mer y, en modalidades especialmente preferidas, las secuencias STAB-SD están 30-40 nucleótidos aparte.

En modalidades preferidas, los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bcterial es una secuencia STAB-SD de 9 nucleótidos. En modalidades particularmente preferidas, la secuencia de STAB-SD bacterial se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO : 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO : 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6). Preferiblemente, la célula huésped es una célula de *Bacillus turingiencis* o una célula de *B. esfericus*. En modalidades preferidas, la célula bacterial huésped expresa además un producto de 20 kD de un gen cryIIA.

En otro grupo de modalidades, la invención suministra métodos para crear una bacteria recombinante, dicho método comprende las etapas de: (a) transformar la bacteria recombinante con una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden: un promotor de *Bacillus turingiencis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, un promotor BtII, y una combinación de un promotor BtI y un BtII, al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, una secuencia quecodifica un primer polipéptido con al menos 80% de identidad de secuencia

con una proteína de 119, kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9; y (b) expresar la secuencia de ácido nucleico en la célula huésped. En las modalidades preferidas, el primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No.: 9, y en modalidades particularmente preferidas, tiene la secuencia de SEC ID No.: 9. La secuencia que codifica el primer polipéptido puede adicionalmente comprender una secuencia que codifica un segundo polipéptido, cuyo segundo polipéptido tiene, al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), y puede funcionar como un dominio de unión para que la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9. En las modalidades preferidas, el segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8, y en modalidades particularmente preferidas, tiene la secuencia del SEC ID No. 8. En algunas modalidades, los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterail es una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos. En modalidades más preferidas, la secuencia bacterial se selecciona de un grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID

NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6). En algunas modalidades, los ácido nucleicos comprenden adicionalmente una segunda secuencia de al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial. En modalidades particularmente preferidas, las dos secuencias son ambas secuencias STAB-SD bacterial 9-mer y, en modalidades especialmente preferidas, las secuencias STAB-SD están 30-40 nucleótidos. En modalidades preferidas, la bacteria recombinante se selecciona del grupo que consiste de *Bacillus turingiensis*, *B. esfericus*, y un miembro de una especie de bacillus diferente de Bti o Bs.

Aún en otro grupo de modalidades la invención suministra un método para incrementar la toxicidad de una bacteria de *Bacillus turingiensis* a una larva de un mosquito, dicho método comprende las etapas de: (a) transformar dicha bacteria con una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden, un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, un promotor BtII y una combinación de un promotor BtI y BtII, los 6 o más

nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, y una secuencia que codifica un primer polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 41,9kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es al menos 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9; y (b) expresar dicha secuencia de ácido nucleico en la bacteria; por medio de la cual la expresión de dichas secuencias de ácido nucleico hace dicha bacteria más tóxica a dicha larva que la célula de *B. esfericus* tipo silvestre que no se transforma con dicha secuencia de ácido nucleico. En modalidades preferidas, el primer polipéptido tiene, al menos 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 9. En modalidades particularmente preferidas, el primer polipéptido tiene la secuencia de SEC ID No. 9. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente una secuencia de, al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial. En modalidades particularmente preferidas, las dos secuencias de, al menos, 6 nucleótidos son ambas secuencias STAB-SD bacterial 9-mer y, en modalidades especialmente preferidas, las secuencias STAB-SD están 30-40 nucleótidos aparte.

En modalidades preferidas, la secuencia que codifica el primer polipéptido comprende adicionalmente una secuencia que codifica un segundo polipéptido, cuyo segundo polipéptido tiene, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8) y puede funcionar como un dominio de unión para una proteína de toxina de 41,9 kD de SEC ID No. 9. En modalidades más preferidas, el segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8 y en modalidades particularmente preferidas, el segundo polipéptido tiene una SEC ID No. del SEC ID No. 8. Adicionalmente, en modalidades preferidas, dichos 6 o más nucleótidos contiguos de una SEC ID No. STAB-SD bacterial es una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos, y, en modalidades particularmente preferidas, las secuencias STAB-SD bacteriales de 9 nucleótidos se seleccionan del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO : 6). En modalidades especialmente preferidas, la bacteria comprende adicionalmente un producto de 20 kD del gen cry11A.

En aún otro grupo de modalidades, la invención suministra células recombinantes de *B. esfericus*, dichas células comprenden secuencias de ácido nucleico que comprenden en el siguiente orden, un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, BtII, y una combinación de un promotor BtI y un BtII, al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, y una secuencia que codifica un primer polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 41,9 kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9. En las modalidades preferidas, el primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 9 y en modalidades más preferidas tiene la SEC ID No. 9. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos comprenden adicionalmente una segunda secuencia de, al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial. En modalidades particularmente preferidas, las dos, al menos, 6 secuencias de nucleótidos son ambas secuencias STAB-SD bacteriales 9-mer y, en modalidades especialmente

preferidas, las secuencias STAB-SD está en 30-40 nucleótidos.

En las modalidades preferidas, la secuencia que codifica un primer polipéptido comprende adicionalmente una secuencia que codifica un segundo polipéptido cuyo segundo polipéptido tiene, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), y puede funcionar como un dominio de unión para una proteína de toxina de 41,9 kD de una SEC ID No. 9. En modalidades más preferidas, el segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8 y en modalidades especialmente preferidas, tiene la secuencia del SEC ID No. 8. En algunas modalidades, los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial es una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos y, en modalidades preferidas, la secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6). En algunas modalidades preferidas, el promotor de

Bacillus turingiensis es un promotor cry. En modalidades más preferidas, el promotor de *Bacillus turingiensis* se selecciona del grupo que consiste de cryIAa1, cryIAa2, cryIAa3, cryIAa4, cryIAa5, cryIAa6, cryIBa1, cryIBa2, cryICa1, cryICa2, cryICa3, cryICa4, cryICa5, cryICa6, cryICa7, cryIFa1, cryIFa2, cryIAa1, cytIAa2, cytIAa3, y cytIAa4 y, en modalidades particularmente preferidas, es un promotor cytIAa1. En modalidades particularmente preferidas, la célula expresa adicionalmente un producto de 20 kD de un operon cryIIA.

Adicionalmente, la invención suministra métodos para incrementar la toxicidad de una célula de *B. esfericus*, dichos métodos comprenden (a) transformar la célula con una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el agte orden, un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, un promotor BTII, y una combinación de un promotor BtI y un BTII, al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, y una secuencia que codificau n primer polipéptido con, al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína de 41,9 kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *Bacillus turingiensis*, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de

41,9 kD de la SEC ID No. ; y (b) expresada dicha secuencia de ácido nucleico en la célula huésped; por medio de lo cual la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico incrementa la toxicidad de dicha célula comparada con la célula de *B. esfericus* tipo silvestre que no se transforma con dicha secuencia de ácido nucleico. En las modalidades preferidas, el primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8 y, en modalidades particularmente preferidas, tiene la secuencia del SEC ID No. 9. En modalidades preferidas, la secuencia que codifica dicho primer polipéptido comprende además una secuencia que codifica un segundo polipéptido, cuyo segundo polipéptido tiene, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), y puede funcionar como un dominio para una proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9. En modalidades más preeridas, el segundo polipéptido tiene, al menos,, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8 y, en modalidades particularmente preferidas, tiene la secuencia del SEC ID No. 8. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente una segunda secuencia, de al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia de

STAB-SD bacterial. En modalidades particularmente preferidas, las dos, al menos, 6 secuencias de nucleótidos son ambas secuencias STAB-SD bacteriales 9-mer y, en modalidades especialmente preferidas, las secuencias STAB-SD está en 30-40 nucleótidos.

En modalidades preferidas, los 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de STAB-SD bacterial es una secuencia de STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos y, en modalidades particularmente preferidas, la secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO : 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6). En las modalidades preferidas de los métodos, el promotor de *Bacillus turingiensis* es un promotor cry. En métodos más preferidos, el promotor de *Bacillus turingiensis* se selecciona del grupo que consiste de Adicionalmente, el promotor de *B. thuringiensis* puede ser un cry1Aa1, cry1Aa2, cry1Aa3, cry1Aa4, cry1Aa5, cry1Aa6, cry1Ba1, cry1Ba2, cry1Ca1, cry1Ca2, cry1Ca3, cry1Ca4, cry1Ca5, cry1Ca6, cry1Ca7, cry1Fa1, cry1Fa2, cry1Aa1, cytlAa2, cytlAa3, y cytlAa4. En el método más preferido, el promotor de *Bacillus*

turingiencis es un promotor de *Bacillus turingiencis* es un promotor cytlAal.

En aún otro grupo de modalidades, la invención suministra métodos para reducir la resistencia de una toxina binaria de *B. esfericus*, dicho método comprende expresar una proteína cytlAal ("Bti") de *Bacillus turingiencis* subsp. *israelensis* en una célula de *B. esfericus* que expresa dicha toxina binaria.

La invención también suministra métodos para reducir la resistencia de una toxina binaria de *B. esfericus*, dicho método comprende expresar una proteína cytlAal Bti en una célula *Bacillus turingiencis* que exprea una toxina binaria y para reducir la resistencia a una toxina binaria de *B. esfericus*, dicho método comprende administrar proteína cytlAal Bti con dicha toxina binaria. La proteína cytlAal Bti puede estar una célula Bti en polvo lisada, liofilisada; esto también puede ser una proteína purificada. La proteína cytlAal Bti se puede administrar en una proteína cytlAal a una proporción Bs seleccionada desde aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:50. Preferiblemente, la proteína cytlAal Bti suministra

en una proteína cyt1Aa1 a una proporción Bs de aproximadamente 1:10.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 establece la secuencia de nucleótido (SEC ID No. 7) y la secuencia de aminoácido modificada de un fragmento utilizado para clonar la toxina binaria Bs en un plásmido. "Sigma E" y "Sigma K" denota los sitios de unión para los factores Sigma E y K, respectivamente. La secuencia subrayada entre los nucleótidos 537 y 660 denota una porción clonada en la secuencia mediante PCR para introducir una secuencia STAB-SD, la cual se de nota tanto en letras mayúsculas en la porción señalada, como en superescrito "STAB-SD". Los codones de arranque y parada de la proteína 51,4 kD (SEC ID No. 8) y de la proteína de 41,9 kD (SEC ID No. 9) de la toxina binaria Bs se notan bajo la secuencia de aminoácido. Las secciones subrayadas entre los nucleótidos 725 y 730, y entre 2245 y 2250, marcados "RBS", representan los sitios de unión de ribosoma.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. INTRODUCCIÓN

La invención suministra secuencias de ácido nucleico, vectores, célula huésped, y métodos para obtener altos niveles de síntesis de la toxina binaria de *B. esfericus* ("Bs") en células bacteriales recombinantes. La toxina de Bs es muy potente, pero es producida mediante las células Bs tipo silvestre a bajos niveles. Este, siendo solo una toxina simple, en contraste, por ejemplo, con Bt, que produce un complejo de toxina, permite el rápido desarrollo de insectos resistentes a la toxina. Incrementado la cantidad de toxina producida por célula se incrementa el poder de muerte de la formulación biopesticida resultante y disminuye la posibilidad de que la larva que ingiera el biopesticida sobreviva. Más aún, el incremento en la cantidad de toxina por célula incrementa grandemente la eficiencia del proceso de producción de fermentación de toxina bacterial, y reduce la cantidad de productobacterial que se debe aplicar para lograr control de insectos. Así, la invención reduce marcadamente el costo de producción y el uso y hace los biopesticidas más competitivos con pesticidas químicos,

que pueden ser efectivos, pero más dañinos ambientalmente.

Los ácidos nucleicos de la invención son secuencias heterólogas hechas al insertar una secuencia de ácido nucleico STAB-SD entre un promotor fuerte de un gen Bt y el sitio de unión del ribosoma, y combinar esta construcción con una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de unión de la toxina Bs, o la proteína de toxina, o ambas. En las modalidades preferidas, ambas proteínas están presentes. Sorprendentemente, aplicando un promotor Bt fuerte con la secuencia de ácido nucleico STAB-SD da como resultado un incremento dramático en la producción de toxina Bs mediante al menos 10, y usualmente 15 a 20, veces más la cantidad de proteína producida por cepas estándar de *B. esfericus* (tipo silvestre) no alteradas. La presencia de la toxina binaria del Bs, a su vez, da como resultado incrementos sorprendentes en la toxicidad de las células recombinantes. Por ejemplo, la toxicidad de las células recombinantes contra las larvas de los mosquitos del género *Culex* se incrementa más de diez veces comparadas con las células recombinantes.

Opcionalmente, la célula recombinante contiene adicionalmente un producto similar a chaperona de 20 kD de un operon cryIIA. Sorprendentemente, la presencia de esta proteína incrementa la síntesis de proteína Bs de la secuencia de ácido nucleico descrita anteriormente mediante un 50% a 100% adicional, e incrementado así la producción de toxina Bs a 20 a 30 veces más que la producida mediante cepas estándar Bs.

Debido a los costos de obtener aprobación regulatoria para nuevos pesticidas y similares, es generalmente deseable que la toxicidad de las células bacteriales se incremente al menos aproximadamente 5 veces contra un organismo de interés para garantizar la inversión. Los esfuerzos de otros durante más de una década para producir toxina Bs en Bs y *Bacillus thuringiensis* ("Bt") han dado como resultado incrementos en cantidades de producción de toxina de 2, 3 o 4 veces demasiado modestos para ser de interés para producción comercial o para uso en campo. Así, la capacidad de la invención para permitir la producción de toxina Bs en cantidades que son al menos 10, más usualmente 15, y tanto como 20, 25 a una 30 veces tan altas que como aquellas producidas en cepas estándar de Bs es un avance

significativo y sorprendente en la técnica. Igualmente sorprendente, en ensayos contra mosquitos culex, un vector significativo de enfermedad humana, la toxicidad de las células Bt transformadas con los ácidos nucleicos de la invención se mejoró, al menos, diez veces, sin disminuir la toxicidad de las células a otros géneros de mosquitos.

Los Biopesticidas tales como el Bt son producidos comercialmente en bioreactores. La capacidad suministrada por la invención pa incrementar la toxicidad de células bacteriales tales como Bt o Bs significan que la cantidad de toxina producida por unidad de medio de cultivo se incrementará, permitiendo el cultivo de cantidades más pequeñas, y disminuyendo conmensurablemente en el de materia prima utilizada para el medio de cultivo. De esta forma, la invención reduce el costo de producir biopesticidas, que extenderá las situaciones en las cuales este es efectivo en costos utilizarlos en lugar de pesticidas químicos. Más aún, la invención también proporciona la capacidad de convferir toxicidad basada en toxina Bs sobre especies bacteriales normalmente no tóxicas, y especialmente sobre especies de bacillus que normalmente no son tóxicas a las larvas de los insectos.

En razón a los atributos de estas otras especies de bacterias, tales como la persistencia en ambientes particulares, son probablemente diferentes que las Bt y las Bs que han servido lejos como biopesticidas, la invención también proporciona biopesticidas con una escala diferente de atributos de aquellos habitualmente disponibles. La invención expande de esta manera la escala de opciones para funcionarios de salud pública y científicos de la agricultura en combatir plagas de insectos.

La capacidad para producir altos niveles de oxima Bs es particularmente útil para incrementar la toxicidad de subespecies Bt, tales como la subsp. *Israelensis*, que es útil para controlar plagas de dípteros tales como larvas de mosquitos y jejenes (esta cepa de Bt es denominada en lo sucesivo como "Bti") subsp. *Kurstaki*, que es habitualmente útil para controlar plagas orugas, incluyendo, por ejemplo, el gusano de oreja del maíz (*Heliothis zia*), el engasador de col (*Trichoplusia m*), y el gusano "fall army" (*Spodoptera frugiperda*), y la subsp. *morrisoni*, que es activa, por ejemplo, contra plagas de coleopteros tales como el cucarrón de la papa colorada (*Leptinotarsa decemlineata*), y el cucarrón de la

hoja del chopo de la carolina (*Chrysomela scripta*), así como también la subsp. *tenebrionis*, y la subsp. *aizawai*.

Más aún, la invención permite a la extensión de la escala del huésped del biopesticida (esto es, este se extiende los organismos contra los cuales el biopesticida es tóxico). La toxina Bs es tóxica primariamente a las larvas de las especies *Culex* y anófeles, mientras que el Bti es más activo contra las especies de *Culex* y *Aedes*. Así, la expresión de altos niveles de toxina Bs en células Bti no solo incrementa su toxicidad al *Culex*, sino también hace a las células agentes más útiles contra las especies de anofeles. En razón a que las especies de anofeles son un vector principal de la malaria, esta escala del huésped incrementada sola de la invención una adición mayor al arsenal de salud pública.

La invención se relaciona además con el descubrimiento de que la proteína *cyt1Aa1* (también conocida como "cyt1A") del Bti puede restaurar la toxicidad del Bs a los mosquitos que fueron altamente resistentes a la toxina Bs. Otros grupos han mostrado previamente que el mecanismo de resistencia al Bs se pierde al unirse a receptores en el intestino medio del

insecto. Sin desear ser coincidente con la teoría, parece que el Cyt1Aa1 permite la inserción de la toxina Bs en la membrana micropilar del intestino medio, restaurando la toxicidad.

Trabajando con poblaciones de *Culex quiquefasciatus*, al menos, treintamil veces resistente a *B. esfericus* 2362, la cepa utilizada en formulaciones biopesticidas comerciales, combinar Bti Cyt1Aa1 con *B. esfericus* suprimió completamente la resistencia. Alguna supresión de la resistencia se había mostrado previamente con una proteína CYT diferente, la CYT1Ab del *Bacillus turingiensis* subsp. *Medellin* ("Btm"). Thiery et al., Appl. Environ. Microbiol. 64: 3910-3916 (1998). Sorprendentemente, sin embargo, la supresión de la resistencia por Bti cyt1A es varias veces más alta que aquella que se logró con Btm Cyt1Ab. Más aún, en razón a que la Bs 2362 es la cepa comercialmente utilizada y a la cual las poblaciones de mosquito objetivo ya han desarrollado resistencia significativa, es particularmente importante suprimir la resistencia a esta cepa. Así, el descubrimiento de que la proteína Bti Cyt1Aa1 restaurece la toxicidad al Bs 2362 ofrece una

solución a un problema principal que ha desanimado el continuar con el curso del Bs como un biopesticida.

Este descubrimiento puede ser explotado al producir Bti Cyt1Aa1 en una célula bacterial que produce toxina Bs, tal como una célula Bs o una célula Bt recombinantemente alterada para producir toxina Bs. Si la toxina Bs se produce en una célula Bs recombinantemente alterada para expresar Bti Cyt1Aa1, es preferible también transformar la célula para expresar la proteína similar a chaperona de 20 kD codificada por el operon cry11A. La secuencia del cyt1Aa1 está disponible del GenBank bajo el número de acceso X03182, y fue publicada por Waalwijk et al., Nucl. Acids Res. 13: 8207-8217 (1985). El operon cry11A y la proteína de 20 kD codificada se discuten adicionalmente adelante.

Relativamente, la proteína Bti Cyt1Aa o las células Bti que producen Cyt1Aa (o células de otras especies de bacilos recombinantemente alteradas para producir Bti cyt1Aa se pueden agregar a células, gránulos o polvos producidos de Bs para hacer los gránulos tóxicos a organismos que de otra forma serían resistentes.

Como se mostró en los ejemplos, cantidades bajas, relativamente modestas de proteína cytlAa1 son suficientes para suprimir dramáticamente o eliminar la resistencia. En modalidades preferidas, la proteína Cyt1Aa1 se puede agregar a una mezcla Bs en una proporción seleccionada de 1: 2, 1: 3, 1: 4, 1: 5, 1: 6, 1: 7, 1: 8, 1: 9 o 1: 10, con 1 : 10 siendo la más preferida en razón a que esta logra hacer reversar la resistencia con relativamente bajas cantidades de material agregado. Proporciones mayores tales como: 1: 12, 1: 15, 1: 20, 1: 25, 1: 30, 1: 35, 1 : 40, 1: 45, 1: 50, 1: 55, 1: 60, 1: 65, o 1: 70 pueden también ser empleadas si, por ejemplo, se desea reducir el costo de agregar la proteína Cyt1Aa1, con el entendimiento de que proporciones más bajas pueden suministrar supresión un poco más baja de la resistencia. Los ensayos enseñados en el ejemplo 5 se pueden utilizar para ensayar cualquier proporción particular para discernir si se suministraría el grado de reverso de la resistencia deseada. Las proporciones Cyt1Aa1 a Bs de menos de 1: 100 no son preferidas.

La proteína Cyt1Aa se puede agregar como gránulos purificados; sin embargo, es usualmente más fácil agregar Cyt1Aa en la forma de células Bti que producen Cyt1Aa.

Convenientemente, las células Bti son lisadas y liofilizadas para formar un polvo antes de mezclarse con el Bs. En las modalidades preferidas, el Bs es la cepa 2362.

Basados en los resultados, otras proteínas CytI de Bti trabajarán de la misma manera para reversar la resistencia de la toxina binaria Bs.

Las personas expertas en la técnica están conscientes de que las células Bs y Bt no son generalmente administradas juntas. Sin desear estar apegados a la teoría, esto se puede deber a la preocupación de que el peso de las esporas producidas por cada una de las especies con relación a la toxina pudiera reducir la cantidad efectiva de toxina que la larva objetivo pueda ingerir. Las cantidades modestas de Bti que necesitan ser agregadas para lograr supresiones de resistencia, sin embargo, remueven esta preocupación como un factor. Los estudios reportados en los ejemplos muestran amplia toxicidad cuando las células Bti se mezclaron con Bs.

El Bt ha sido utilizado comercialmente como un biopesticida durante algunos veinte años, y el Bs se ha utilizado comercialmente durante algunos 5 años. El uso de Bti y Bs en el campo se ha revisado, por ejemplo, in mulla, M.S., "Activity, field efficacy, and use of *Bacillus turingiensis israelensis* against mosquitoes," pp. 134-160 y en Yap, H.-H., "Field trials of *Bacillus sphaericus* for mosquito control" pp. 307-320, en H. de Barjac y D. J. Sutherland. eds. *Bacterial Control Of Mosquitoes And Blackflies*. Rutgers University Press (New Brunswick, NJ, 1990). Las personas expertas en la técnica están por lo tanto familiarizadas con el crecimiento de grandes cantidades de organismos Bti de Bs, con formular biopesticidas provenientes de aquellos organismos. Y con aplicar las formulaciones en el campo. Los organismos recombinantes y los métodos descritos aquí se pueden utilizar en cualquiera de los métodos conocidos en la técnica para formular biopesticidas provenientes de células Bti Bs.

Las células recombinantes Bs de la invención se pueden utilizar en cualquiera de los métodos en los cuales los biopesticidas Bs son habitualmente utilizados, pero se pueden aplicar a proporciones de aplicación más

bajas proporcionadas a su toxicidad incrementada con paradas con la cepa habitualmente utilizada comercialmente. Por ejemplo, si el Bs recombinante tiene una toxicidad de 10 veces de la cepa habitual, la décima parte del peso del material habitualmente utilizado se puede aplicar para obtener la misma potencia de muerte. Más aún, las células recombinantes que expresan el *cyt1Aa1* se pueden utilizar contra poblaciones de mosquitos que han llegado a hacerse resistente a la toxina binaria de este tipo silvestre.

Células Bt recombinantes de la invención producen toxinas binarias Bs que se pueden utilizar para controlar los organismos normalmente controlados mediante bt, y además se pueden utilizar contra especies de anófeles. Como se discutió en conexión con el Bs recombinante, anterior, el Bt recombinante que expresa altos niveles de toxina Bs se puede aplicar a proporciones de aplicación más bajas proporcionadas a la toxicidad incrementada del recombinante al organismos objetivo comparado con la cepa habitualmente utilizada comercialmente. Así, la invención permite el uso de menos material. En razón a que la reducción de la cantidad del bt o Bs significa que menos bt o Bs tiene que ser crecido, se requiere menos materia

prima para producir la misma cantidad de potencia de muerte y así el costo neto de producir material suficiente para tratar una cantidad dada de área se disminuye.

Las secciones de adelante definen los términos utilizados en esta descripción. Ellos discuten entonces las bacterias Bt y Bs y sus toxinas, los promotores bBt adecuados para uso en la invención, las secuencias STAB-SD, el ensamblaje de secuencias de ácido nucleico de la invención, y la proteína similar a chaperona de 20 kD, así como también la elaboración y el uso de ácidos nucleicos, vectores, células huésped y bacterias de la invención.

II. DEFINICIONES

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la técnica a la cual pertenece la invención. Las siguientes referencias suministran a un experto una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of

Microbiology and Molecular Biology (2d ed. 1994); The Cambridge Dictionary Of Science And Technology (Walker ed., 1988); and Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos preferidos y los materiales se describen. Como se utilizan aquí, los siguientes términos tienen los significados adscritos a ellos a menos que se especifique otra cosa.

"*Bacillus thuringiensis*", "*B. thuringiensis*", y "Bt" se refiere a una bacteria del suelo gram positiva caracterizada por su capacidad para producir inclusiones cristalinas durante la esporulación. Las inclusiones incluyen endotoxinas insecticidas. Las inclusiones comprenden proteína insecticidas (algunas veces denominadas como "proteína de cristal" (codificadas mediante genes llevados sobre plásmidos. La bacteria se puede "curar" del plásmido al crecerlas a temperatura elevadas, dando como resultados células que no producen proteínas de cristal. Tales bacterias son denominadas como células "acristalíferas" o "con menos cristal".

"*Bacillus sphaericus*", o "Bs" se refiere a una bacteria del suelo gram positiva que también produce un cristal para esporal de proteínas tóxicas a ciertos insectos.

"toxina binaria" se refiere a la toxina producida mediante Bs. La toxina se comprende de dos proteínas, una de las cuales sirve como una porción de unión y una de las cuales sirve como la toxina. Las dos proteínas son capaces de asociarse en una solución para formar una toxina funcional. Las secuencias de nucleótido y aminoácido de las proteínas son reportadas en Baumann et al., J. Bacteriol. 170: 2045-2050 (1988). La proteína 51.4 kD (SEC ID NO : 8) funciona como el dominio de unión de la proteína 41,9 kD (SEC ID No.: 9) funciona como el dominio de toxina. Como se utiliza aquí, referencias a cualquiera de las proteínas incluyen variantes naturales y tales variantes sintéticas no reducen más del 50% (a) con respecto a la proteína de toxina de 41,9 kD, la toxicidad de la proteína o (b) con respecto a la proteína de unión 51,4 kD, la capacidad de la proteína para permitir la unión a la proteína de toxina. Específicamente contemplados están las variantes sintéticas en las cuales las sustituciones conservadoras

de aminoácidos se hacen, tales como sustituir un ácido glu'támico por un ácido aspártico o viceversa.

"Cry" y "Cyt" se refiere a miembros de dos familias de proteínas producidas por *B. thuringiensis*. La nomenclatura en la técnica ha cambiado recientemente de referirse a varias proteínas Cry mediante numerales romanos (destinados a denotar la escala evidente de organismos a los cuales las proteínas no son tóxicas) a números arábigos; las proteína Cyt también fueron rediseñadas. Una tabla de comprensión que correlaciona la nomenclatura de las designaciones más viejas y las designaciones habituales para algunas de las proteínas 130 Cry y Cyt se establecen en Crickmore et al., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813 (1998).

La proteína ahora denominada "Cyt1Aa1" fue algunas veces friamente denominada como "Cyta", o "Cyt1A"; referencias aquí a Cyta o Cyt1A se refieren a Cyt1Aa1.

Siguiendo el uso estándar en la técnica, el uso de los términos "cry" o "cyt" denota aquí la proteína, mientras los términos italicizados en minúscula "cry" o "cyt" se refieren a los genes.

Un "promotor" es una disposición de una secuencia de control de ácido nucleico, por ejemplo, el promotor *cryIAa1* del *Bacillus turingiensis*, que dirige la transcripción de un polinucleótido asociado, que puede ser un polinucleótido heterólogo o nativo. Unpmr incluye secuencias de ácido nucleico cerca al sitio de inicio de la transcripción tal como un sitio de unión de polimerasa. El promotor también incluye opcionalmente un mejorador distante o elementos represores que se pueden localizar tanto como varios miles de pares base del sitio de inicio de la transcripción.

"Factores sigma" se refieren a proteínas conocidas por reconocer secuencias particulares en ADN y que forman parte de un complejo de proteína que facilitan la iniciación de la transcripción del ADN mediante ARN polimerasa. Como es conocido en la técnica, la SEC ID No. de las proteínas de factor Sigma fue determinada del estudio en *Rsubtilis*, las proteínas desempeñando las mismas funciones en otras especies de bacillus tienen aproximadamente 80-95% de secuencia con el factor sigma del *B. subtilis*. De acuerdo con esto, los factores que en *Bt* desempeñan el mismo papel que los factores sigma en *B.*

subtilis tienen secuencias ligeramente diferentes de aquellos de las proteínas paradigma del B. subtilis. El término "factor sigma" se refiere aquí a proteínas en Bt que desempeñan la misma función que los factores sigma del B. subtilis y que tienen aproximadamente 80-95% de homología de secuencia superior a aquellas proteínas. Para hacer el punto que estas proteínas corresponde, pero no son necesariamente idénticas en la secuencia a las proteínas de B. subtilis, ellas son algunas veces denominadas aquí, como factores o proteínas "similares a sigma".

Un "promotor BtI" se refiere a un promotor que es reconocido por el factor sigma -E. A "BtII" se refiere a un promotor que es reconocido por el factor sigma K.

Un "promotor fuertemente BtI o BtII" se refiere a un promotor que, cuando está operablemente ligado a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína, y expresado en una fórmula Bt, da como resultado la proteína que comprende al menos 5%, más preferiblemente, 10% y más preferiblemente 15% o más del peso seco de la célula.

"Polinucleótido" y "ácido nucleico" se refieren a un polímero compuesto de unidades de nucleótido (ribonucleótido, desoxiribonucleótido, variantes estructurales de ocurrencia naturalmente relacionada, y análogos de ocurrencia sintética no naturales de estos" ligados por vía de enlaces fosfodiéster, variantes naturales de ocurrencia naturalmente relacionada, y análogos de ocurrencia sintética no natural de estos. Así, el término incluye polímeros de nucleótido en los cuales los nucleótidos y las uniones entre ellos incluyen análogos sintéticos de ocurrencia no natural. Se entenderá que, donde se requiere por el contexto, cuando una secuencia nucleótidos se representa por una secuencia de ADN, (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la cual "U" reemplaza "T".

"Recombinant" se refiere a polinucleótidos sintetizados o manipulados de otra forma in vitro ("polinucleótido recombinante") y a métodos para usar polinucleótidos recombinantes para producir minutos de genes codificados por aquellos polinucleótidos en las células u otros sistemas biológicos. Por ejemplo, un polinucleótido clonado puede ser insertado en un vector

de expresión adecuado, tal como un plásmido bacterial, y el plásmido se puede utilizar para transformar una célula huésped adecuada. Una célula huésped que comprende el polinucleótido recombinante se denomina como una "célula huésped recombinante" o una "bacteria recombinante". El gen es entonces expresado en la célula huésped recombinante para producir, por ejemplo, una "proteína recombinante". Un polinucleótido recombinante puede servir una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión de ribosoma, etc.).

Una "secuencia de polinucleótidos heteróloga" o un "ácido nucleico heterólogo" es un término relativo que se refiere a un polinucleótido que está funcionalmente relacionado con otro polinucleótido, tal como una secuencia promotora, en una manera que las dos secuencias de polinucleótido no están dispuestas en la misma relación una con la otra como en la naturaleza. Las secuencias de polinucleótidos heterólogos se incluyen, por ejemplo, un promotor operablemente ligado a un ácido nucleico heterólogo, y un polinucleótido que incluye su promotor nativo que es insertado en un vector heterólogo para transformación en una célula huésped recombinante. Las secuencias de polinucleótidos heterólogas son

consideradas "hexógenas" en razón a que ellas son introducidas a la célula huésped vía las técnicas de transformación. Sin embargo, el polinucleótido heterólogo puede originarse de una fuente extraña o de la misma fuente. La modificación de la secuencia de polinucleótido heteróloga puede ocurrir, por ejemplo, al tratar el polinucleótido con una enzima de restricción para generar una secuencia de polinucleótidos que puede estar operablemente ligada a un elemento regulatorio. La modificación también puede ocurrir mediante técnicas tales como mutagénesis de sitio dirigida.

El término "endógenamente expresado" se refiere a polinucleótidos que son nativos a la célula huésped y son naturalmente expresados en la célula huésped.

Un "cassette de expresión" se refiere a una serie de elementos polinucleótidos que permiten la transcripción de un gen en una célula huésped. Típicamente, el cassette de expresión incluye un promotor y una secuencia de polinucleótidos heteróloga o nativa que se transcribe. Los cassettes de expresión también pueden incluir, por ejemplo, señales de terminación de transcripción, señales de poliadenilación, y elementos mejoradores.

El término "operablemente ligado" se refiere a una relación funcional entre dos partes en las cuales la actividad de una parte (por ejemplo la capacidad para lograr la transcripción) da como resultado una acción sobre la otra parte (por ejemplo transcripción de las secuencias). De esta forma, un polinucleótido está "operablemente ligado a un promotor" cuando hay una unión funcional entre una secuencia de control de expresión de polinucleótido (tal como un promotor u otra secuencia de regulación de transcripción) y una segunda secuencia de polinucleótidos (por ejemplo, un polinucleótido nativo o heterólogo), donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del polinucleótido.

Una "endotoxina insecticida" se refiere a una familia de genes que codifican las proteínas de antitoxina que exhiben actividad insecticida, también conocida como proteína de cristal, por ejemplo Cry2A, Cry3A, Cry1B, Cry1C y toxina binaria Bs (ver Hofte & Whiteley, Microbiol. Rev. 53: 242-255 (1989)). Tales endotoxinas insecticidas son producidas por *Bacillus thuringiensis* y son tóxicas a los insectos, particularmente larvas de insectos.

Una "cantidad insecticidamente efectiva" de una endotoxina insecticida es una cantidad de dosis unitaria que suministra actividad insecticida cuando se aplica a una planta, suelo, u otro "locus", por ejemplo, sitio o ubicación.

El gen que codifica la proteína de 20 kDa de operon cryIIA" (gen de proteína 20 kDa) se refiere al gen en el que operon cryIIA que codifica una proteína de aproximadamente 20 kDa (como se describió en Frutos et al., Biochem. Sys. Y Ecol. 19: 599-609 (1991); ver Frutos et al. Figura 4 para la secuencia de nucleótidos y aminoácidos).

"Producción Mejorada" se refiere a una actividad de una primer proteína, tal como la proteína de 20 kD de operon cryIIAa, que incrementa la cantidad neta de una segunda proteína, tal como una endotoxina insecticida, en una célula huésped.

"competente para expresar" se refiere a una célula huésped que proporciona un ambiente celular suficiente

78

para la expresión de polinucleótidos endógenos y/o exógenos.

El término "idéntidad porcentual" en el contexto de dos o más ácido nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácido o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima, medidos utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual.

La frase "sustancialmente idéntica", en el contexto de dos ácidos nucleicos de polipéptidos se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 60% preferiblemente 80%, más preferiblemente 90 - 95% de identidad de nucleótidos o de residuos de aminoácido, cuando se compara y se alinea para correspondencia máxima, medida utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o mediante inspección visual.

Para comparación de secuencia (típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencia de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de ensayo y de referencia se meten en un computador, los coordinantes de subsecuencia se designan, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces la identidad de la secuencia porcentual para las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, basada en los parámetros de programa diseñados.

Alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede ser conducida, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman. Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similaridad de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizados de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o

AD

mediante inspección visual (ver de manera general, Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et AL., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) ("Ausubel")). Ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar la identidad de secuencia porcentual y la similaridad de la secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describe en Altschul et al. (1990) J. MOL. BIOL. 215: 403-410 y Altschuel et al. (1977) Nucleic ACIDS RES. 25: 3389-3402, respectivamente. El soporte lógico para desarrollar los análisis BLAST está públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Este algoriitmo involucra primero identificar pares de secuencia con alto marcador (HSP) al identificar palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta, que puede hacer pareja o satisfacer algún marcador umbral valorado positivo cuando se alineó con una palabra de la misma longitud en la secuencia de base de datos. T se denomina como el umbral del marcador de la palabra vecindario (Altschul et al, supra). Estos golpes de palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Los golpes de palabra son

entonces extendidos en ambas direcciones junto con cada seciuen tanto que el marcador de alineación acumulada se puede incrementar. Los marcadores acumulados se calculan utilizando, para secuencia de nucleótidos, los parámetros M (score premio para un par de residuos pareja; siempre > 0) y N (marcador de pena para residuos no alineados; siempre menor 0). Para las secuencias de aminoácido, una matriz de marcador se utiliza para calcular el marcador acumulado. La extensión de los golpes de palabra en cada dirección son detenidos cuando: el marcador de alineamiento acumulado cae por la cantidad X de su valor máximo logrado; score acumulado va a 0 o menos, debido a la acumulación de 1 o más señalamientos de residuo de marcador negativo, o el fin de cualquier secuencia se alcanza. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como defectos una longitud de palabra (W) de 11, una expresión (E) de 10, M=5, N=-4, y la comparación de ambas hebras. Par las secuencias de aminoácido, el programa BLASTP utiliza como defectos una longitud de palabra (W) de 3, una expectación(E) de 10, y la matriz de marcador BLOSUM62 de (ver Henikoff & Henikoff, Proc. NATL. ACAD. SCI. USA 89: 10915 (1989)).

Además de calcular la identidad de la secuencia en porcentaje, el algoritmo BLAST también desarrolla un análisis estadístico de la similaridad entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de la similaridad proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña ($P(N)$), con que suministran una indicación de la probabilidad a la cual ocurriría una coincidencia entre dos nucleótidos o secuencias de aminoácido por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación en el ácido nucleico de ensayo al ácido nucleico de ref es menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de 0,01 y más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en cruce por el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe adelante. De esta forma, un polipéptido

es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, donde los dos polipéptidos difieren solo por las sustituciones de conservación. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas se hibridizan una a la otra bajo condiciones rigurosas como se describe adelante.

Los términos "condiciones de hibridización rigurosa" o "condiciones rigurosas" se refieren a condiciones bajo las cuales una secuencia de ácido nucleico hibridizará a su complemento, pero no a otras secuencias en un grado significativo. En cualquier grado significativo, las condiciones rigurosas en el contexto de las hibridizaciones de ácidonucleico son secudependientes y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Secuencia más largas se hibridizarán específicamente a mayores temperaturas. Una vía grande para la hibridización de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic ACID Probes, Parte I, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, New York, (1993) (la totalidad del

AD

documento TIJSEN se incorpora como referencia). Condiciones muy rigurosas se seleccionan para ser iguales al punto T_m para una sonda particular. Condiciones menos rigurosas, como contraste, son aquellas en las cuales una secuencia de ácido nucleico se unirá a secuencias imperfectamente pareadas. La rigurosidad se puede controlar mediante cambios de temperatura, concentración de sal, la presencia de compuestos orgánicos, tales como formamida o DMSO, o todas estas. Los efectos de los cambios de estos parámetros son bien conocidos en la técnica. El efecto sobre T_m de cambios en la concentración de formamida, por ejemplo, se reduce a la siguiente ecuación: $T_m = 81,5 + 16,6 (\log Na^+) + 0,41 (\% G+C) - (600/oligo longitud) - 0,63 (\% formamida)$. Las reducciones en T_m debido a TMAC y los efectos del cambio de concentraciones de sal también son bien conocidos. Los cambios en la temperatura son generalmente unos medios preferidos para controlar la rigurosidad para un conveniente fácil control y reversibilidad.

"Sustituciones conservadoras" se refieren a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido con una funcionalidad similar aminoácido. Los siguientes 6 grupos

contienen cada uno aminoácido que son sustituciones conservadoras una paralela a la otra:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) ácido aspártico (D), ácido Glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lysina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofan (W).

Ver también, Creighton, Proteins, W. H. Freeman and Company, New York (1984).

III. Las toxinas BTI y Bs

Los Bti y Bs son organismos del suelo aeróbicos, gram positivos que forman esporas que producen inclusiones cristalinas proteináceas durante la esporulación. Los cristales de las especies Bt son tóxicas para las larvas de una amplia variedad de especies de lepidópteros, coleópteros y dípteros. La introducción lista algunos de los insectos contra los cuales diferentes subespecies de Bt son habitualmente utilizadas. El Bt comprende

aproximadamente 90% de todos los biopesticidas utilizados. Agaisse and Lereclus. J. Bacteriol. 177: 6027-6033 (1995).

Los genes cry y cyt codifican las varias proteínas insecticidas producidas codifican las varias proteínas insecticidas producidas por Bt. Un gran número de estos genes se han identificado y secuenciado y son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Crickmore et al., Microbiol Mol Biol Rev., 62: 807-813 (1998) (the whole of Crickmore et al. Se incorpora aquí como referencia) suministra una tabla que establece los números de acceso del GenBank para las secuencias de más de 120 genes cry Bt identificados y 9 genes cyt Bt.

Como se podría esperar del nombre, la toxina binaria de Bs se compone de dos proteínas, una de 51,4 kD y una de 41,9 kD. Las secuencias de nucleótido y aminoácido de las proteínas han sido conocidas durante una década y son reportadas por Baumann et al., J. Bacteriol. 170: 2045-2050 (1988). La proteína de 51.4 kD (SEC ID NO.: 8) funciona como el dominio ligante y la proteína de 41.9 kD ligante (SEC ID NO.: 9) funciona como el dominio de toxina, así, las cantidades equimolares de ambas

proteínas deben estar usualmente presentes para la función de toxina máxima. Convenientemente, esto se puede lograr al tener una secuencia de ácido nucleico que codifica tanto las proteínas corriente abajo de la construcción STAB-SD promotora de la invención de tal forma que ambas proteínas son expresadas al mismo tiempo y en aproximadamente las mismas cantidades. Si la secuencia de ácido nucleico de solo una de las dos proteínas de toxina Bs se ubica bajo el control de la secuencia STAB-SD promotora de la invención es deseable que una secuencia que codifica la otra proteína de toxina Bs se ubique bajo el control transcripcional de una construcción promotora similar de tal forma que las dos proteínas sean producidas en cantidades equimolares o aproximadamente equimolares.

Las personas expertas apreciarán que es posible hacer cambios en las secuencias del SEC ID NO.: 8 y 9 y tendrán aún una proteína que funcione y haga que una toxina Bs utilizando técnicas de ingeniería genética de rutina. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras de aminoácido se pueden hacer en la secuencia de la proteína de toxina binaria Bs (SEC ID No. 9) para dar como resultado una proteína o polipéptido que tenga una alta

identidad de secuencia y la cual retenga, al menos una porción de la toxicidad de la proteína nativa y se pueden hacer alteraciones similares en la proteína de unión de toxina binaria Bs (SEC ID No. 8) mientras no obstante permite a la proteína funcionar como una proteína de unión para la proteína de toxina. Preferiblemente tales proteínas o polipéptidos tienen, al menos, aproximadamente 75% de identidad con las proteínas Bs de 41,9 kD o 51,4 kD nativas, más preferiblemente un 80% o aún más preferiblemente 85%, aún más preferiblemente 90% y más preferiblemente 95% o identidad mayor a la SEC ID No. 8 o SEC ID No. 9. La función de cualquier polipéptido particular para servir en lugar de una toxina nativa Bs puede ser fácilmente probada mediante ensayos conocidos en la técnica y como se establece aquí. Es preferible que los polipéptidos que sirven en lugar de la proteína de toxina nativa de 41,9 kD (SEC ID No. 9) tengan al menos 50% de la toxicidad de la toxina nativa Bs, más preferiblemente 60%, aún más preferiblemente 70% o más, aún más preferiblemente aproximadamente 80% o más, aún más preferiblemente, 90% o más de la toxicidad de la toxina nativa Bs. Es preferible que los polipéptidos que sirven en lugar de la proteína de unión de 51,4 kD nativa (SEC ID No. 8) de la toxina binaria Bs puedan unirse a

receptores de insecto por aquella proteína de unión. Tal unión se puede determinar por ejemplo, mediante inmunohistoquímica (que es cualitativa) o ensayos de unipon de membrana de límite de cepilo (estos ensayos que también son conocidos como "ensayos de unión de vesícula de membrana de límite de cepillo" proporcionan valoración cuantitativa de la capacidad de uniónrelativa). Tales ensayos son bien conocidos en la técnica.

Sorprendentemente, hemos encontrado que la proteína cyt1A de Bt puede restaurar la toxicidad de la toxina en larvas que han perdido receptores para la proteína de unión de la toxina binaria Bs. De acuerdo con esto, si se desea, la toxina cyt1A puede ser coexpresada en una célula que expresa la proteína de toxina de 41,9 kD de la toxina binaria Bs en lugar de algunos o todas las proteínas de unión de 51,4 kL y las proteínas serán tóxicas a las larvas objetivo que ingieran las células o los biopesticidas hechos de las células. Así, por ejemplo, una célula Bt, tal como Bti se puede transformar al introducir una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína Cyt1A con un promotor que expresará cnatidades muy similares a la cantidad de proteína Bs de 41,9 kD. Alternativamente, la proteína cyt1A y la toxina

binaria Bs puede ser producida separadamente y mezclada para hacer que los mosquitos resistentes a la toxina Bs sean sensibles a la toxina. En una variante de este uso, la proteína cyt1A se puede agregar a la toxina para hacer que los mosquitos resistentes a la toxina Bs sean sensibles a la toxina. En una variante de este uso, la proteína cyt1A se puede agregar a la proteína de toxina Bs de 41,9 kD (que ha sido, por ejemplo, recombinantemente expresada) y la mezcla utilizada contra poblaciones de mosquito resistentes a toxina Bs. En razón a que el mecanismo de acción no puede ser el mismo que para la proteína de dominio de unión 51,4 kD, parece que la cantidad de proteína Cyt1A no necesita ser pareada cercanamente a la cantidad de proteína de toxina como sería cierto para la proteína de unión Bs de 51,4 kD para lograr un efecto completamente tóxico.

IV. PROMOTORES Bt

La invención utiliza promotores de genes cry o cyt de Bt para manejar la expresión de la toxina Bs. Estos genes codifican las varias proteínas insectividas producidas por Bt. Como se nota en la sección previa, la tabla de Crickmore et al., Microbiol Mol Biol Rev., 62 :

91

807-813 (1998) establece una lista conveniente de nombres y de números de acceso del GenBank para las secuencias de 120 genes cry genes Bt y 9 genes cyt de Bt. Las personas expertas en la técnica apreciarán que la secuencia 5' que precede el codón de inicio para la región de codificación descrita en la lista para cada uno de estos genes comprende la región promotora.

Como las personas expertas se darán cuenta, la transcripción del gen de las proteínas cry y cyt es temporalmente regulada por la presencia de secuencia a las cuales las proteínas conocidas como factores sigma se unen. Los factores sigma reclutan otras proteínas que forman un complejo que permite a la ARN polimerasa iniciar la transcripción del ADN. Los promotores de los genes cry o cyt son generalmente clasificados en tres categorías, basados en los factores sigma que se unen a ellos. Ellos son los promotores sigma-E, los promotores sigma-k y los promotores sigma-A.

Los promotores sigma-E también son conocidos como promotores Bti y los promotores sigma-k también son conocidos como promotores BtII (con relación a la discusión de los promotores aquí, los términos "sigma-E"

JF
ar

y "Bti" son utilizados intercambiablemente, como lo son los términos "sigma-k" y "BtII"). Un número de genes cry son activos durante la esporulación y son generalmente manejados mediante promotores Bti o BtII, con promotores Bti activos más temprano en la esporulación de lo que lo son los promotores BtII. Ver de manera general Agaisse y Lereclus, J. Bacteriol. 177: 6027-6032 (1995) ("Agaisse and Lereclus 1995"). Los factores sigma que reconocen la mayoría de los genes cry son conocidos. Por ejemplo, Agaisse y Lereclus 1995. Por ejemplo, el cry4A y B son reconocidos por los promotores BtI.

Un número de genes cry tiene dos promotores, un Bti y un BtII. La combinación de estos promotores duales sirve para extender la expresión del gen durante un largo periodo del proceso de esporulación. En algunos casos, los dos promotores se traslapan. Los genes cry no dependientes de la esporulación tienen aún otro conjunto de promotores, que son reconocidos mediante aún otro factor sigma, sigma-A. Ver, por ejemplo; Agaisse y Lereclus 1995.

Cualquier promotor BtI o BtII fuerte puede ser utilizado en las secuencias de ácido nucleico y los

métodos de la invención. Los promotores dobles BtI y BtII, y particularmente los promotores BtI y BtII traslapantes, tienden a ser promotres fuertes de expresión de proteína y son formas preferids de promotores para construir ácido nucleicos de la invención. Los miembros de los genes que caen dentro de los siguientes grupos que tienen promotores dobles son especialmente preferidos: crylA, crylB, cryl1A y cyt1Aa.

Para los propósitos de la invención, cualquier promotor Bti o BtII que pueda manejar la expesión de la proteína cyt1Aa1 para comprender al menos 5%, más preferiblemente 10%, y más preferiblemente 15% o más del peso seco de una célula Bti acristalífera se considera un promotor fuerte y es un promotor Bti o BtII apropiado para los propósitos de la invención. Los promotores BtI y BtII dobles o regiones promotoras son preferidas.

En las modalidades preferidas, el promotor Bti o BtII es un promotor cryl o un promotor cyt1Aa1 (también conocido como cyt1A). Debido a la cercana relación filogenética con idnetidad de alta secuencia de los promotores cryl (ver, Crickmore et al., Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 807-813 (1998), cualquiera de los

promotores de los genes designados en Crickmore et al. Como el gen cry1 es considerado capaz de manejar altos niveles de expresión de la toxina binaria Bs. Modalidades particularmente preferidas son la cry1Aa1 (anteriormente llamada cry1A (a)), cry1ba1 (anteriormente llamada cry1b), cry1 ca1 (anteriormente llamada cry1 C), y cry1fa1 (anteriormente llamada cry1 F). Se debe notar que cada uno de estos genes tiene otros genes cercanamente relacionados. Por ejemplo, el, cry1fa1 está cercanamente relacionada con el cry1Fa2. Los otros miembros de los grupos de genes denominados cry1 designados por la misma letra mayúscula y la misma letra minúscula son considerados por ser casi tan preferidos como el primer gen listado en el grupo (esto es, el cry1fa2 es casi tan preferido como el cry1Aa1).

En otra modalidad particularmente preferida, el promotor puede ser el promotor de cyt1A1, que comprende tanto los promotores BtI y BtII, y es de acuerdo con esto algunas veces denominado como un promotor doble. En razón a que la región promotora contiene dos promotores, la región promotora de este gen también se denomina los "promotores cyt1A". Basados en el análisis filogenético y la identidad de secuencia los promotores de los otros

~~2/3~~ ~~q5~~
q5

genes *cyt1Aa* también son promotores BtI o BtII suficientemente fuertes o BtI o BtII en las composiciones y métodos de la invención.

Los promotores de gen *cry* no dependientes de esporulación son promotores sigma-A y no son generalmente satisfactorios, excepto bajo un conjunto modificado de condiciones. Las formas no esporulantes de Bt, por supuesto, no divergen sus puentes metabólicas para la producción de esporas, y pueden acomodar toxinas durante un periodo más largo de lo que lo pueden las formas esporulantes. En las formas no esporulantes, por lo tanto, los promotores sigma-A se pueden acumular altos niveles de toxina. De acuerdo con esto, los promotores BtI y BtII son preferidos para uso en bacilos, incluyendo BtI y Bs. En formas no esporulantes de bacilos, se pueden utilizar los promotores sigma-A.

V. SECUENCIAS STAB-SD

La proteína de cristal mARN de *Bacillus thuringiensis* tiene un promedio de vida media de 10 minutos mediante la esporulación, mientras que el promedio de vida media de otro mARN está entre 1 a 2 minutos. Esta vida media larga

puede ser responsable en parte de la muy alta producción de proteínas cristal que pueden ser tanto como 20 - 30% del peso seco de las células esporuladas.

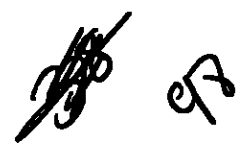
La larga vida media de estas proteínas está relacionada con dos regiones no traducida de los genes. Primero, hay una secuencia en la región no traducida 5', usualmente encontrada entre el promotor y la región codificadora, que no está involucrada en la iniciación de la traducción pero la cual es un determinante de la estabilidad para el mRNA. La secuencia es una secuencia similar al consenso Shine-Dalgarno- ("SD") segundo, el fragmento terminal 3' de los genes cry tales como el cryIAa, incrementa la vida media de los transcritos mRNA tres veces. Agaisse and Lereclus, Mol. Microbiol., 20: 633-643 (1996) (en lo sucesivo "Agaisse 1996").

La secuencia similar a SD 5' parece estar involucrada en la estabilización de la producción de las proteínas. Esta ha sido, de acuerdo con esto, denominada una secuencia "STAB-SD". Agaisse 1996. Agaisse 1996 sugiere que el STAB-SD está involucrada en la interacción con el extremo 3' del ARN ribosomal 16S, y encontró que las mutaciones de la secuencia STAB-SD que fueron

~~25~~ 97

esperadas para abolir la complementariedad afectaron la estabilidad conferida. De manera interesante, la secuencia STAB-SD de la proteína entonces llamada cryIIIAa (ahora llamada cry3A) mostró interacciones putativas con el extremo 3' del 16S rARN del *B. subtilis*. Sin desear estar ligados a la teoría, parece que los nucleótidos de polipurina (G y A) de los pares base de la secuencia STAB-SD con una secuencia complementaria de nucleótidos de pirimidina en el extremo 3' de la subunidad ARN 16S del ribosoma y que esta paridad de base inhibe el acceso de la endoribonucleasa al extremo 5' del mRNA, incrementando la vida media del mensaje, y mejorando de esta forma la producción de la proteína codificada. Así, parece que las secuencias STAB-SD no son específicas para especies particulares de bacterias, y que las secuencias STAB-SD de otras especies de bacillus, y de otros géneros de bacterias se puede utilizar para estabilizar la producción de la proteína en *Bacillus thuringiensis* y *B. esfericus*.

Agaisse 1996 revisó bases de datos e identificó numerosos ejemplos de secuencias STAB-SD putativas en regiones no traducidas 5' ("UTR"), incluyendo aquellas de cry de Bt, el locus cwp de *B. Brevis*, y el locus inIAB de



Listeria Monocytogenes. Cualquiera de estas secuencias STAB-SD se puede utilizar para producir altos niveles de toxina Bs en Bacillus cuando se ubica entre un promotor de Bacillus fuerte y un sitio de unión de ribosoma. Las secuencias STAB-SD identificadas comparten muy alta homología de una a la otra.

En modalidades preferidas, la secuencia STAB-SD se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (la secuencia cry3A, SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (la secuencia cry3B, SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (la secuencia cry3B2, SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (la secuencia cry3D, SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (la secuencia cwp de B. brevis, SEC ID NO.: 5), and GAAAGGGGT (la INLAB de L. monocytogenes, SEC ID NO.: 6). Las secuencias cry3A, cry3B, cry3B2 y cry3D son particularmente preferidas. La serie 3A es la modalidad más preferida. Si se desea, dos o más secuencias STAB-SD se pueden utilizar en tándem. Si se utilizan secuencias múltiples STAB-SD, las secuencias son preferiblemente separadas por aproximadamente 30 a 40 nucleótidos de tal forma que las secuencias STAB-SD puedan interactuar con subunidades ribosomales múltiples 30S. la longitud de envergadura de la subunidad ribosomal es de aproximadamente 30 nucleótidos. El número de

~~28~~ 99

secuencias STAB-SD múltiples utilizadas no debe ser tan grande como para interferir en la interacción entre las secuencias STAB-SD y el extremo 3' del 16SrARN 3' de *B. subtilis*. la presencia de demasiadas secuencias STAB-SD puede ser determinada al notar una disminución en la producción de proteína comparada con una construcción con una secuencia STAB-SD más poca. Una de las dos secuencias STAB-SD son las más preferidas. Similarmennte, mientras dos secuencias STAB-SD pueden estar separadas por cualquier distancia conveniente, (típicamente, 3-300 nucleótidos), el efecto de la separación puede ser ensayado al determinar la producción de la proteína por una construcción con la separación siendo ensayada en comparación con una construcción similar con una separaciónde 33 a 40 nucleótidos.

Otras secuencia con alta identidad ee secuencia a una de las secuencias de STAB-SD establecida anteriormente y que funciona como una secuencia STAB-SD se puede utilizar en los ácidos nucleicos y métodos de la invención. La secuencia debe tener al menos 85% de identidad de secuencia con una de las secuencias de STAB-SD establecidas anteriormente y debe funcionar para mejorar la producción de proteína. En formas preferidas,

~~100~~
100

la secuencia tiene al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, y aún más preferiblemente tiene aproximadamente 95% o mayor identidad de secuencia. Además, Agaisse 1996 suministra guía sobre los cambios de secuencias STAB-SD putativas que pueden afectar deletereamente la estabilidad. En general, cualquier cambio en un nucleótido que aboliría la interacción entre las secuencias STAB-SD y el extremo 3' del 16SrARN 3' de *B. subtilis* es probablemente para reducir la producción de proteína y no es preferido.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la secuencia STAB-SD completa no tiene que ser utilizada para mejorar la producción de proteína. Tan pocas como 6 nucleótidos contiguos de la secuencia STAB-SD puede funcionar para mejorar la estabilidad. Mientras que no es tan poderosa en la producción de estabilización de proteínas como la secuencia STAB-SD de 9 nucleótidos completos, se obtienen mejores resultados que si la proteína se produce sin el 6-mer, una secuencia de un número de nucleótidos o aminoácidos se puede denominar en la técnica como el número de sufijos "-mer"). Así, si se desea, una de estas subsecuencias STAB-SB se puede utilizar en lugar de una secuencia STAB-SD completa. En

razón, sin embargo, a que secuencias mayores se unan más fuertemente a la correspondiente secuencia de pirimidina de la subunidad ribosomal 116SrARN, más preferiblemente, 7 nucleótidos contiguos de la secuencia STAB-SD son utilizados y, a ún, más preferiblemente, 8 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD son utilizados. El uso de una secuencia STAB-SD de 9 nucleótidos de longitud completa es el más preferido. También se pueden obtener mejores resultados utilizando dos de estas construcciones en tándem, tales como dos 6-mer. Para facilidad de la discusión en otras secciones de la especificación, el término "secuencia STAB-SD" incluye una subsecuencia de 6, 7, u 8 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD a menos que se requiera otra cosa por contexto.

Cualquier secuencia de ácido nucleico putativa, o cualquier modificación deseada a la secuencia STAB-SD conocida, puede ser convenientemente ensayada por su función como una proteína STAB-SD al ubicar la secuencia en un plásmido que contiene una galactosidasa que codifica la secuencia que sirve a los ensayos y otros métodos enseñados en Agaisse 1996, o al sustituir la secuencia bajo consideración para la secuencia STAB-SD en el proedimiento establecido en los ejemplos, adelante, y

102

comparar la producción de proteína resultante con la producción de la misma proteína proveniente de la construcción utilizando la secuencia STAB-SD establecida aquí. Las secuencias que reducen la producción de toxina binaria Bs a menos de aproximadamente 8 veces de aquella de las células Bs tipo silvestre medidas mediante análisis densitométrico de genes SDS-PAGE teñidas de azul Coomassie son las menos preferidas.

VI. ENSAMBLAJE DE SECUENCIAS DE ÁCIDO NUCLEICO DE LA INVENCION

Se ha desarrollado información considerable en la técnica a cerca de la construcción de promotores; en este contexto, la siguiente discusión se ofrece para proporcionar la información específica que podrían necesitar personas expertas para optimizar la ubicación de una secuencia STAB-SD entre un sitio de unión de factor sigma de un promotor Bt fuerte y el sitio de unión de ribosoma.

La figura 1 demuestra un ensamblaje de ejemplo de una secuencia de ácido nucleico de la invención. En esta modalidad, los promotores cyt1A comprenden nucleótidos 1-

~~103~~
103

537. (en razón a que el gen *cyt1A* contiene dos promotores, un promotor BtI y el otro el promotor BtII, la región promotora del gen se denomina como los "promotores *cyt1A*"). Los sitios de unión para los factores similares a sigma-E y los factores similares a sigma-k son mostrados con las notaciones "SIGMA E" y "SIGMA k" respectivamente, ubicados sobre las regiones apropiadas, con los términos "-35" y "-10" y las secuencias subrayadas que designan los sitios de unión específica. Los nucleótidos subrayados con las letras "RBS" en los nucleótidos 726 a 730 y 2246 a 2249 denota sitios de unión de ribosoma.

Los nucleótidos subrayados del 538 al 659 denotan una secuencia clonada desde el promotor *cry3A*. Esta secuencia fue clonada par introducir la secuencia de 9 nucleótidos del STAB-SD; la secuencia más larga del promotor *cry3A* se utilizó porque está relativamente más difícil de clonar en una secuencia de 9 nucleótidos. La secuencia que comienza en la posición 660 es una porción de la secuencia de la toxina binaria corriente arriba de al región codificante, seguida por la región codificante (como la publicó Baumann et al., J. Bacteriol. 170: 2045-2050 (1988)). La porción particular corriente arriba del

~~104~~
104

codón de inicio en la posición marcada "+1" fue seleccionada simplemente por la presencia de un sitio de restricción conveniente. Porciones más cortas o más largas se pueden utilizar, y de hecho, la región promotora completa del gen de toxina binaria se puede utilizar si se desea. En general, sin embargo, el uso de secuencias más cortas se prefiere, no solo por fácil manipulación sino también para evitar la inclusión accidental de secuencias o similares que podría pasar a estar presente. Adicionalmente, si una secuencia diferente se utiliza después de la secuencia STAB-SD, un sitio de unión de ribosoma se debe ubicar entre la secuencia STAB-SD y el codón de inicio. Preferiblemente, el sitio de unión del ribosoma está ubicado aproximadamente 6 a aproximadamente 10 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio. Los sitios de inicio y parada de las proteínas de toxina binaria de 51,4 kD y 41,9 kD también son mostradas.

La manera en la cual los elementos de esta secuencia de ejemplo se unen puede variar sustancialmente y aún da como resultado una secuencia que trabaja bien en la producción de altos niveles de toxina binaria Bs. En esta secuencia, algunos de los 121 nucleótidos

provenientes de la secuencia cry3A fueron utilizados para clonar en la secuencia STAB-SD. Esto se hizo simplemente para facilidad de la clonación; la secuencia de 9 nucleótidos de STAB-SD (o, como se explicó en la sección precedente, una subsecuencia de 6, 7 u 8 nucleótidos contiguos de estos) se puede introducir por si misma. Para facilidad de la clonación, sin embargo, es usualmente preferible utilizar una secuencia que comprenda la secuencia STAB-SD y la cual tiene desde de aproximadamente 20 a aproximadamente 120 nucleótidos de longitud. La secuencia STAB-SD misma se puede ubicar en cualquier parte desde aproximadamente 10 bases corriente abajo del sitio de unión del factor sigma hasta justo antes de una secuencia RBS, que a su vez deberá ser de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 bases corriente arriba del codón de inicio. Esto es, toda o una porción del promotor corriente abajo del sitio de unión del factor sigma se puede suprimir, con el entendimiento de que si el RBS del promotor se suprime, otro RBS, tal como aquel de la toxina binaria Bs, se debe ubicar aproximadamente 6 a aproximadamente 10 bases corriente arriba del codón de inicio. Como se nota, en la secuencia descrita en la figura 1, la secuencia en la posición 660 en adelante es de un gen de toxina binario Bs nativo.

~~106~~
106

Cualquier secuencia particular puede ser fácilmente ensayada al sustituirla en los ensayos enseñados en los ejemplos para determinar si esta tiene un efecto deletereo o ventajoso sobre la producción de toxina.

VII. 20 PROTEÍNA SIMILAR CHAPERONA 20KD.

En los métodos de la presente invención, las células huésped se transforman con un gen que codifica un gen de proteína de 20 kDa, que codifica una proteína conocida (Frutos et al., supra; Visick & Whitey, supra), para mejorar la producción de toxina binaria Bs. El gen de la proteína de 20 kDa se puede aislar y secuenciar, por ejemplo, de dos subespecies de *Bacillus turingiensis* (Frutos et al., Biochem. Syst. And Ecol 19: 599-609 (1991)). El nivel de expresión de la proteína de 20 kDa se ha caracterizado en células transformadas con gen de proteína de 20 kDa. Utilizando los métodos y la información de secuencia descrita aquí y en la solicitud de patente internacional W097/39623, el gen de proteína de 20 kDa se puede aislar por aquellos expertos y utilizar para construir vectores de expresión recombinantes para la transformación de una célula huésped.

107

Las células huésped transformadas con un gen de proteína de 20 kD debe ser competente para expresar la toxina binaria Bs. Las células pueden expresar la toxina binaria Bs, o las células se pueden transformar con vectores de expresión e toxina binaria exógena. Como se anotó antes, la secuencia de ambas proteínas de la toxina binaria Bs es conocida. Esta información de secuencia se puede utilizar por un experto en la técnica, junto con los métodos decritos aquí, para construir vectores recombinantes para la transformación de una célula huésped, tal como una célula Bs, con el gen que codifica la proteína de 20 kD. Convenientemente, el gen para la proteína de 20 kD se puede ubicar sobre el mismo plásmido que la secuencia de ácido nucleico para expresar altos niveles de toxina Bs.

VIII. SECUENCIAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y VECTORES

Un vector de expresión recombinantes para la transformación de una célula huésped se prepara al primero aislar las secuencias de polinucleótidos constituyentes, como se discutió aquí. Las secuencias de polinucleótidos, por ejemplo, una secuencia que codifica una toxina

108

binaria Bs manejada mediante un promotor como se discutió anteriormente, están entonces ligadas para crear un vector de expresión recombinante adecuado para la transformación de una célula huésped. Los métodos para aislar y preparar los polinucleótidos recombinantes son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual (2d ed. 1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995)), suministra suficiente información para dirigirla a personas expertas a través de muchos ejercicios de clonación.

Un método preferido para obtener polinucleótidos específicos combina el uso de iniciadores de oligonucleótido sintéticos con extensión o ligación de plimerasa sobre un molde de mRNA o ADN. Tal método, por ejemplo, RT, PCR, o LCR, amplifica la secuencia de nucleótidos deseada (ver patentes U. S. 4,683,195 y 4,683,202). Los sitios de restricción de endonucleasa se pueden incorporar en los iniciadores. Los polinucleótidos amplificados son purificados y ligados para formar un cassette de expresión. Las alteraciones en la secuencia de gen natural se pueden introducir mediante técnicas tales como mutagénesis in vitro e iniciadores que

~~109~~
109

utilizan PCR que se han diseñado para incorporar mutaciones apropiadas. Otro método preferido para aislar las secuencias de polinucleótidos utiliza sitios de restricción de endonucleasa conocidos para aislar fragmentos de ácido nucleico provenientes de plásmidos. Los genes de interés también se pueden aislar por un experto en la técnica utilizando iniciadores basados en secuencias de genes conocidos.

La secuencia de polinucleótidos aislada de escogencia, por ejemplo, la toxina binaria Bs manejada por la secuencia promotora discutida anteriormente, se inserta en un "vector de expresión", "vector de clonación", o "vector", términos que usualmente se refieren a plásmidos u otras moléculas de ácido nucleico que son capaces de replicarse en una célula huésped escogida. Los vectores de expresión se pueden replicar autónomamente o ellos se pueden replicar al ser insertados en el genoma de la célula huésped. A menudo, es deseable para el vector ser utilizable en más de una célula huésped, por ejemplo, en *E. coli* para clonación y construcción, y en *Bacillus thuringiensis* para expresión. Los elementos adicionales del vector pueden incluir, por ejemplo, marcadores seleccionables, por ejemplo,

resistencia a la tetraciclina o resistencia a la higromicina, que permite la supresión y/o selección de aquellas células transformadas con las secuencias de polinucleótidos deseadas (ver, por ejemplo, patente estadounidense 4,704,362). Los vectores particulares utilizados para transportar la información genética en las células tampoco es particularmente crítico. Cualquier vector adecuado utilizado para la expresión de proteína recombinante en células huésped se pueden utilizar. Un vector preferido es el pHT3101, el cual es un vector de lanzadera de *E. Coli-B. thuringiensis* (Lereclus et al., FEMS Microbiol. Lett. 60: 211-218 (1989)). Los vectores de expresión típicamente tienen un cassette de expresión que contienen todos los elementos requeridos para la expresión del polinucleótido de escogencia en una célula huésped. Un cassette de expresión típico contiene un promotor operablemente ligado a la secuencia de polinucleótidos de escogencia. El promotor utilizado para dirigir la expresión de la toxina binaria Bs es como se describió anteriormente, y está operablemente ligado a una secuencia que codifica uno o ambos de las proteínas de toxina binaria Bs. El promotor está preferiblemente ubicado aproximadamente a la misma distancia de el sitio de inicio de la transcripción heteróloga que lo que este

~~15~~
111

está del sitio de inicio de transcripción en su establecimiento natural. Como es conocido en la técnica, sin embargo, alguna variación en la distancia se puede acomodar sin pérdida de la función promotora. Para la expresión de la proteína de 20 kD codificada mediante el operon cryIIA, otros promotores adecuados para el manejo de la expresión de un gen heterólogo en una célula huésped se pueden utilizar, incluyendo aquellos típicamente utilizados en cassettes de expresión estándar, por ejemplo, el promotor β -galactosidasa. En una modalidad de la invención, el gen de proteína de 20 kD está operablemente ligado a los promotores BtI y BtII ("los promotores cryIAC") del gen cryIAC, creando un ácido nucleico heterólogo operablemente ligado a un promotor. El promotor cryIAC es altamente activo en condiciones de crecimiento que induce esporulación.

IX. EXPRESIÓN DE PROTEÍNA

Después de la construcción de aislamiento del vector de expresión recombinante, este se utiliza para transformar una célula huésped para expresión de la toxina binaria Bs. El procedimiento particular utilizado

para introducir el material genético dentro de la célula huésped para la expresión de una proteína no es particularmente crítico. Cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de polinucleótidos extraños en células huésped se puede utilizar. Los métodos de transformación, que varían dependiendo del tipo de célula huésped, incluyen electroporación, transfección que emplea cloruro de calcio, fosfato de calcio, cloruro de rubidio, dextrano DEAE, u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; infección (donde el vector es un agente infeccioso; y otros métodos (ver de manera general Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra). En algunas modalidades, las células huésped se pueden transformar mediante recombinación homóloga, como se describió en Poncet et al., Appl Environ Microbiol. 63: 4413-4420 (1997). Un método preferido de transformación de *B. turingiensis* es la electroporación, como se describe en Wu et al., Mol. Microbiol. 13: 965-972 (1994).

Los huéspedes para la transformación con gel de toxina binaria Bs incluye cualquier célula de bacteria huésped adecuada competente para expresar la proteína,

~~113~~
113

especialmente miembros del género bacilus. En modalidades particularmente preferidas, las células son células Bs o Bt. Los huéspedes que son transformados con la toxina binaria Bs son bacterias recombinantes útiles como insecticidas. Las supespecies preferidas de *Bacillus thuringiensis* incluyen, por ejemplo, *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki*, *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, y *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Una sepa preferida es la Bti IPS82.

Después de que la célula huésped se transforma con el gen de toxina primaria Bs, la célula huésped se incuba bajo condiciones adecuadas para la expresión de la toxina. Típicamente, el huésped crecerá bajo condiciones que promuevan la esporulación y la expresión de genes de endotoxina insecticidas. Las células huésped se pueden preparar en cualquier cantidad requerida al fermentar un inóculo en medio estándar conocido por aquellos expertos en la técnica. El medio, por ejemplo, contendrá de manera genral una fuente de nitrógeno y una fuente de carbohidratos, por ejemplo, glucosa. Las condiciones adecuadas para la incubación incluyen la temperatura en el rango de 15-45° C, preferiblemente 30° C, y un pH aproximadamente neutro. La incubación puede ser

convenientemente llevada a cabo en tandas, típicamente durante un periodo de 3 - 5 días.

Varios medios para crecer células BtI son conocidos en la técnica. En algunas modalidades preferidas, un inóculo proveniente de un cultivo de células huésped de almacenamiento crece sobre agar nutriente (BBL Microbiology Systems) o leche peptonizada (leche peptonizada al 1% [BBL Microbiology Systems], 1% de dextrosa, 0,2% de extracto de levadura, $MgSO_4$ 1,216 mM, $FeSO_4$ 0,072 mM, $ZnSO_4$ 0,139 mM, $MnSO_4$ 0,118 mM) con eritromicina a una concentración de 25 $\mu g/ml$, como se describió en los ejemplos.

La producción mejorada de toxina binaria Bs se observa después de que las células huésped competentes para expresar el gen de la toxina binaria Bs se transforma con el gen y las células crecen bajo condiciones adecuadas. La producción mejorada de latoina binaria Bs se puede observar mejor mediante métodos estándar conocidos por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, las inclusiones para esporales de endotoxinas insecticidas se puede purificar (ver Wu &

45
115

idénticos con los huéspedes transformados y crecen sobre medios comparativos. La mejora es cualquier incremento estadísticamente significativo en la producción de toxina binaria Bs. En una modalidad preferida, los cuerpos de papraespora son aislados mediante centrifugación de cultivos de lisado que son examinados mediante genes SDS-PAGE teñidos con azul Coomasie.

Figura 1. El nivel de expresión de toxina binaria en producción en Bt7... (a) y (b)...

El gen de toxina binaria... se introdujo en una... de Bacillus... utilizando... promotores cytlA... ubicada dentro del plásmido pHT51... como resultado una producción de... ser 15 veces o más mayor por... que aquella obtenida con la... tipo silvestre... crecida... por... adaptación... de...

~~186~~
116

mediante elctroforésis de gel de sulfato de dodecil sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE).

Table 1. Incrementos del rendimiento usando promotores cty1A y la secuencia STAB-SD para manejar la expresión del operon del gen de toxina binaria Bs 2362.

Cepa			Incremento en toxina binaria	Decrecimiento en toxinas Bti
Bs	2362	(tipo silvestre)	1	-
BtI	IPS82	(tipo silvestre)	-	1
Toxina	binaria		> 15 x	
Bti4Q7/Bss				
Toxina binaria	BtI		20 X.	.15-.35
IPS82 + Bs				

Example 2. Toxicidad de Bti no tóxico trabajado con ingeniería para exprsar toxina binaria Bs.

La toxicidad de la cepa BtI 4Q7 acristalífera, transformada para producir toxina binaria Bs 2362, se ensayó sobre la cuarta larva instar ("L₄") de Culex quinquefasciatus y comparada con la cepa Bs 2362 tipo

~~117~~
117

silvestre crecida en el mismo medio. (cepa BtI 4Q7 no produce normalmente toxinas Bs o BtI). El LC_{50} es la cantidad de toxina requerida para matar el 50% de las larvas presentes en una muestra durante un ensayo.

Como se muestra en la tabla 2 adelante, la cantidad de Bs2362 tipo silvestre necesaria para matar el 50% (" LC_{50} ") de la cuarta larva instar de mosquitos Culex fue de 15,0 ng/ml. La cepa BtI 4Q7, transformada mediante ácidos nucleicos de la invención para expresar la toxina Bs, tuvo un LC_{50} de 1,4 o aproximadamente 10 veces mejor toxicidad de aquella del Bs no alterado.

Ejemplo 3. Toxicidad de BtI trabajado con ingeniería para expresar toxina binaria Bs

La transformación de Bacillus turingiensis subsp. israelensis con el plásmido descrito en el ejemplo 1 que produce la toxina binaria Bs2362 incrementó la toxicidad por al menos diez veces contra las especies Culex comparadas con cualquiera de las cepas parentales (Bs or Bti).

118

El Bti es la cepa de bti utilizada como biopesticida comercial. Como se puede ver de la tabla 2, la cantidad de esta cepa necesaria para matar el 50% ("LC₅₀") de la cuarta larva instar ("L₄") de los mosquitos *Culex* fue de 19,5 ng/ml. La cepa Bs tipo silvestre 2362 tuvo un LC₅₀ de 15 ng/ml. La cepa BtI IPS82, transformada mediante ácidos nucleicos de la invención para expresar la toxina Bs, tuvo un LC₅₀ de 1,5 o aproximadamente 13 veces mejor toxicidad que aquella del Bs no alterado.

Tabla 2. Toxicidad de un Bti/Bs2362 recombinante a L4
Culex quinquefasciatus

Cepa	LC ₅₀ (ng/ml)	Proporción	
		<u>Bti</u> Bti/Bs	<u>Bs</u> Bti/Bs
BtI IPS82	19,5	1,0	-
Bs 2362	15,0	-	1,0
Toxina binaria	1,4	-	10,0
Bti4Q7/Bs			
Toxina binaria	1,5	13,0	-
BtI IPS82 + Bs			

189
119

Ejemplo 4. Materiales y métodos usados en los ejemplos 1-3

A. Cepas bacteriales, gen, plásmidos y transformación

La cepa de *B. esfericus* 2362 se obtuvo de una preparación en polvo que fue amablemente suministrada por Abbott Laboratories (North Chicago, IL). El vector de expresión de lanzadera *Escherichia coli*-*B. turingiensis* pHT3103 (Lereclus et al. FEMS Microbiol. Lett. 51: 211-7 (1989)) se utilizó para hacer y amplificar la construcción de plásmido (PPHSP-1) en *E. coli* DH5A. La construcción PPHSP-1 se expresó en una cepa cristalífera, de 4Q7, de *B. turingiensis* subsp. *Israelensis* obtenida del centro de almacenamiento de *Bacillus* en la Ohio State University (Columbus, OH), o en *B. turingiensis* subsp. *israelensis* IPS82 (Abbott Laboratories). El vector basado en pHT3101 modificado (pSTAB-SD) que contiene el fragmento 660-bp con los promotores *cyt1A* y la secuencia STAB-SD (Agaisse and Lereclus, Mol. Microbiol., 20: 633-643 (1996)) se describió previamente (Park et al., FEMS Microbiol Lett 181: 319-327 (1999)). Los plásmidos se purificaron utilizando un kit QIAprep Spin Miniprep

120
170

(Qiagen Inc.). Las cepas de *Bacillus* se transformaron mediante electroporación como se describió por Park et al. *App Environ. Microbiol* 64: 3932-3938 (1998).

B. Amplificación PCR del gen que codifica las proteínas entomicidas de *B. esfericus*

La preparación de plásmido crudo hecha de *B. esfericus* 2362 utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). El gen que codifica la proteína 54,1 kDa y la proteína entomocida de 41,9 kDa de *B. esfericus* (Baumann et al., *J. Bacteriol.* 170: 2045- 2050 (1988), GenBank M20390) se obtuvo mediante PCR utilizando polimerasa ADN Vent (Exo+) (Biolabs) y los iniciadores BSP-1 (5'aactgcag CTTGTCAACATGTGAAGATTAAAGGTAACCTTCAG-3' (SEC ID NO.: 10)) y BSP-2 (5'aactgcag CCAAACAACAACAGTTTACATTCGAGTGTAAGTTTC-3' (SEC ID NO: 11)) (Genosys). El producto de PCR de 3,4 kbp se digirió con PstI y se clonó en el mismo sitio del pHT3101 para generar. El fragmento HpaI-PstI de 3,0 kbp en pHBS se clonó en los sitios xbaI y PstI llenos en PSTAB-SD para generar PPHSP-1.

~~31~~
121

C. Crecimiento de cepas bacteriales

Las cepas de *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 4Q7/pPHSP-1 y *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82/pPHSP-1 crecieron sobre agar nutriente (BBL Microbiology Systems) o leche peptonizada (1% leche peptonizada [BBL Microbiology Systems], 1% dextrosa, 0.2% extracto de levadura, MgSO_4 1.216 mM, FeSO_4 0.072 mM, ZnSO_4 0.139 mM, MnSO_4 0.118 mM) con eritromicina a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$. Para bioensayos con insectos, se hizo crecer, *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* IPS82/pPHSP-1 en 25 ml de leche peptonizada con eritromicina (25 $\mu\text{g/ml}$) en un incubador agitador establecido a 28 °C, 250 rpm/min durante 6 días, tiempo durante el cual >98% de las células se habían esporulado y lisado. Las esporas y cristales se cosecharon mediante centrifugación a 4° C, 6.000 x g for 15 min. El pelmazo fue lavado diez veces en agua y secado en una cámara de vacío.

222
122

**D. Electroforesis de gel de sulfato docacil
sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Después de 6 días de crecimiento de leche peptonizada, se recolectó 1 ml de cultivo lisado y se enctrifugó a 10000 x g durante 5 min. El medio se descartó y se agregaron 150 µl de amortiguador TE (10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1 mM EDTA) y 150 de un amortiguador de muestra 2X (Laemmli, 1970). Las proteínas se fraccionaron mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

E. Bioensayos

Para los bioensayos, se expusieron grupos de 20 instars cuartos tempranos a una rango de concentraciones de la espora liofilizada/polvos de cristal en 100 ml de agua desionizada mantenida en 237 ml de copas plásticas. Siete de nueve diferentes concentraciones de polvo se replicaron en cinco diferentes días.

~~123~~
123

F. Microscopía

Los cultivos esporulantes se monitorearon mediante microscopía de luz con un fotomicroscopio Zeiss, utilizando un objetivo de inmersión en aceite de 100X. Para microscopía electrónica de transmisión, las células esporuladas provenientes de los cultivos de leche peptonizada se recolectaron justo antes de la lisis, se fijaron durante 2 h en 3% de fosfato - glutaraldehído amortiguado y 0,25% de sucrosa, se posfijaron en 1% de SO_4 , se deshidrataron en etanol-óxido de propileno, se embebieron en Epon-Araldite (IBARRA y Federici, J. Bacteriol. 165: 527-533 (1986)). Las secciones ultradelgadas de células esporuladas se examinaron y se fotografiaron en un microscopio electrónico Hitachi 600 que opera con un voltaje de aceleración de 75 kV.

~~124~~
124

Ejemplo 5. La proteína Cyt1A reestablece la susceptibilidad a la toxina Bs de mosquitos altamente resistentes a esa toxina.

A. Materiales y métodos

Cepas y toxinas bacteriales

Las preparaciones de toxinas utilizadas en este estudio fueron polvos liofilizados de cultivos lisados de *B. esfericus* 2362 y una cepa recombinante de *Bacillus turingiensis* subsp. *israeliensis* que solo produce Cyt1Aa (Wu y Federici, J. Bacteriol. 175: 5276-5280 (1993)). Estos polvos contneían la espora y el cristal, (esto es, el cuerpo paraesporal) junto con desperdicios de células y medios sólidos que resultan de la liofilización. Los polvos específicos ensayados fueron (1) la cepa *B. esfericus* 2362, obtenida como un polvo técnico de una cepa tipo silvestre de Abbott Laboratories (North Chicago, IL); (2) Cyt1Aa, una cepa recombinante de BTI anotada anteriormente; y (3) BTI 4Q7, una cepa acristalífera de esta subespecie que no produce ninguna endotoxina. Esta cepa se obtuvo del centro de almacenamiento de *Bacillus* (Ohio State University,

~~125~~
125

Columbus, OH) y se utilizó como uno de los controles. Los polvos liofilizados de cristales Cyt1A purificados (Wu y Federici, supra) también se utilizaron.

Producción de polvos de toxina y almacenamiento

Las cepas de bacterias que producen las varias toxinas fueron crecidas en un medio sólido o líquido como se describió previamente (Wirth et al., Proc Natl. Acad. Sci USA, 94: 10536- 10540 (1997), Park et al., Appl Environ Microbiol. 64: 3932-3938 (1998)). Las células esporuladas se lavaron en agua destilada, se sedimentaron, y el pelmazo resultante se liofilizó. Para la selección de mosquitos y los bioensayos, las suspensiones de almacén de los polvos se prepararon en agua destilada y se homogeneizaron con la ayuda de aproximadamente 25 glóbulos de vidrio. Se prepararon almacenamientos mensualmente y se prepararon semanalmente diluciones en serie de 10 veces. Todos los almacenamientos y diluciones se congelaron a -20° C cuando no estaban en uso.

~~126~~
126

Cepas de Mosquitos

Dos cepas de *Cx. Quinquefasciatus* se utilizaron; BS-R, una cepa resistente a *B. sphaericus* 2362, y Syn-P, una cepa no seleccionada, no resistente. El BS-R ha sido seleccionado con *B. esfericus* 2362 desde 1992 y rutinariamente sobrevive 48 h de exposición a 1000 µg/ml, una concentración de 149,000 veces mayor que la concentración que mata el 50% del Syn-P, La cepa sensible de referencia. El Syn-P es una población "sintética" de *CX. quinquefasciatus* derivada de poblaciones de larvas recolectadas en 1995 de 3 diferentes áreas geográficas del sur de california. Esta colonia se ha mantenido en el laboratorio sin exposición a *B. esfericus*.

Procedimiento de selección y bioensayo

Como se anotó anteriormente, la cepa Bs-R ha sido mantenida bajo presión de selección con *B. esfericus* desde 1992. La selección consistió de grupos de exposición de ca 1,000 instars cuartos tempranos a concentraciones de *B. esfericus* que varían entre 100-120 µg/ml en recipientes metálicos esmaltados enlozados en

127
128

aproximadamente 1 L de agua desionizada durante 48-96 h. la mortalidad promedio de las larvas bajo selección fue del 10% o menos por selección, y los sobrevivientes se utilizaron par continuar la colonia.

Para los bioensayos, se expusieron grupos de 120 instar cuartos tempranos a un rango de concentración de esporas liofilizadas/polvos de cristal en 100 ml de agua desionizada mantenida en copas de plástico de 237 ml. 7 de nueve diferentes concentraciones de polvos, que produjeron mortalidad entre 2 y 98% después de 48 h, se replicaron en 5 diferentes días. Para los bioensayos en los cuales se ensayaron diferentes combinaciones de cyt1A y B. esfericus 2362, diferentes proporciones de estas toxinas estuvieron basadas en los pesos de los polvos liofilizados de la sepa bacterial.

En razón a que la cantidad de cristales Cyt1A purificada fue limitada, los bioensayos con este polvo utilizaron 10 instar cuartos tempranos mantenidos en 10 ml de agua desionizada en copas plásticas de 30 ml y replicados en 2 - 3 diferentes días. Los bioensayos combinan polvos técnicos de B. esfericus 2362 y cristales purificados de Cyt1A en una proporción 10: 1 (10 partes

~~128~~
128

de B. esfericus 2362: 1 parte de ecrystal Cyt1A) estuvieron basados en los pesos de los polvos liofilizados de B. esfericus 2362 y Cyt1A.

Todos los datos fueron sometidos a análisis de probidad utilizando un programa para el PC. Los valores de dosis de respuesta con límites fiducialestraslapantes no fueron consideradas como significativamente diferentes. Las proporciones de resistencia se calcularon al dividir el respectivo valor de concentración letal por la cepa BS-R por aquella de la cepa Syn-P. Las proporciones de resistencia cuyos límites fiduciales contenían el número uno no fueron consideradas significativas.

Evaluación del sinergismo

Interacción sinérgica entre B. esfericus 2362 y cyt1A fueron evaluados utilizando el método de Tabashnik, Appl Environ Entomol 58: 3343-3346 (1992). Los valores de concentración letal teórica para las diferentes muestras de cyt1A y B. esfericus 2362 se calcularon de los medios sarmónicos pesados de los alores individuales para estas toxinas. En razón a que el polvo de B. esfericus 2362 no

~~129~~
129

era tóxico para la sepa BS-R en cualquiera de las concentraciones ensayadas, el cálculo de la toxicidad teórica de la combinación Cyt1A y B. esfericus 2362 se basó en la toxicidad y proporción del Cyt1A solo para esta cepa. El factor sinérgico (SF), definido como la proporción del valor de concentración letal teórico al valor de concentración letal observado, se determinó para la combinación de B. esfericus 2362 y la cepa Cyt1A así como también para la combinación de B. esfericus 2362 y cristales Cyt1A purificados. Cuando la proporción fue mayor de 1, la interacción de toxinas se consideró sinérgica en razón a que la toxicidad excedía el valor predicho de la toxicidad aditiva individual. Cuando la proporción era menor de 1, la interacción se consideró antagonista, mientras que una proporción de uno indicó que los valores eran aditivos.

B. Resultados

En los bioensayos para determinar los valores de una base de toxina bajo condiciones contra las cepas de mosquitos resistentes y sensibles, o hubo mortalidad resultante de la exposición de BS-R, la cepa resistente

130

de *Cx. quinquefasciatus*, a 1000 µg/ml de *B. esfericus* 2362. Esta concentración fue de 149,000 veces mayor que el LC_{50} (0,0067 µg/ml) obtenida contra Syn-P, la cepa sensible. Cuando se llevaron a cabo los bioensayos en 10 ml de agua con 10 larvas por copa en lugar de 20 larvas en 100 ml, no se obtuvo mortalidad contra BS-R, pero la toxicidad de BS 2362 fue inferior (LC_{50} , 0,032 µg/ml) contra Syn-P. incrementando la densidad de larvas se ha mosrtado previamente requerir menores cantidades de toxina Bti para inducir el mismo nivel de mortalidad observado en densidades inferiores (toxin to induce the same level of mortality observed at lower densities (Aly et al. 1988)). La diferencia estimada en la sensibilidad de BS-R y Syn-P utilizando un sistema de bioensayo más pequeño fue de 31.000 veces.

La cepa bacterial Cyt1A fue ligeramente menos tóxica que la cepa BS-R (LC_{50} , 32,5 µg/ml) que para Syn-P (LC_{50} , 11,7 µg/ml) en sistemas de bioensayo estándar. Sin embargo, en los ensayos utilizando cristales Cyt1A en el sistema de bioensayo más pequeño, no se observó diferencia en sensibilidad (LC_{50} s, ca. 20 µg/ml) entre BS-R y Syn-P.

~~31~~
B1

Agregando *CytlA* al *B. esfericus* 23621 as preparaciones restablecieron la mayoría de su toxicidad contra la cepa de *Cx. quinquefasciatus* resistente a BS-R. Una proporción de *B. esfericus* 2362 a *CytlA* de 10: 1 fue altamente tóxica tanto para las cepas de mosquitos resistentes como sensibles. Los niveles de toxicidad para esta combinación fueron mayores contra Syn-P que BS-R con valores de LC_{95} de 0,442 y 36,6 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, y una proporción de resistencia LC_{95} de 82,9 para BS-R. La proporción 5:1 fue más tóxica hacia el Syn-P y BS-R, y la proporción de resistencia en el nivel LC_{95} se redujo a 34,4 veces. A una proporción de 3: 1 *B. esfericus* 2362: *CytlA*, la mezcla fue de nuevo significativamente más tóxica a BS-R (LC_{50} , 1,99 $\mu\text{g/ml}$), y la proporción de resistencia disminuyó a 165,4 veces a un nivel LC_{95} . La toxicidad a una proporción 1: 1 contra BS-R no fue significativamente diferente de aquella de la proporción 3: 1. En total, como la proporción de *B. esfericus* 2362 a *CytlA* se incrementó, la toxicidad se incrementó hacia tanto las cepas de mosquito resistentes como sensibles. Sin embargo, las proporciones de resistencia a los valores LC_{95} para BS-R declinaron hasta niveles

132

insignificantes para las proporciones de 1: 3, 1: 5 y 1:10, en los cuales el cyt1A era el principal componente.

Los cálculos de SF para estas combinaciones revelaron sinergismos significativos entre cyt1A y *B. esfericus* 2362 contra la cepa BS-R, pero no contra Syn-P. los valores SF variaron desde 10-137 en el nivel LC₉₅ para BS-R. Los niveles más altos del sinergismo se observaron en las combinaciones en las cuales el Cyt1A estaba presente en la proporción más baja (10: 1,5: 1,3: 1). Estas combinaciones fueron antagonistas hacia Syn-P en el nivel LC₉₅ en proporciones 1: 10, 1: 5, y 1: 3, y aditiva o medianamente sinérgica en proporciones de 1 : 1, 3: 1, 5: 1, y 10: 1, por es decir, donde el *B. esfericus* se hizo el componente predominante.

Los bioensayos utilizando *B. esfericus* 2362 combinados con los cristales de Cyt1A purificados a una proporción de 10: 1 demostraron que esta combinación fue altamente tóxica tanto para BS-R (LC₉₅, 4.96 µg/ml) y Syn-P (LC₉₅, 2,37 µg/ml). Aunque la cepa BS-R fue ligeramente menos sensible a la mezcla, los valores de toxicidad no fueron significativamente diferentes. De manera

~~133~~
133

importante, no se detectó resistencia contra la cepa BS-R con esta combinación, lo cual tuvo un alto valor SF de 278.

C. Discusión

Combinar Cyt1A con BS 2362 restableció la toxicidad del último contra una cepa altamente resistente de *Cx. quinquefasciatus*. Más aún, fuimos capaces completamente de restablecer la toxicidad con concentraciones sub letales de cristales Cyt1A, y por lo tanto suprimir la resistencia a *B. esfericus* en la cepa de mosquito BS-R. Como contraste al alto nivel de actividad observado contra la población de mosquito resistente, poca o ninguna actividad resultó con estas mismas mezclas contra la cepa de referencia no resistente, Syn-P.

La capacidad de Cyt1A a bajas concentraciones para reestablecer la alta toxicidad a *B. esfericus* 2362 contra mosquitos resistentes tiene implicaciones prácticas para el control de poblaciones de *Culex* y proporciona percepción dentro de su modo de acción. Los larbicidas bacterianos basados en *B. esfericus* son utilizados en varios países y la resistencia en poblaciones de campo de

~~34~~
134

Cx. quinquefasciatus ya ha sido reportada en Francia, Brasil, e India. Los resultados de nuestros estudios indican que agregar Cyt1A a una proporción tan baja como 1: 10 a larvicidas de B. esfericus reestablece la mayoría de la toxicidad contra aún poblaciones altamente resistentes de Cx. quinquefasciatus. Por lo tanto, el Cyt1A proporciona una herramienta práctica para el manejo de la resistencia de B. esfericus. Adicionalmente, agregar una pequeña cantidad de Cyt1A a preparaciones de B. esfericus puede demorar la resistencia en poblaciones de mosquitos en los cuales aún no se ha desarrollado.

Otros han mostrado que una diferente proteína cyt, CYT1Ab de Bacillus turingiensis subsp. medellin, puede surimir resistencia a B. esfericus 2297, una cepa mosquitocida de esta bacteria que produce un gran cristal de toxina, en Cx. pipiens (Thiery et al. 1998). Sin embargo, la supresión de Cyt1AB de resistencia a B. esfericus B. esfericus 2297 fue mucho menos efectiva que la supresión de Cyt1A de resistencia de B. esfericus. La capacidad reducida de B. esfericus. La capacidad reducida de Cyt1Ab para suprimir la resistencia a B. esfericus 2297 podría ser debida a la toxicidad 5 veces inferior de esta toxina Cyt a Cx. pipiens en comparación con la Cyt1A

2/135

(Thiery et al. Appl Environ Microbiol 63: 468- 473 (1997)).

La forma como el Cyt1A reestablece la toxicidad de *B. esfericus* 2362 es desconocida. Sin embargo, estudios previos del mecanismo de resistencia de nuestra cepa Bs-r de *Cx. quinquefasciatus* y las propiedades de unión de Cyt1A sugieren que el Cyt1A ayuda a unir y la inserción de la toxina en la membrana microbilar. Nuestra cepa resistente de *Cx. quinquefasciatus* no tiene receptor funcional para el *B. esfericus* 2362 para la toxina funcional para la toxina de *B. esfericus* 2362 y por lo tanto esta no se puede unir efectivamente al microbilio del intestino medio. Estudios de Cyt1A han mostrado que esto perturba las membranas al unirse a la porción de lípidos, y que esto también se une a toxinas cry. Más aún, en la presencia de toxinas BTI Cry, el Cyt1A se une al microbilio de las células "caeca gástrica" e intestino medio posterior de la larva de mosquito. Estas observaciones sugieren varios mecanismos para reestablecer la toxicidad del *B. esfericus*. Las toxinas de cyt1A y *B. esfericus* pueden unirse juntas después de la disolución, y luego insertarse en la membrana como un complejo debido a las propiedades liofílicas del Cyt1A.

256
136

Otra posibilidad es que el Cyt1A pueda primero unirse a la membrana después de lo cual las toxinas de *B. esfericus* se unen al Cyt1A y se insertan en la membrana. Finalmente, el cyt1A puede permear la membrana originando lesiones que le permiten a la toxina de *B. esfericus* ganar acceso al objetivo original.

El sinergismo que obtuvimos con las combinaciones de Cyt1A y *B. esfericus* 2362 también proporcionan evidencia adicional de que el Cyt1A mejora la toxicidad al ayudar a otras toxinas de proteína a unirse a la membrana microviral del mosquito, especialmente aquellas que no se unen eficientemente. En estudios previos demostramos que el Cyt1A puede sinergizar toxinas Cry4 y Cry11 provenientes de cepas de mosquitocidas de *Bacillus thuringiensis* contra mosquitos resistentes. Sin embargo, el sinergismo en mosquitos no resistentes se observó solo con toxinas Cry4 y Cry11A de BtI, no con toxinas cry11B proveniente de *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*; que es mucho más tóxica que la Cry11A. Un patrón similar de sinergismo se observó en el estudio normal en donde el Cyt1A sinergizó la toxicidad de *B. esfericus* 2362 contra la cepa BS-R resistente, pero no contra la cepa Syn-P sensible. Las implicaciones de estos resultados, en

~~32~~
138

conjunto con augellas obtenidas en los estudios previos citados anteriormente, es que las toxinas que son altamente tóxicas o tiene una alta afinidad de unión, tales como la Cry11B o la toxina binaria B. esfericus 2362, ganan poco o ningún valor de la ayuda asistida por el Cyt1A. Pero cuando los receptores de toxina son modificados o pierden resistencia, la capacidad del Cyt1A para unirse y perturbar la membrana microbiliar reestablecer la capacidad de estas toxinas para insertarse dentro de la membrana y ejercer toxicidad. Como ambas las toxinas Cyt1A y B. esfericus se disuelven en el lumen del intestino medio del mosquito, ellas pueden asociarse inmediatamente después de la disolución en el lumen así como también en la superficie de membrana microviral. Una implicación de estos resultados es que el Cyt1A, y posiblemente otras proteínas Cyt pueden extender el espectro insecticida de toxinas de proteína diferentes a cyt a otras especies de insectos.

138

Tabla 3. Toxicidad de polvo técnico de *B. esfericus* (cepa 2362), polvo de cristal/espore de *cyt1A* proveniente de *Bacillus turingiensis* sobs. *Israeliensis*, y varias combinaciones de *B. esfericus* y *cyt1A* contra *C. quinquefasciatus* (Bs-R) susceptible a (Syn-P) y resistente a *B. esfericus*

Tecno(s)	Dosis	Nº	LC ₅₀ (µg/ml) (Intervalo 95%)	LC ₅₀ (µg/ml) (Intervalo 95%)	Stapa (p. 28)	r ²	Resistencia a B. esfericus		R ²	
			LC ₅₀ (µg/ml)	LC ₅₀ (µg/ml)			LC ₅₀ (µg)	LC ₅₀ (µg)	LC ₅₀	LC ₅₀
<i>B. esfericus</i> (cepa 2362)										
	Syn-P	1,100	0.00671 (0.0055-0.0082)	0.466 (0.308-0.790)	0.89 (0.043)	15.1	1.0	1.0		
	Bs-R	600	No mortality at 1,000 µg/ml				-145,000			
<i>Cyt1A</i>										
	Syn-P	600	11.7 (10.3-13.4)	33.3 (27.7-39.7)	2.3 (0.16)	7.3	1.0	1.0		
	Bs-R	700	32.5 (25.3-37.6)	221 (172-304)	2.0 (0.12)	4.1	2.7 (2.3-3.3)	3.7 (2.4-5.3)		
<i>B. esfericus</i> + <i>Cyt1A</i> (10:1)*										
	Syn-P	900	0.0288 (0.0163-0.0501)	0.0422 (0.102-1.23)	1.4 (0.11)	22.8	1.0	1.0	0.26	1.3
	Bs-R	800	2.47 (1.46-4.10)	34.6 (14.8-87.6)	1.4 (0.17)	25.4	85.8 (56.3-128)	82.9 (38-174)	130	61
<i>B. esfericus</i> + <i>Cyt1A</i> (5:1)										
	Syn-P	700	0.0274 (0.0223-0.0322)	0.276 (0.209-0.367)	1.6 (0.10)	3.4	1.0	1.0	0.29	2.0
	Bs-R	1,000	1.33 (1.06-1.67)	9.38 (7.49-12.8)	1.5 (0.11)	12.5	45.0 (38.1-53.2)	34.4 (28.3-44.9)	153.9	134.3
<i>B. esfericus</i> + <i>Cyt1A</i> (3:1)										
	Syn-P	800	0.0147 (0.0084-0.0214)	0.033 (0.177-2.48)	1.0 (0.12)	17.1	1.0	1.0	0.6	1.0
	Bs-R	600	1.99 (1.40-2.22)	7.17 (3.87-13.1)	2.9 (0.22)	6.0	497 (255-947)	15.4 (10.9-1.7)	66	134
<i>B. esfericus</i> + <i>Cyt1A</i> (1:1)										
	Syn-P	1,000	0.0311 (0.0223-0.0449)	0.464 (0.348-0.637)	1.5 (0.08)	10.1	1.0	1.0	0.35	2.0
	Bs-R	1,000	0.733 (0.632-0.833)	6.0 (5.06-7.7)	1.7 (0.09)	3.3	19.3 (16.5-22.5)	14.0 (10.5-18.7)	56	69
<i>B. esfericus</i> + <i>Cyt1A</i> (1:3)										
	Syn-P	900	0.134 (0.101-0.167)	7.34 (5.00-12.5)	1.1 (0.06)	11.3	1.0	1.0	0.11	0.34
	Bs-R	900	1.71 (1.49-2.00)	18.4 (14.1-23.3)	1.6 (0.09)	6.3	7.3 (6.3-8.5)	2.4 (1.8-3.2)	25	16
<i>B. esfericus</i> + <i>Cyt1A</i> (1:5)										
	Syn-P	1,000	0.109 (0.149-0.236)	2.94 (4.46-10.6)	1.1 (0.08)	17.1	1.0	1.0	0.21	0.39
	Bs-R	900	1.56 (1.34-1.81)	11.5 (9.22-15.9)	1.9 (0.11)	6.9	8.3 (6.9-9.6)	1.3 (1.3-2.1)	25.3	23.0
<i>B. esfericus</i> + <i>Cyt1A</i> (1:10)										
	Syn-P	900	1.06 (0.819-1.29)	25.9 (18.1-40.1)	1.3 (0.07)	4.3	1.0	1.0	0.10	0.17
	Bs-R	900	4.72 (4.13-5.38)	24.6 (18.9-32.0)	2.3 (0.17)	13.0	4.4 (3.7-5.3)	1.9 (0.9-1.5)	7.7	10.0

~~2~~ ~~3~~ ~~4~~ ~~5~~ ~~6~~ ~~7~~ ~~8~~ ~~9~~ ~~10~~ ~~11~~ ~~12~~ ~~13~~ ~~14~~ ~~15~~ ~~16~~ ~~17~~ ~~18~~ ~~19~~ ~~20~~ ~~21~~ ~~22~~ ~~23~~ ~~24~~ ~~25~~ ~~26~~ ~~27~~ ~~28~~ ~~29~~ ~~30~~ ~~31~~ ~~32~~ ~~33~~ ~~34~~ ~~35~~ ~~36~~ ~~37~~ ~~38~~ ~~39~~ ~~40~~ ~~41~~ ~~42~~ ~~43~~ ~~44~~ ~~45~~ ~~46~~ ~~47~~ ~~48~~ ~~49~~ ~~50~~ ~~51~~ ~~52~~ ~~53~~ ~~54~~ ~~55~~ ~~56~~ ~~57~~ ~~58~~ ~~59~~ ~~60~~ ~~61~~ ~~62~~ ~~63~~ ~~64~~ ~~65~~ ~~66~~ ~~67~~ ~~68~~ ~~69~~ ~~70~~ ~~71~~ ~~72~~ ~~73~~ ~~74~~ ~~75~~ ~~76~~ ~~77~~ ~~78~~ ~~79~~ ~~80~~ ~~81~~ ~~82~~ ~~83~~ ~~84~~ ~~85~~ ~~86~~ ~~87~~ ~~88~~ ~~89~~ ~~90~~ ~~91~~ ~~92~~ ~~93~~ ~~94~~ ~~95~~ ~~96~~ ~~97~~ ~~98~~ ~~99~~ ~~100~~ ~~101~~ ~~102~~ ~~103~~ ~~104~~ ~~105~~ ~~106~~ ~~107~~ ~~108~~ ~~109~~ ~~110~~ ~~111~~ ~~112~~ ~~113~~ ~~114~~ ~~115~~ ~~116~~ ~~117~~ ~~118~~ ~~119~~ ~~120~~ ~~121~~ ~~122~~ ~~123~~ ~~124~~ ~~125~~ ~~126~~ ~~127~~ ~~128~~ ~~129~~ ~~130~~ ~~131~~ ~~132~~ ~~133~~ ~~134~~ ~~135~~ ~~136~~ ~~137~~ ~~138~~ ~~139~~ ~~140~~ ~~141~~ ~~142~~ ~~143~~ ~~144~~ ~~145~~ ~~146~~ ~~147~~ ~~148~~ ~~149~~ ~~150~~ ~~151~~ ~~152~~ ~~153~~ ~~154~~ ~~155~~ ~~156~~ ~~157~~ ~~158~~ ~~159~~ ~~160~~ ~~161~~ ~~162~~ ~~163~~ ~~164~~ ~~165~~ ~~166~~ ~~167~~ ~~168~~ ~~169~~ ~~170~~ ~~171~~ ~~172~~ ~~173~~ ~~174~~ ~~175~~ ~~176~~ ~~177~~ ~~178~~ ~~179~~ ~~180~~ ~~181~~ ~~182~~ ~~183~~ ~~184~~ ~~185~~ ~~186~~ ~~187~~ ~~188~~ ~~189~~ ~~190~~ ~~191~~ ~~192~~ ~~193~~ ~~194~~ ~~195~~ ~~196~~ ~~197~~ ~~198~~ ~~199~~ ~~200~~ ~~201~~ ~~202~~ ~~203~~ ~~204~~ ~~205~~ ~~206~~ ~~207~~ ~~208~~ ~~209~~ ~~210~~ ~~211~~ ~~212~~ ~~213~~ ~~214~~ ~~215~~ ~~216~~ ~~217~~ ~~218~~ ~~219~~ ~~220~~ ~~221~~ ~~222~~ ~~223~~ ~~224~~ ~~225~~ ~~226~~ ~~227~~ ~~228~~ ~~229~~ ~~230~~ ~~231~~ ~~232~~ ~~233~~ ~~234~~ ~~235~~ ~~236~~ ~~237~~ ~~238~~ ~~239~~ ~~240~~ ~~241~~ ~~242~~ ~~243~~ ~~244~~ ~~245~~ ~~246~~ ~~247~~ ~~248~~ ~~249~~ ~~250~~ ~~251~~ ~~252~~ ~~253~~ ~~254~~ ~~255~~ ~~256~~ ~~257~~ ~~258~~ ~~259~~ ~~260~~ ~~261~~ ~~262~~ ~~263~~ ~~264~~ ~~265~~ ~~266~~ ~~267~~ ~~268~~ ~~269~~ ~~270~~ ~~271~~ ~~272~~ ~~273~~ ~~274~~ ~~275~~ ~~276~~ ~~277~~ ~~278~~ ~~279~~ ~~280~~ ~~281~~ ~~282~~ ~~283~~ ~~284~~ ~~285~~ ~~286~~ ~~287~~ ~~288~~ ~~289~~ ~~290~~ ~~291~~ ~~292~~ ~~293~~ ~~294~~ ~~295~~ ~~296~~ ~~297~~ ~~298~~ ~~299~~ ~~300~~ ~~301~~ ~~302~~ ~~303~~ ~~304~~ ~~305~~ ~~306~~ ~~307~~ ~~308~~ ~~309~~ ~~310~~ ~~311~~ ~~312~~ ~~313~~ ~~314~~ ~~315~~ ~~316~~ ~~317~~ ~~318~~ ~~319~~ ~~320~~ ~~321~~ ~~322~~ ~~323~~ ~~324~~ ~~325~~ ~~326~~ ~~327~~ ~~328~~ ~~329~~ ~~330~~ ~~331~~ ~~332~~ ~~333~~ ~~334~~ ~~335~~ ~~336~~ ~~337~~ ~~338~~ ~~339~~ ~~340~~ ~~341~~ ~~342~~ ~~343~~ ~~344~~ ~~345~~ ~~346~~ ~~347~~ ~~348~~ ~~349~~ ~~350~~ ~~351~~ ~~352~~ ~~353~~ ~~354~~ ~~355~~ ~~356~~ ~~357~~ ~~358~~ ~~359~~ ~~360~~ ~~361~~ ~~362~~ ~~363~~ ~~364~~ ~~365~~ ~~366~~ ~~367~~ ~~368~~ ~~369~~ ~~370~~ ~~371~~ ~~372~~ ~~373~~ ~~374~~ ~~375~~ ~~376~~ ~~377~~ ~~378~~ ~~379~~ ~~380~~ ~~381~~ ~~382~~ ~~383~~ ~~384~~ ~~385~~ ~~386~~ ~~387~~ ~~388~~ ~~389~~ ~~390~~ ~~391~~ ~~392~~ ~~393~~ ~~394~~ ~~395~~ ~~396~~ ~~397~~ ~~398~~ ~~399~~ ~~400~~ ~~401~~ ~~402~~ ~~403~~ ~~404~~ ~~405~~ ~~406~~ ~~407~~ ~~408~~ ~~409~~ ~~410~~ ~~411~~ ~~412~~ ~~413~~ ~~414~~ ~~415~~ ~~416~~ ~~417~~ ~~418~~ ~~419~~ ~~420~~ ~~421~~ ~~422~~ ~~423~~ ~~424~~ ~~425~~ ~~426~~ ~~427~~ ~~428~~ ~~429~~ ~~430~~ ~~431~~ ~~432~~ ~~433~~ ~~434~~ ~~435~~ ~~436~~ ~~437~~ ~~438~~ ~~439~~ ~~440~~ ~~441~~ ~~442~~ ~~443~~ ~~444~~ ~~445~~ ~~446~~ ~~447~~ ~~448~~ ~~449~~ ~~450~~ ~~451~~ ~~452~~ ~~453~~ ~~454~~ ~~455~~ ~~456~~ ~~457~~ ~~458~~ ~~459~~ ~~460~~ ~~461~~ ~~462~~ ~~463~~ ~~464~~ ~~465~~ ~~466~~ ~~467~~ ~~468~~ ~~469~~ ~~470~~ ~~471~~ ~~472~~ ~~473~~ ~~474~~ ~~475~~ ~~476~~ ~~477~~ ~~478~~ ~~479~~ ~~480~~ ~~481~~ ~~482~~ ~~483~~ ~~484~~ ~~485~~ ~~486~~ ~~487~~ ~~488~~ ~~489~~ ~~490~~ ~~491~~ ~~492~~ ~~493~~ ~~494~~ ~~495~~ ~~496~~ ~~497~~ ~~498~~ ~~499~~ ~~500~~ ~~501~~ ~~502~~ ~~503~~ ~~504~~ ~~505~~ ~~506~~ ~~507~~ ~~508~~ ~~509~~ ~~510~~ ~~511~~ ~~512~~ ~~513~~ ~~514~~ ~~515~~ ~~516~~ ~~517~~ ~~518~~ ~~519~~ ~~520~~ ~~521~~ ~~522~~ ~~523~~ ~~524~~ ~~525~~ ~~526~~ ~~527~~ ~~528~~ ~~529~~ ~~530~~ ~~531~~ ~~532~~ ~~533~~ ~~534~~ ~~535~~ ~~536~~ ~~537~~ ~~538~~ ~~539~~ ~~540~~ ~~541~~ ~~542~~ ~~543~~ ~~544~~ ~~545~~ ~~546~~ ~~547~~ ~~548~~ ~~549~~ ~~550~~ ~~551~~ ~~552~~ ~~553~~ ~~554~~ ~~555~~ ~~556~~ ~~557~~ ~~558~~ ~~559~~ ~~560~~ ~~561~~ ~~562~~ ~~563~~ ~~564~~ ~~565~~ ~~566~~ ~~567~~ ~~568~~ ~~569~~ ~~570~~ ~~571~~ ~~572~~ ~~573~~ ~~574~~ ~~575~~ ~~576~~ ~~577~~ ~~578~~ ~~579~~ ~~580~~ ~~581~~ ~~582~~ ~~583~~ ~~584~~ ~~585~~ ~~586~~ ~~587~~ ~~588~~ ~~589~~ ~~590~~ ~~591~~ ~~592~~ ~~593~~ ~~594~~ ~~595~~ ~~596~~ ~~597~~ ~~598~~ ~~599~~ ~~600~~ ~~601~~ ~~602~~ ~~603~~ ~~604~~ ~~605~~ ~~606~~ ~~607~~ ~~608~~ ~~609~~ ~~610~~ ~~611~~ ~~612~~ ~~613~~ ~~614~~ ~~615~~ ~~616~~ ~~617~~ ~~618~~ ~~619~~ ~~620~~ ~~621~~ ~~622~~ ~~623~~ ~~624~~ ~~625~~ ~~626~~ ~~627~~ ~~628~~ ~~629~~ ~~630~~ ~~631~~ ~~632~~ ~~633~~ ~~634~~ ~~635~~ ~~636~~ ~~637~~ ~~638~~ ~~639~~ ~~640~~ ~~641~~ ~~642~~ ~~643~~ ~~644~~ ~~645~~ ~~646~~ ~~647~~ ~~648~~ ~~649~~ ~~650~~ ~~651~~ ~~652~~ ~~653~~ ~~654~~ ~~655~~ ~~656~~ ~~657~~ ~~658~~ ~~659~~ ~~660~~ ~~661~~ ~~662~~ ~~663~~ ~~664~~ ~~665~~ ~~666~~ ~~667~~ ~~668~~ ~~669~~ ~~670~~ ~~671~~ ~~672~~ ~~673~~ ~~674~~ ~~675~~ ~~676~~ ~~677~~ ~~678~~ ~~679~~ ~~680~~ ~~681~~ ~~682~~ ~~683~~ ~~684~~ ~~685~~ ~~686~~ ~~687~~ ~~688~~ ~~689~~ ~~690~~ ~~691~~ ~~692~~ ~~693~~ ~~694~~ ~~695~~ ~~696~~ ~~697~~ ~~698~~ ~~699~~ ~~700~~ ~~701~~ ~~702~~ ~~703~~ ~~704~~ ~~705~~ ~~706~~ ~~707~~ ~~708~~ ~~709~~ ~~710~~ ~~711~~ ~~712~~ ~~713~~ ~~714~~ ~~715~~ ~~716~~ ~~717~~ ~~718~~ ~~719~~ ~~720~~ ~~721~~ ~~722~~ ~~723~~ ~~724~~ ~~725~~ ~~726~~ ~~727~~ ~~728~~ ~~729~~ ~~730~~ ~~731~~ ~~732~~ ~~733~~ ~~734~~ ~~735~~ ~~736~~ ~~737~~ ~~738~~ ~~739~~ ~~740~~ ~~741~~ ~~742~~ ~~743~~ ~~744~~ ~~745~~ ~~746~~ ~~747~~ ~~748~~ ~~749~~ ~~750~~ ~~751~~ ~~752~~ ~~753~~ ~~754~~ ~~755~~ ~~756~~ ~~757~~ ~~758~~ ~~759~~ ~~760~~ ~~761~~ ~~762~~ ~~763~~ ~~764~~ ~~765~~ ~~766~~ ~~767~~ ~~768~~ ~~769~~ ~~770~~ ~~771~~ ~~772~~ ~~773~~ ~~774~~ ~~775~~ ~~776~~ ~~777~~ ~~778~~ ~~779~~ ~~780~~ ~~781~~ ~~782~~ ~~783~~ ~~784~~ ~~785~~ ~~786~~ ~~787~~ ~~788~~ ~~789~~ ~~790~~ ~~791~~ ~~792~~ ~~793~~ ~~794~~ ~~795~~ ~~796~~ ~~797~~ ~~798~~ ~~799~~ ~~800~~ ~~801~~ ~~802~~ ~~803~~ ~~804~~ ~~805~~ ~~806~~ ~~807~~ ~~808~~ ~~809~~ ~~810~~ ~~811~~ ~~812~~ ~~813~~ ~~814~~ ~~815~~ ~~816~~ ~~817~~ ~~818~~ ~~819~~ ~~820~~ ~~821~~ ~~822~~ ~~823~~ ~~824~~ ~~825~~ ~~826~~ ~~827~~ ~~828~~ ~~829~~ ~~830~~ ~~831~~ ~~832~~ ~~833~~ ~~834~~ ~~835~~ ~~836~~ ~~837~~ ~~838~~ ~~839~~ ~~840~~ ~~841~~ ~~842~~ ~~843~~ ~~844~~ ~~845~~ ~~846~~ ~~847~~ ~~848~~ ~~849~~ ~~850~~ ~~851~~ ~~852~~ ~~853~~ ~~854~~ ~~855~~ ~~856~~ ~~857~~ ~~858~~ ~~859~~ ~~860~~ ~~861~~ ~~862~~ ~~863~~ ~~864~~ ~~865~~ ~~866~~ ~~867~~ ~~868~~ ~~869~~ ~~870~~ ~~871~~ ~~872~~ ~~873~~ ~~874~~ ~~875~~ ~~876~~ ~~877~~ ~~878~~ ~~879~~ ~~880~~ ~~881~~ ~~882~~ ~~883~~ ~~884~~ ~~885~~ ~~886~~ ~~887~~ ~~888~~ ~~889~~ ~~890~~ ~~891~~ ~~892~~ ~~893~~ ~~894~~ ~~895~~ ~~896~~ ~~897~~ ~~898~~ ~~899~~ ~~900~~ ~~901~~ ~~902~~ ~~903~~ ~~904~~ ~~905~~ ~~906~~ ~~907~~ ~~908~~ ~~909~~ ~~910~~ ~~911~~ ~~912~~ ~~913~~ ~~914~~ ~~915~~ ~~916~~ ~~917~~ ~~918~~ ~~919~~ ~~920~~ ~~921~~ ~~922~~ ~~923~~ ~~924~~ ~~925~~ ~~926~~ ~~927~~ ~~928~~ ~~929~~ ~~930~~ ~~931~~ ~~932~~ ~~933~~ ~~934~~ ~~935~~ ~~936~~ ~~937~~ ~~938~~ ~~939~~ ~~940~~ ~~941~~ ~~942~~ ~~943~~ ~~944~~ ~~945~~ ~~946~~ ~~947~~ ~~948~~ ~~949~~ ~~950~~ ~~951~~ ~~952~~ ~~953~~ ~~954~~ ~~955~~ ~~956~~ ~~957~~ ~~958~~ ~~959~~ ~~960~~ ~~961~~ ~~962~~ ~~963~~ ~~964~~ ~~965~~ ~~966~~ ~~967~~ ~~968~~ ~~969~~ ~~970~~ ~~971~~ ~~972~~ ~~973~~ ~~974~~ ~~975~~ ~~976~~ ~~977~~ ~~978~~ ~~979~~ ~~980~~ ~~981~~ ~~982~~ ~~983~~ ~~984~~ ~~985~~ ~~986~~ ~~987~~ ~~988~~ ~~989~~ ~~990~~ ~~991~~ ~~992~~ ~~993~~ ~~994~~ ~~995~~ ~~996~~ ~~997~~ ~~998~~ ~~999~~ ~~1000~~ ~~1001~~ ~~1002~~ ~~1003~~ ~~1004~~ ~~1005~~ ~~1006~~ ~~1007~~ ~~1008~~ ~~1009~~ ~~1010~~ ~~1011~~ ~~1012~~ ~~1013~~ ~~1014~~ ~~1015~~ ~~1016~~ ~~1017~~ ~~1018~~ ~~1019~~ ~~1020~~ ~~1021~~ ~~1022~~ ~~1023~~ ~~1024~~ ~~1025~~ ~~1026~~ ~~1027~~ ~~1028~~ ~~1029~~ ~~1030~~ ~~1031~~ ~~1032~~ ~~1033~~ ~~1034~~ ~~1035~~ ~~1036~~ ~~1037~~ ~~1038~~ ~~1039~~ ~~1040~~ ~~1041~~ ~~1042~~ ~~1043~~ ~~1044~~ ~~1045~~ ~~1046~~ ~~1047~~ ~~1048~~ ~~1049~~ ~~1050~~ ~~1051~~ ~~1052~~ ~~1053~~ ~~1054~~ ~~1055~~ ~~1056~~ ~~1057~~ ~~1058~~ ~~1059~~ ~~1060~~ ~~1061~~ ~~1062~~ ~~1063~~ ~~1064~~ ~~1065~~ ~~1066~~ ~~1067~~ ~~1068~~ ~~1069~~ ~~1070~~ ~~1071~~ ~~1072~~ ~~1073~~ ~~1074~~ ~~1075~~ ~~1076~~ ~~1077~~ ~~1078~~ ~~1079~~ ~~1080~~ ~~1081~~ ~~1082~~ ~~1083~~ ~~1084~~ ~~1085~~ ~~1086~~ ~~1087~~ ~~1088~~ ~~1089~~ ~~1090~~ ~~1091~~ ~~1092~~ ~~1093~~ ~~1094~~ ~~1095~~ ~~1096~~ ~~1097~~ ~~1098~~ ~~1099~~ ~~1100~~ ~~1101~~ ~~1102~~ ~~1103~~ ~~1104~~ ~~1105~~ ~~1106~~ ~~1107~~ ~~1108~~ ~~1109~~ ~~1110~~ ~~1111~~ ~~1112~~ ~~1113~~ ~~1114~~ ~~1115~~ ~~1116~~ ~~1117~~ ~~1118~~ ~~1119~~ ~~1120~~ ~~1121~~ ~~1122~~ ~~1123~~ ~~1124~~ ~~1125~~ ~~1126~~ ~~1127~~ ~~1128~~ ~~1129~~ ~~1130~~ ~~1131~~ ~~1132~~ ~~1133~~ ~~1134~~ ~~1135~~ ~~1136~~ ~~1137~~ ~~1138~~ ~~1139~~ ~~1140~~ ~~1141~~ ~~1142~~ ~~1143~~ ~~1144~~ ~~1145~~ ~~1146~~ ~~1147~~ ~~1148~~ ~~1149~~ ~~1150~~ ~~1151~~ ~~1152~~ ~~1153~~ ~~1154~~ ~~1155~~ ~~1156~~ ~~1157~~ ~~1158~~ ~~1159~~ ~~1160~~ ~~1161~~ ~~1162~~ ~~1163~~ ~~1164~~ ~~1165~~ ~~1166~~ ~~1167~~ ~~1168~~ ~~1169~~ ~~1170~~ ~~1171~~ ~~1172~~ ~~1173~~ ~~1174~~ ~~1175~~ ~~1176~~ ~~1177~~ ~~1178~~ ~~1179~~ ~~1180~~ ~~1181~~ ~~1182~~ ~~1183~~ ~~1184~~ ~~1185~~ ~~1186~~ ~~1187~~ ~~1188~~ ~~1189~~ ~~1190~~ ~~1191~~ ~~1192~~ ~~1193~~ ~~1194~~ ~~1195~~ ~~1196~~ ~~1197~~ ~~1198~~ ~~1199~~ ~~1200~~ ~~1201~~ ~~1202~~ ~~1203~~ ~~1204~~ ~~1205~~ ~~1206~~ ~~1207~~ ~~1208~~ ~~1209~~ ~~1210~~ ~~1211~~ ~~1212~~ ~~1213~~ ~~1214~~ ~~1215~~ ~~1216~~ ~~1217~~ ~~1218~~ ~~1219~~ ~~1220~~ ~~1221~~ ~~1222~~ ~~1223~~ ~~1224~~ ~~1225~~ ~~1226~~ ~~1227~~ ~~1228~~ ~~1229~~ ~~1230~~ ~~1231~~ ~~1232~~ ~~1233~~ ~~1234~~ ~~1235~~ ~~1236~~ ~~1237~~ ~~1238~~ ~~1239~~ ~~1240~~ ~~1241~~ ~~1242~~ ~~1243~~ ~~1244~~ ~~1245~~ ~~1246~~ ~~1247~~ ~~1248~~ ~~1249~~ ~~1250~~ ~~1251~~ ~~1252~~ ~~1253~~ ~~1254~~ ~~1255~~ ~~1256~~ ~~1257~~ ~~1258~~ ~~1259~~ ~~1260~~ ~~1261~~ ~~1262~~ ~~1263~~ ~~1264~~ ~~1265~~ ~~1266~~ ~~1267~~ ~~1268~~ ~~1269~~ ~~1270~~ ~~1271~~ ~~1272~~ ~~1273~~ ~~1274~~ ~~1275~~ ~~1276~~ ~~1277~~ ~~1278~~ ~~1279~~ ~~1280~~ ~~1281~~ ~~1282~~ ~~1283~~ ~~1284~~ ~~1285~~ ~~1286~~ ~~1287~~ ~~1288~~ ~~1289~~ ~~1290~~ ~~1291~~ ~~1292~~ ~~1293~~ ~~1294~~ ~~1295~~ ~~1296~~ ~~1297~~ ~~1298~~ ~~1299~~ ~~1300~~ ~~1301~~ ~~1302~~ ~~1303~~ ~~1304~~ ~~1305~~ ~~1306~~ ~~1307~~ ~~1308~~ ~~1309~~ ~~1310~~ ~~1311~~ ~~1312~~ ~~1313~~ ~~1314~~ ~~1315~~ ~~1316~~ ~~1317~~ ~~1318~~ ~~1319~~ ~~1320~~ ~~1321~~ ~~1322~~ ~~1323~~ ~~1324~~ ~~1325~~ ~~1326~~ ~~1327~~ ~~1328~~ ~~1329~~ ~~1330~~ ~~1331~~ ~~1332~~ ~~1333~~ ~~1334~~ ~~1335~~ ~~1336~~ ~~1337~~ ~~1338~~ ~~1339~~ ~~1340~~ ~~1341~~ ~~1342~~ ~~1343~~ ~~1344~~ <

~~10~~
10

subsecuencia se crearon: AGGAGG (SEC ID NO.: 12, compuesta de los últimos 6 nucleótidos de la secuencia STAB-SD), que fue llamada PPS-1, para "secuencia de polipurina-1", y GAAAGG (SEC ID NO.: 13, compuesta de los primeros seis nucleótidos de la secuencia STAB-SD), que fue denominada PPS-III. Cada PPS fue ubicado en una construcción con promotores Bt del gen Cyt1A, y la eficiencia de cada PPS como un estabilizador 5' se determinó utilizando proteína cry3A como un reportero. Las secuencias STAB-SD dobles también fueron ensayadas.

Una serie de construcciones fueron hechas para ensayar el efecto sobre la producción de proteína de PPS-I, de PPS-III, para modificar una secuencia de polipurina para cambiar algunas purinas a pirimidinas, y el efecto de tener múltiples secuencias STAB-SD, y el efecto de separar las múltiples secuencias STAB-SD mediante diferentes distancias. Todos los otros componentes, (esto es, la región corriente arriba, la región UTR, la estructura de tallo-aro, y la región codificante) fueron iguales en todas las construcciones.

El pCI-10 contenía solo un promotor BTI sin una secuencia de plipurina u otra secuencia estabilizante. El

~~141~~
141

pCI-20 contenía un promotor BtI y un PPS-I. En pCI-21, PPS-I se modificó de 5'-AGGAGG-3' a la secuencia 5'-ATTATT 3'; de tal forma que esta ya no contiene una secuencia de polipurina. En pCI-30, 3 nucleótidos corriente arriba del PPS-1 se modificaron de 5'-TTT-3' a 5'-GAA-3' para regresar al 6-mer a la secuencia de STAB-SD nativa. Por lo tanto, la PPS-I en pCI-20 (5'-TTTAGGAGG-3') se cambió a STAB-SD en pCI-30 (5'-GAAAGGAGG-3'). El pCIII-10 contenía promotores Bt dobles pero no una secuencia PPS, mientras que el PCIII-20 contenía promotores Bt dobles y PPS-III. El pCI-50 contenía dos secuencias STAB-SD que estaban separadas por 8 nucleótidos. El pCI-60 también contenía dos secuencias STAB-SD, pero en esta construcción, ellas estaban separadas por 33 nucleótidos.

Las cantidades relativas de producción de proteína Cry3A de algunas de las contrucciones ensayadas se establece adelante:

pCI-10 (promotor BtI): 10%

pCI-20 (promotor BtI + PPS-I): 100% (utilizado como un estándar)

~~142~~
142

pCI-21 (promotor BtI + PPS-1 sin secuencia de polipurina): 7%

pCIII-10 (promotores Bt doble, sin PPS): 14%

pCIII-20 (promotores Bt doble + PPS-III): 37%

pCI-30 (promotor BtI + STAB-SD): 162%

pCI-50 (promotor BtI + STAB-SD doble separado por 8 nucleótidos): 198%

pCI-60 (promotor BtI + STAB-SD doble separado por 33 nucleótidos): 334%

Así, tanto el PPS-I como el PPS-III (6-mers contiguos de los primeros 6 nucleótidos de una secuencia STAB-SD 9-mer y de los últimos 6 nucleótidos de la misma secuencia) resultaron en más expresión de proteína que la lograda de las construcciones sin las secuencias. La secuencia STAB-SD de longitud completa dio marcadamente mejores resultados. Adicionalmente, ambas secuencias STAB-SD dobles diuieron como resultado unos mayores niveles de producción de proteína, con las secuencias STAB-SD dobles separados por 33 nucleótidos que resultaron en aproximadamente el doble de producción de proteína de las construcciones con la secuencia STAB-SD simple. Sin desear estar ligado a la teoría, las diferentes cantidaes de expresión de proteína exhibidas

~~113~~
143

por las construcciones pCI-50 and PCI- 60 pueden deberse al hecho de que la longitud de espacio de subunidades ribosomales 30S es de aproximadamente 30 nucleótidos. Esto puede permitir secuencias STAB-SD de aproximadamente 30 o más nucleótidos distantes para interactuar con dos unidades 30S al mismo tiempo.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia como si cada una de las publicaciones individuales o solicitudes de patente fueran específica e individualmente indicadas por incorporarse como referencia.

Aunque la invención anterior se ha descrito en algún detalle por vía de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de entendimiento, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer ciertos cambios y modificaciones a esta sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones finales.

~~9A~~
14A

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden,
 - (a) un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor de BtI, un promotor de BtII, y una combinación de un promotor BtI y un promotor BtII,
 - (b) seis o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial,
 - (c) un sitio de unión de ribosoma, y
 - (d) una secuencia que codifica un primer polipéptido con al menos un 80% de identidad de secuencia a una proteína de toxina de 41,9 kD (SEC ID No.: 9) una toxina binaria de *B. asfericus*, cuyo primer polipéptido es al menos 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No.:9.

2. Una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde dicho primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de

~~145~~
145

secuencia con la SEC ID No.: 9, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 de kD de la SEC ID No.:9.

3. Una secuencia de ácido nuclieco de la reivindicación 1, en donde dicho primer polipéptido tiene la secuencia del SEC ID No.:9.
4. Una secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde además la secuencia del elemento (d) codifica un segundo polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kd de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), cuyp polipéptido funciona como un dominio de unión para la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No.: 9.
5. Una secuencia de ácido nuclieco de la reivindicación 4, en donde dicho segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No.: 8.

~~146~~
146

6. Una secuencia de ácido nuclieco de la reivindicación 4, en donde dicho segundo polipéptido tiene una secuencia de SEC ID No.: 8.
7. Una secuencia de ácido nuclieco de la reivindicación 1, en donde dichos 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial son una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos.
8. Una secuencia de ácido nuclieco de la reivindicación 7, en donde dicha secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6).
9. Un ácido nuclieco de la reivindicación 1, en donde el promotor de *Bacillus turingiensis* es un promotor un promotor cry.

~~147~~
147

10. Un ácido nuclieco de la reivindicación 1, en donde el promotor de *Bacillus turingiencis* es un promotor cry1.
11. Un ácido nuclieco de la reivindicación 1, en donde el promotor de *Bacillus turingiencis* se selecciona del grupo que consiste de cry1Aa1, cry1Aa2, cry1Aa3, cry1Aa4, cry1Aa5, cry1Aa6, cry1Ba1, cry1Ba2, cry1Ca1, cry1Ca2, cry1Ca3, cry1Ca4, cry1Ca5, cry1Ca6, cry1Ca7, cry1Fa1, cry1Fa2, cry1Aa1, cyt1Aa2, cyt1Aa3, y cyt1Aa4.
12. Un ácido nuclieco de la reivindicación 11, en donde el promotor de *Bacillus turingiencis* es un promotor cyt1Aa1.
13. Un ácido nuclieco de la reivindicación 1, que tiene un promotor btl y un promotor BtII en donde el promotor BtI y el pmt BtII se traslapan.
14. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 1.

~~28~~
148

15. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 2.
16. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 3.
17. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 4.
18. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 5.
19. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 6.
20. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 7.
21. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 8.
22. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13.

23. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de la reivindicación 14.
24. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de la reivindicación 15.
25. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de la reivindicación 16.
26. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de la reivindicación 17.
27. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de la reivindicación 18.
28. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de la reivindicación 19.
29. Una célula huésped que comprende un vector de expresión de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22.

~~150~~
150

30. Una célula huésped de la reivindicación 23, que comprende además una proteína cryIIA 20 kD.

31. Una célula huésped de la reivindicación 29, que comprende además una proteína cryIIA 20 kD.

32. Una célula huésped de la reivindicación 23, en donde la célula es una célula de *Bacillus turingiensis*

33. Una célula huésped de la reivindicación 24, en donde la célula es una célula de *Bacillus turingiensis*.

34. Una célula huésped de la reivindicación 25, en donde la célula es una célula de *Bacillus turingiensis*.

35. Una célula huésped de la reivindicación 26, en donde la célula es una célula de *Bacillus turingiensis*

~~151~~
151

36. Una célula huésped de la reivindicación 27, en donde la célula es una célula de *Bacillus turingiensis*.

37. Una célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29, en donde la célula es una célula de *Bacillus turingiensis*

38. Una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden, un promotor de *Bacillus turingiensis* que se une a una proteína sigma factor A, al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, una secuencia que codifica un polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia a una proteína de 41,9 kD (SEC ID No.: 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de SEC ID No.:9.

39. Un método para mejora la producción de una toxina binaria de *B. esfericus* en una célula bacterial huésped, dicho método comprende:

~~152~~
152

- (a) Transformar la célula huésped con una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden, un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, un promotor BtII, y una combinación de un promotor BtI y un promotor BtII, al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, una secuencia que codifica un primer polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia a una proteína de 41,9 kD SEC ID No.: 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No.: 9; y
- (b) Expresar dicha secuencia de ácido nucleico en la célula huésped;

Por medio de la cual la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico mejora la producción de la toxina binaria de *B. esfericus* comparada con la producción de la toxina binaria de *B. esfericus* en una célula de *B.*

~~153~~
153

esfericus tipo silvestre que no está transformada con dicha secuencia de ácido nucleico.

40. Un método de la reivindicación 39, en donde dicho primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia de la SEC ID No.: 9.

41. Un método de la reivindicación 39, en donde dicho primer polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No.: 9.

42. Un método de la reivindicación 39, en donde además la secuencia que codifica dicho primer polipéptido codifica además un segundo polipéptido con al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No.: 8), cuyo polipéptido funciona como un dominio de unión para la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No.: 9.

43. Un método de la reivindicación 42, en donde dicho segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No.: 8.

154
154

44. Un método de la reivindicación 42, en donde dicho segundo polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No. 8.

45. Un método de la reivindicación 39, en donde dicho 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial son una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos.

46. Un método de la reivindicación 45, en donde la secuencia STAB-SD bacterial se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6).

47. El método de la reivindicación 39, en donde dicha célula huésped es una célula de *Bacillus turingiensis*.

48. El método de la reivindicación 39, en donde dicha célula huésped es una célula de *B. esfericus*.

455
155

49. El método de la reivindicación 39, en donde dicha célula bacterial huésped expresa un producto de 20 kD de un gen cryIIA.

50. Un método para crear una bacteria recombinante, dicho método comprende las etapas de:

(a) Transformar la bacteria recombinante con una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden:

Un promotor de *Bacillus thuringiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, un promotor BtII, y una combinación de un promotor BtI y un promotor BtII,

Al menos seis nucleótidos contiguos de una secuencia de STAB-SD bacterial,

Un sitio de unión de ribosoma, y

Una secuencia que codifica un primer polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 41,9 kD (SEC ID No.: 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de la toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9;

y

~~96~~
156

(b) expresar dicha secuencia de ácido nucleico en la célula huésped.

51. Un método de la reivindicación 50, en donde dicho primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 9.

52. Un método de la reivindicación 50, en donde dicho primer polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No.:9.

53. Un método de la reivindicación 50, en donde además la secuencia que codeifica dicho primer polipéptido comprende además una secuencia que codifica un segundo polipéptido, cuyo segundo polipéptido tiene, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de B. esfericus (SEC ID No. 8), y puede funcionar como un dominio de unión para la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9.

~~82~~
157

54. Un método de la reivindicación 53, en donde dicho segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia de la SEC ID No. 8.

55. Un método de la reivindicación 53, en donde dicho segundo polipéptido tiene la secuencia del SEC ID No. 8.

56. Un método de la reivindicación 50, en donde dichos seis o más nucleótidos contiguos de la secuencia STAB-SD bacterial son una secuencia de STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos.

57. Un método de la reivindicación 50, en donde dicha secuencia STAB-SD bacterial se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6).

58. Un método de la reivindicación 50 en donde la bacteria recombinante se selecciona del grupo que consiste de Bacillus turingiensis, B. esfericus y

~~158~~
158

un miembro de unas especies de bacillus diferentes de bti o Bs.

59. Un método para incrementar la toxicidad de una bacteria de *Bacillus turingiensis* a una larva de un mosquito, dicho método comprende las etapas de:

(a) Transformar dicha bacteria con una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden,

Un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor de BtI, un promotor BtII, y una combinación de un promotor BtI y un promotor BtII,

Seis o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial,

Un sitio de unión de ribosoma, y

Una secuencia que codifica un primer polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 41,9 kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos 50% tan tóxico como la proteína de la toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9; y

~~139~~
139

- (b) Expresar dicha secuencia de ácido nucleico en la bacteria;

Por medio de la cual la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico hace dicha bacteria más tóxica a dicha lara que una célula de *B. esfericus* tipo silvestre que no está transformada con dicha secuencia de ácido nucleico.

60. Un método de la reivindicación 59, en donde dicha bacteria comprende además un producto de 20 kD de un gen cryIIA.

61 Un método de la reivindicación 59, en donde dicho primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8.

62. Un método de la reivindicación 59, en donde dicho primer polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No. 9.

63. Un método de la reivindicación 59, en donde además de la secuencia que codifica dicho primer

~~160~~
160

polipéptido comprende además una secuencia que codifica un segundo polipéptido, cuyo segundo polipéptido tiene, al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína 51,4 kD de una toxina binarira de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), y puede funcionar como un dominio de unión para una proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9.

64. Un método de la reivindicación 63, en donde dicho segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8.

65. Un método de la reivindicación 63, en donde dicho segundo polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No. 8.

66. Un método de la reivindicación 59, en donde dichos 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial son una secuencia STAB-SD bacterial de nueve nucleótidos.

67. Un método de la reivindicación 66, en donde dicha secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos se selecciona del grupo que consiste

~~161~~
161

de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6).

68. Una célula recombinante de *B. esfericus*, dicha célula comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende, en el siguiente orden, un promotor de *Bacillus turingiensis* seleccionado del grupo que consiste de un promotor BtI, un promotor BtII y una combinación de promotor BtI y un promotor BtII, al menos 6 nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión de ribosoma, una secuencia que codifica un primer polipéptido con al menos 80% de identidad de secuencia con una proteína de 31,9 kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9.

69. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde dicho primer polipéptido tiene, al

~~162~~
162

menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8.

70. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde dicho primer polipéptido tiene la secuencia SEC ID No. 9.

71. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde además la secuencia que codifica dicho primer polipéptido comprende además una secuencia que codifica un segundo polipéptido, cuyo segundo polipéptido tiene, al menos, 80% de identidad con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), y puede funcionar como un dominio de unión para una proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9.

72. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde dicho segundo polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8.

~~63~~
163

73. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde dicho segundo polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No. 8.

74. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde dichos 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia STAB-SD bacterial son una secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos.

75. Una célula recombinante de la reivindicación 42, en donde dicha secuencia STAB-SD bacterial de 9 nucleótidos se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6).

76. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde el promotor de *Bacillus turingiensis* es un promotor cry.

77. Una célula recombinante de la reivindicación 68, en donde el promotor de *Bacillus turingiensis* se selecciona del grupo que consiste de cryIAa1,

164
164

cry1Aa2, cry1Aa3, cry1Aa4, cry1Aa5, cry1Aa6,
cry1Ba1, cry1Ba2, cry1Ca1, cry1Ca2, cry1Ca3,
cry1Ca4, cry1Ca5, cry1Ca6, cry1Ca7, cry1Fa1,
cry1Fa2, cry1Aa1, cyt1Aa2, cyt1Aa3, y cyt1Aa4.

78. Una célula recombinante de la reivindicación 68,
en donde el promotor de *Bacillus turingiensis* es
un promotor cyt1Aa1.

79. Una célula recombinante de la reivindicación 68,
en donde dicha célula expresa además un producto
de 20 kD de un operon cry11Aa.

80. Un método para incrementar la toxicidad de una
célula de *B. esfericus*, dicho método comprende

(a) Transformar la célula con una secuencia de
ácido nucleico que comprende, en el siguiente
orden, un promotor de *Bacillus turingiensis*
seleccionado del grupo que consiste de un
promotor BtI, un promotor BtII, y una
combinación de un promotor BtI y un promotor
BtII, al menos 6 nucleótidos contiguos de una
secuencia STAB-SD bacterial, un sitio de unión

~~165~~
165

de ribosoma, y una secuencia que codifica un primer polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de un 41,9 kD (SEC ID No. 9) de una toxina binaria de *B. esfericus*, cuyo primer polipéptido es, al menos, 50% tan tóxico como la proteína de toxina de 41,9 kD de la SEC ID No. 9; y

- (b) Expresar dicha secuencia de ácido nucleico en la célula huésped;

Por medio de la cual la expresión de dicha secuencia de ácido nucleico incrementa la toxicidad de dicha célula comparada con una célula de *B. esfericus* tipo silvestre que no está transformada con dicha secuencia de ácido nucleico.

81.Un método de la reivindicación 80, en donde dicho primer polipéptido tiene, al menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8.

82.Un método de la reivindicación 80, en donde dicho primer polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No. 9.

~~166~~
166

83. Un método de la reivindicación 80, en donde además la secuencia que codifica dicho primer polipéptido comprende además una, secuencia que codifica un segundo polipéptido, cuyo segundo polipéptido tiene, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de una toxina binaria de *B. esfericus* (SEC ID No. 8), y puede funcionar como un dominio de unión para una proteína de toxina de 41,9 kD de una SEC ID No. 9.

84. Un método de la reivindicación 80, en donde dicho segundo polipéptido tiene, la menos, 90% de identidad de secuencia con la SEC ID No. 8.

85. Un método de la reivindicación 80, en donde dicho segundo polipéptido tiene la secuencia de la SEC ID No. 8.

86. Un método de la reivindicación 80, en donde dicho 6 o más nucleótidos contiguos de una secuencia de STAB-SD bacterial son una secuencia STAB-SD bacterial de nueve nucleótidos.

87. Un método de la reivindicación 80, en donde dicha secuencia STAB-SD bacterial de nueve nucleótidos se selecciona del grupo que consiste de GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 1), GAAGGGGGG (SEC ID NO.: 2), GAGGGGGGG (SEC ID NO.: 3), GAAAGGGGG (SEC ID NO.: 4), GAAAGGAGG (SEC ID NO.: 5), y GAAAGGGGT (SEC ID NO.: 6).

88. Un método de la reivindicación 80, en donde el promotor de *Bacillus turingiensis* es un promotor cry.

89. Un método de la reivindicación 80, en donde el promotor de *Bacillus turingiensis* es uno seleccionado del grupo que consiste de cry1Aa1, cry1Aa2, cry1Aa3, cry1Aa4, cry1Aa5, cry1Aa6, cry1Ba1, cry1Ba2, cry1Ca1, cry1Ca2, cry1Ca3, cry1Ca4, cry1Ca5, cry1Ca6, cry1Ca7, cry1Fa1, cry1Fa2, cry1Aa1, cyt1Aa2, cyt1Aa3, y cyt1Aa4.

90. El método de la reivindicación 89, en donde el promotor de *Bacillus turingiensis* es un promotor cyt1Aa1.

168

91. Un método para reducir la resistencia de una toxina binaria de *B. esfericus*, dicho método comprende expresar una proteína *cyt1Aa1* de *b.p* subsp. *israelensis* ("Bti") en una célula de *B. esfericus* que expresa dicha toxina binaria.
92. Un método para reducir la resistencia de una toxina binaria de *B. esfericus*, dicho método comprende expresar una proteína *cyt1Aa1* de BtI en una célula de *Bacillus turingiensis* que expresa dicha toxina binaria.
93. Un método para reducir la resistencia de una toxina binaria de *B. esfericus*, dicho método comprende administrar la proteína BtI *Cyt1Aa1* con dicha toxina binaria.
94. Un método de la reivindicación 93, en donde dicha proteína *Cyt1Aa1* de BtI está en un polvo de célula BtI lisadas, liofilizadas.
95. Un método de la reivindicación 93, en donde dicha proteína *Cyt1Aa1* de BtI es una proteína purificada.

96. Un método de la reivindicación 93, en donde dicha proteína Cyt1Aa1 de Bti se administra en una proporción de proteína Cyt1Aa1 a Bs de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 1:50.
97. Un método de la reivindicación 93, en donde dicha proteína Cyt1Aa1 de Bti se administra en una proporción de proteína Cyt1Aa1 a Bs de aproximadamente 1: 10.
98. Un ácido nucleico de las reivindicaciones 1 a 38, que comprende además una segunda secuencia de al menos, seis nucleótidos contiguos de una secuencia de stabs bacterial.
99. Un método de cualquiera de las reivindicaciones 39, 50, 59, u 80, que comprende además una segunda secuencia de al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia de STAB-SD bacterial.
100. Una célula recombinante de la reivindicación 68, que comprende además una segunda secuencia de

~~110~~
170

al menos 6 nucleótidos contiguos de una
secuencia STAB-SD bacterial.

171

dal como resultado la producción en al menos diez veces de la toxina binaria Bs comparada con las células no transformadas Bs.

RESUMEN

La invención se relaciona con unas secuencias de ácido nucleico que comprenden un promotor BtI o BtII, o una combinación de un promotor BtI y BtII, al menos, 6 nucleótidos contiguos de una secuencia de STAB-SD bacterial, y una secuencia que codifica un polipéptido con, al menos, 80% de identidad de secuencia con una proteína de 41,9 kD de la toxina binaria de B. esfericus ("Bs"), cuyo polipéptido tiene, al menos, 50% de la toxicidad de la proteína de 41,9 kD inactiva. Opcionalmente, la secuencia que codifica además un segundo polipéptido con, al menos, 50% de identidad de secuencia con una proteína de 51,4 kD de la toxina binaria Bs y la cual puede funcionar como un dominio ligante para la proteína de la toxina de 41,9 kD de Bs. Cuando las secuencias de ácido nucleico se expresan en las células de Bacillus turingiensis ("Bt") o Bs ellas dan como resultado la producción en al menos diez veces de la toxina binaria Bs comparada con las células no transformadas Bs. La invención proporciona secuencias de ácido nucleico que expresan vectores, células huésped, y métodos para incrementar la toxicidad de una bacteria

insecticida mediante la transformación de la bacteria con secuencias de ácido nucleico de la invención. Además, la invención se relaciona con el descubrimiento de que la proteína cyt1Aa1 de las subespecies Bt israelensis ("Bti") reversa la resistencia de una toxina binaria Bs en larvas de mosquitos resistentes a Bs. La invención suministra células Bs que expresan proteína cyt1Aa1 de Bti, y métodos para reducir la resistencia de la toxina binaria Bs mediante la coadministración de al tpm cyt1Aa1 con toxina binaria Bs.

F3

10 20 30 40 50 60
 * * * * *
 GAATTCATTTTCGATTTCAAAATTTCCAAACTTAAATATGATTGAATGCCTGAGAAAGG.
 70 80 90 100 110 120
 * * * * *
 TAATAAGATGTTTTAGTTTATTATGAAGTATTAGGGGCGTCTTTTAAATTCATCTATC
 130 140 150 160 170 180
 * * * * *
 AATTGTGAAATATATTACTCAAACCCCAATACCATTCTAAAACCTTATTCAAATATATA
 190 200 210 220 230 240
 * * * * *
 TTCTTTAAAAGACATACATACTAAAAAACAGGCATCTTTTGAAGTATAGCCATAGA
 -35 SIGMA E -10
 250 260 270 280 290 300
 * * * * *
 ATACTACGGTGAATCAAAACAATAAAATTTAGGAGGTATATTCAAGTATACAAAAAA
 310 320 330 340 350 360
 * * * * *
 CTTTGTGTGAGGGGATTAGATAAAAAGTATTCGTTATCCTTATAAATTAATTCCTTAA
 370 380 390 400 410 420
 * * * * *
 -35 SIGMA E -10
 CATGCACCAATGTATACATTAAATAATATTATGTGAATTAAGTCTATCAATTTAATTTAT
 430 440 450 460 470 480
 * * * * *
 TATGTTACTTTATATTTCATTAAATAATTGCAAGTTTAAAATCATAATTTAATGTTGAAG
 490 500 510 520 530 540
 * * * * *
 GCCACTATTCTAATTAACCTAAGGAGTTGTTTATTTCAGCTCGGTACCCGGGGATAAAGT
 550 560 570 580 590 600
 * * * * *
 STAB-SD
 TCAAGGAGGATGATGCTCAAAACCTAGGACATCAAAACATATATCTTCACCGCTGAATG
 610 620 630 640 650 660
 * * * * *
 GATTTATGAAATCATTTTATCAGTTTGAAATTTATCTATCTGATGAGAAATCTAGT
 670 680 690 700 710 720
 * * * * *
 ACGTTATTTAATGAACTTTTAGGTTTAAATAATATAATGAGAAGTATTTTTTATCAAT
 730 740 750 760 770 780
 * * * * *
 RBS +1
 GATAAGGAGATGAAGAAGCATGTGCGATTCAAAGACAATTCTGGCGTTTCAGAAAAAT
 MetCysAspSerLysAspAsnSerGlyValSerGluLys>
 [51.4 kilodalton protein >>
 790 800 810 820 830 840
 * * * * *
 GCGGAAGAAGAAATTTACTAATTACCGCTAAATACTACTCCTACAGCCCTAATTTATAACC
 CysGlyLysLysPheThrAsnTyrProLeuAsnThrThrProThrSerLeuAsnTyrAsn>

Figura 1

51.4 kD
 cDNA-PCR-AMG-ATCCCTCAAAACCTAGGACATCAAAACATATATCTTCACCGCTGAATG

FF4

2/5

850 860 870 880 890 900
 * * * * * *
 TTCCAGAAATATCAAAAAATTTTATAACCTTAAGAATAAATATTCACCGAATGGTTATG
 LeuProGluIleSerLysLysPheTyrAsnLeuLysAsnLysTyrSerArgAsnGlyTyr>

910 920 930 940 950 960
 * * * * * *
 GTTTATCAAAAACCGAATTTTCCTTCAAGTATCGAAAAATTGCCCATCTAACGAATATTCAA
 GlyLeuSerLysThrGluPheProSerSerIleGluAsnCysProSerAsnGluTyrSer>

970 980 990 1000 1010 1020
 * * * * * *
 TAATGTATGATAATAAAGATCCTCGATTCTTGATTTCGGTTTTTATTAGATGATGGTAGAT
 IleMetTyrAspAsnLysAspProArgPheLeuIleArgPheLeuLeuAspAspGlyArg>

1030 1040 1050 1060 1070 1080
 * * * * * *
 ATATTATTGCAGATAGAGACGATGGAGAAGTTTTTGATGAAGCACCTACTTATTTGGATA
 TyrIleIleAlaAspArgAspAspGlyGluValPheAspGluAlaProThrTyrLeuAsp>

1090 1100 1110 1120 1130 1140
 * * * * * *
 ATAACAATCACCTATCATAGTAGACATTATACCGGAGAGAGAGACAAAAGTTTGAGC
 AsnAsnAsnHisProIleIleSerArgHisTyrThrGlyGluGluArgGlnLysPheGlu>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 * * * * * *
 AGGTAGGTAGTGGAGATTATATTACGGAGAGCAATTTTTTCAATTCCTATACACAAAACA
 GlnValGlySerGlyAspTyrIleThrGlyGluGlnPhePheGlnPheTyrThrGlnAsn>

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 * * * * * *
 AAACACGTGTATTGTCAAATTGTAGGGCGCTTGACAGTAGGACATATTACTATCTACTG
 LysThrArgValLeuSerAsnCysArgAlaLeuAspSerArgThrIleLeuLeuSerThr>

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 * * * * * *
 CAAAATCTTCCCAATTTACCTCCAGCTTCTGAAACTCAACTAACAGCTTTGTTAATA
 AlaLysIlePheProIleTyrProProAlaSerGluThrGlnLeuThrAlaPheValAsn>

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 * * * * * *
 GTTCATTTTATGCTGCGCAATTCCTCAATTACCCCAACATCCTTACTTGAGAATATTC
 SerSerPheTyrAlaAlaAlaIleProGlnLeuProGlnThrSerLeuLeuGluAsnIle>

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 * * * * * *
 CTGAGCCTACTAGTCTCGATGATTCTGGAGTATTACCAAAGATGCAGTAAGAGCAGTTA
 ProGluProThrSerLeuAspAspSerGlyValLeuProLysAspAlaValArgAlaVal>

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 * * * * * *
 AAGGAAGTGGCTATTACCTTGTATAATAGTACATGATCCTAATTTAAACAATTCGGATA
 LysGlySerAlaLeuLeuProCysIleIleValHisAspProAsnLeuAsnAsnSerAsp>

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 * * * * * *
 AAATGAAATTTAATACCTACTATCTTTTAGAATATAAAGAATACTGGCATCAATTATGGT
 LysMetLysPheAsnThrTyrTyrLeuLeuGluTyrLysGluTyrTrpHisGlnLeuTrp>

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 * * * * * *
 CACAAATTATACCTGCTCATCAACTGTAAAAATACAGGAACGAACAGGAATATCTGAAG

Figure 1

175

3/5

SerGlnIleIleProAlaHisGlnThrValLysIleGlnGluArgThrGlyIleSerGlu>

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 * * * * * *
 TTGTACAAATAGCATGATTGAAGATTAAATATGTATATTGGTGCAGATTTTGGCATGC
 ValValGlnAsnSerMetIleGluAspLeuAsnMetTyrIleGlyAlaAspPheGlyMet>

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 * * * * * *
 TTTTATTATTAGATCTAGTGGATTAAAGAAACAAATAACAAGGGGCTAAATAGGCCTT
 LeuPheTyrPheArgSerSerGlyPheLysGluGlnIleThrArgGlyLeuAsnArgPro>

1750 1760 1770 1780 1790 1800
 * * * * * *
 TATCCCAACGACCACCTCACTTAGGAGAAAGAGTAGAAGAAATGAGTATTATAATTCTA
 LeuSerGlnThrThrThrGluLeuGlyGluArgValGluGluMetGluTyrTyrAsnSer>

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 * * * * * *
 ATGATTTGGATGTTAGATATGTGAATACGCATTGGCTAGAGAATTCACACTAAAACGCG
 AsnAspLeuAspValArgTyrValLysTyrAlaLeuAlaArgGluPheThrLeuLysArg>

1870 1880 1890 1900 1910 1920
 * * * * * *
 TTAATGGTGAATTTGTAAAAATTGGGTTCCTGTAGATTATCGATTGGCAGGTATACAAT
 ValAsnGlyGluIleValLysAsnTrpValAlaValAspTyrArgLeuAlaGlyIleGln>

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 * * * * * *
 CGTATCCTAATGCACCTATACTAATCCACTTACGCTAACAAAACATACATTATTCGAT
 SerTyrProAsnAlaProIleThrAspProLeuThrLeuThrLysHisThrIleIleArg>

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 * * * * * *
 GTGAAAATAGTTACGATGGACACATATTTAAACACCTTTAATCTTTAAAAATGGTGAAG
 CysGluAsnSerTyrAspGlyHisIlePheLysThrProLeuIlePheLysAsnGlyGlu>

2050 2060 2070 2080 2090 2100
 * * * * * *
 TTATTGTAAAAACGAATGAAGAATTAAATACCTAAAATTAACCAAGTGTACTTTAACTTCA
 ValIleValLysThrAsnGluGluLeuIleProLysIleAsnGlnStop
 > End 51.4 kilodalton protein]

2110 2120 2130 2140 2150 2160
 * * * * * *
 AATATTCATTACCATGTTATTTAAATAGTAGATAGATGAATAAATAGTATATATTAG

2170 2180 2190 2200 2210 2220
 * * * * * *
 ACAACAACCTTAATTTGACACATAAGAATAATTTTAAATGTATAAATAGTATTTAGAGT

2230 2240 2250 2260 2270 2280
 * * * * * *
 GTTATTGCAATATATTTTTTGAAGGGAGCTAAAAGACATGAGAAATTTGGATTTTATTG
 MetArgAsnLeuAspPheIle>
 [41.9 kilodalton

2290 2300 2310 2320 2330 2340
 * * * * * *
 ATTCTTTTATACCCACAGAAGGAAAGTACATTTCGCGTTATGGATTTTATAATAGCGAGT
 AspSerPheIleProThrGluGlyLysTyrIleArgValMetAspPheTyrAsnSerGlu>
 protein >

Figura 1

4/5

2350 2360 2370 2380 2390 2400
 * * * * * *
 ATCCTTTCTGTATACATGCACCCTCAGCCCTAATGCGGATATCATGACAGAAATCTGTA
 TyrProPheCysIleHisAlaProSerAlaProAsnGlyAspIleMetThrGluIleCys>

2410 2420 2430 2440 2450 2460
 * * * * * *
 GCAGAGAAATAATCAATATTTTATTTTTCCTACTGATGATGCTCGAGTAATTATTG
 SerArgGluAsnAsnGlnTyrPheIlePhePheProThrAspAspGlyArgValIleIle>

2470 2480 2490 2500 2510 2520
 * * * * * *
 CAAATAGGCATAATGGTCCGTTTTTACCGGAGAAGCCACAAGTGTAGTATCAGATATCT
 AlaAsnArgHisAsnGlySerValPheThrGlyGluAlaThrSerValValSerAspIle>

2530 2540 2550 2560 2570 2580
 * * * * * *
 ATACTGGTAGCCCATTTACAGTTTTTITAGAGAGGTCAAAAGAACTATGGCACTTATTATT
 TyrThrGlySerProLeuGlnPhePheArgGluValLysArgThrMetAlaThrTyrTyr>

2590 2600 2610 2620 2630 2640
 * * * * * *
 TAGCGATACAAATCCTGAATCCGCAACAGATGTGAGAGCTCTAGAACCCTATCCCATG
 LeuAlaIleGlnAsnProGlnSerAlaThrAspValArgAlaLeuGluProHisSerHis>

2650 2660 2670 2680 2690 2700
 * * * * * *
 AGCTGCCATCTCGCCITTIATACACTAACAATATTGAAAATAATAGCAACATATTAAATT
 GluLeuProSerArgLeuTyrTyrThrAsnAsnIleGluAsnAsnSerAsnIleLeuIle>

2710 2720 2730 2740 2750 2760
 * * * * * *
 CTAATAAGGAACAAATATATTTAACCTTGCCTTCACTTCCAGAAACGACCAATACCCTA
 SerAsnLysGluGlnIleTyrLeuThrLeuProSerLeuProGluAsnGluGlnTyrPro>

2770 2780 2790 2800 2810 2820
 * * * * * *
 AACTCCAGTATTAAACGGTATCGATGATATAGGACCTAATCAATCAGAGAAATCAATTA
 LysThrProValLeuSerGlyIleAspAspIleGlyProAsnGlnSerGluLysSerIle>

2830 2840 2850 2860 2870 2880
 * * * * * *
 TAGGAAGTACTCTTATCCCATGATATAATGTTTCGGATTTTATTAGTTTGGGGGAGAGAA
 IleGlySerThrLeuIleProCysIleMetValSerAspPheIleSerLeuGlyGluArg>

2890 2900 2910 2920 2930 2940
 * * * * * *
 TGAAAACCACTCCATATTATTATGTAAGCACACTCAATATTGGCAAAGCATGTGGTCCG
 MetLysThrThrProTyrTyrTyrValLysHisThrGlnTyrTrpGlnSerMetTrpSer>

2950 2960 2970 2980 2990 3000
 * * * * * *
 CGCTCTTTCCACCCGGCTCTAAAGAGACAAAACTGAGAAATCAGGTATCACTGACACTT
 AlaLeuPheProProGlySerLysGluThrLysThrGluLysSerGlyIleThrAspThr>

3010 3020 3030 3040 3050 3060
 * * * * * *
 CTCAAATAAGTATGACTGACGGGATTAATGTTTCAATCCGAGCAGATTTGGGATTAAGGT
 SerGlnIleSerMetThrAspGlyIleAsnValSerIleGlyAlaAspPheGlyLeuArg>

3070 3080 3090 3100 3110 3120
 * * * * * *

Figura 1

~~17~~
~~17~~

5/5

TTGGAAATAAACGTTTGGGAATTAGGGGGGGTTCACCTATGATACAAAGACTCAAATAA
 PheGlyAsnLysThrPheGlyIleLysGlyGlyPheThrTyrAspThrLysThrGlnIle>
 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 * * * * * *
 CTAATACCTCCCAATTGTTAATAGAAACAACCTTATACTAGAGAATACACAAATACAGAAA
 ThrAsnThrSerGlnLeuLeuIleGluThrThrTyrThrArgGluTyrThrAsnThrGlu>
 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 * * * * * *
 ATTTTCCTGTTAGATATACAGGCTATGTTTTAGCGTCAGAATTTACTTTACATCGTAGTG
 AsnPheProValArgTyrThrGlyTyrValLeuAlaSerGluPheThrLeuHisArgSer>
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 * * * * * *
 ATGGAACTCAGGTTAATACGATCCCATGGGTTGCTTTAAACGATAACTATACAAACAATAG
 AspGlyThrGlnValAsnThrIleProTrpValAlaLeuAsnAspAsnTyrThrThrIle>
 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 * * * * * *
 CAAGATATCCACATTTTGCAAGTGAACCTTTACTAGGAAATACAAAGATTATTACAGATG
 AlaArgTyrProHisPheAlaSerGluProLeuLeuGlyAsnThrLysIleIleThrAsp>
 > and 41.9 kilodalton
 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 * * * * * *
 ATCAAACTAAATTTAAACAATATTCTTGAACTAATAGATGTTAAATAGAACAATTAATA
 AspGlnAsnStop
 protein 1
 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 * * * * * *
 ACAATTAAAGTACTTTTGGATTATAGTGAGGGGACCTATAAGCATAGCTTTTAGGTCCCT
 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 * * * * * *
 TTTAAGTTGCTTTTTTTCGTTTTTAGAATAGTATAGATAGGCTACACTACACTAAGTTGG
 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 * * * * * *
 ACGATAAAATAAGGGGTGTAACTTAGACTATTAAAAAAGGGAGAGTGCTACTATGAC
 3610 3620 3630 3640 3650
 * * * * *
 ACGTCAACATCGAACTTTTACACTCGAATGTAAACTGTTGTTGTTGGCTGCAG

Figura 1

178

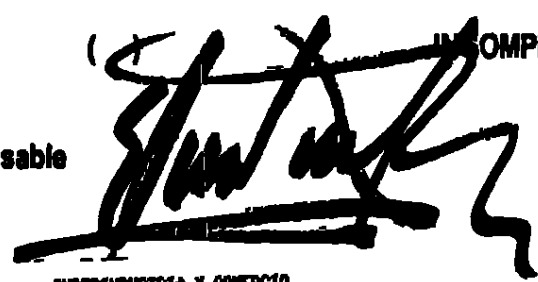
REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
Indicacion de que se solicita la concesion de una patente.	()	()
Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Descripcion de la invencion	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

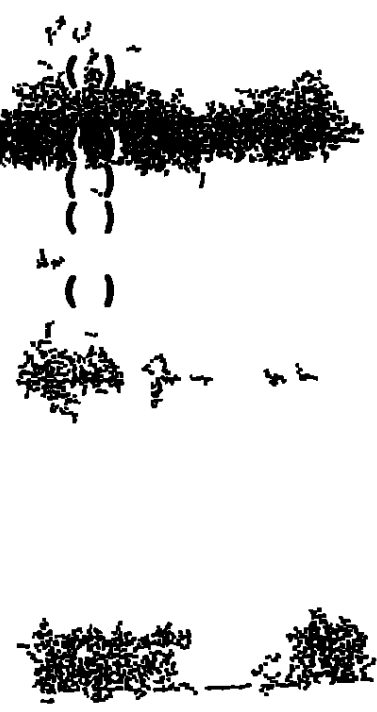
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicacion de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representacion grafica y fotografica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()		
Indicacion de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
Datos de Identificacion del solicitante o de la persona que presenta La solicitud	()	()
Representacion grafica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable



Fecha
Radicacion 03012576 00000000 folios 175
Fecha (AMB): 2003-02 14 16:10 4.
Tramite 011 PCT-PATENT 375 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES





2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
Dilia María Rodríguez D'Alema
Apoderado
The Regents of the University of California

Oficio N° 07252

ASUNTO:	Radicación N°	03-12578
	Solicitud Internacional	PCT/US2001/25543
	Fecha inicio fase nacional	14/03/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	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, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

□ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 28-k) Decisión 486).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos 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 numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMONA CESPÉDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

5 SET. 2003

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