

454

CASTELLANOS & CO.
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

Señora

Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Desarrollo Económico

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-017803- -00008-0000

Fecha: 2006-01-28 15:16:37 Dep. 2020 NUECREAC
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONAL
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 32

Ref.: Expediente No. **04.017.803**

Solicitud de Patente de Invención para: **TOXINAS DE CRY3A MODIFICADAS Y SECUENCIAS DE ACIDO NUCLEICO QUE LAS MODIFICAN**

Solicitante: **SYNGENTA PARTICIPATIONS AG**

RESPUESTA AL EXAMEN DE FONDO

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO, mayor de edad, identificada y domiciliada como aparece al pie de mi firma, atentamente me permito presentar respuesta al oficio No. **12598**, notificado por fijación en lista el **5 de octubre de 2007** correspondiente al examen de fondo, estando dentro del término legal en los siguientes términos:

Claridad y Unidad de Invención

En primer lugar, presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 31 reivindicaciones donde se han realizado las siguientes modificaciones con el fin de superar las objeciones hechas por su Despacho a la presente solicitud de patente:

Las reivindicaciones 1,8,11-16, 20 y 22 han sido modificadas

Las reivindicaciones 2-7, 9 y 10 han sido eliminadas

Las reivindicaciones 19-21 han sido adicionadas

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

Las reivindicaciones fueron modificadas con el fin de limitar a sólo un sitio de reconocimiento de serina proteasa. El sustento para esta modificación se encuentra, en la página 11, líneas 5-9. Los inventores reportan por primera vez que una serina proteasa es abundante en el intestino del gusano de la raíz de maíz del oeste, diseñaron un sitio de reconocimiento para dicha serina proteasa y crearon una toxina activa mediante ingeniería del sitio de una proteína Cry3A no activa.

El solicitante proporciona múltiples ejemplos de realización que sustentan los sitios de inserción reclamados en el dominio I entre los aminoácidos 107 y 115; en el dominio III entre los aminoácidos 536 y 542; y en el dominio I entre los aminoácidos 107 y 115 Y dominio III entre los aminoácidos 536 y 542. El Ejemplo 3 divulga inserciones en el dominio I entre los aminoácidos 107 y 113 (Página 60); dominio I entre aminoácidos 111 y 107 (Página 61); dominio III entre aminoácidos 540 y 541 (Página 62); dominio III entre aminoácidos 539 y 542 (Página 63); dominio I entre los aminoácidos 107 y 113 y dominio III entre aminoácidos 540 y 541 (Página 66); y dominio I entre aminoácidos 107 y 111 y dominio III entre aminoácidos 539 y 542 (Página 67).

En consecuencia, el objeto de la presente solicitud ha sido claramente definido teniendo en cuenta las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio. Igualmente las objeciones por claridad y unidad invención se deben tener como superadas en vista de dichas modificaciones.

Excepciones de patentabilidad

Con el fin de superar esta objeción, las reivindicaciones dirigidas a plantas han sido modificadas y están ahora dirigidas a células de maíz o células de raíz de maíz. Igualmente, las reivindicaciones dirigidas a semillas han sido eliminadas.

Nivel Inventivo

El problema a resolver en la presente solicitud fue convertir la proteína Cry3A nativa, que no tiene actividad contra el patógeno objetivo, el gusano de la raíz de maíz del oeste (*Diabrotica virgifera*), en una proteína activa contra dicho patógeno. Los inventores resolvieron el problema identificando primero una actividad proteasa que era abundante en el intestino

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

del insecto objetivo. De manera sorpresiva e inesperada, los inventores identificaron una actividad serina proteasa en el intestino del gusano de la raíz de maíz del oeste (ver Tabla 1 en página 58). Antes de la presente divulgación, se creía que las proteasas predominantes en los insectos coleópteros eran las cisteína proteasas (ver página 6, líneas 12-16 y páginas 57-59, Ejemplo 2). Los inventores también demostraron que el intestino del gusano de la raíz de maíz del oeste no procesa el sustrato de tripsina R-R (Tabla 1 página 58). Basados en este descubrimiento, se insertó una secuencia de serina proteasa, AAPF, en el Dominio I, Dominio III y Dominios I y III en múltiples ubicaciones dentro de los dominios de la proteína Cry3A, de manera que la Cry3A modificada pudiera ser procesada por el intestino del insecto objetivo en toxinas insecticidas activas.

Ahora bien, nuestro apoderado respetuosamente disiente con las afirmaciones del señor Examinador quien afirma que las reivindicaciones se refieren a más de un invento. El problema a ser resuelto en el presente caso fue convertir una proteína Cry3A nativa, que no tiene actividad contra el patógeno objetivo, gusano de la raíz de maíz del oeste (*Diabrotica virgifera virgifera*) en una toxina activa contra dicho patógeno.

Los inventores resolvieron este problema identificando ciertas regiones dentro de la proteína en las cuales se puede insertar una secuencia de reconocimiento de serina proteasa no presente naturalmente para crear una toxina activa. Igualmente, disiente el Solicitante con la afirmación del Examinador cuando indica que no es posible verificar si las moléculas tienen la misma actividad. La solicitud enseña a una persona versada en el arte cómo producir la molécula reclamada y cómo ensayarla contra el gusano de la raíz de maíz del oeste (ver Ejemplo 4, páginas 68-69). Igualmente, la solicitud divulga que todas las proteínas Cry3A modificadas en el dominio I, dominio III o dominio I y dominio III tienen la misma actividad contra el gusano de la raíz de maíz del oeste.

Ahora bien, tal como se mencionó anteriormente, el problema a resolver en este caso fue convertir la proteína Cry3A nativa, que no tiene actividad contra el patógeno objetivo, el gusano de la raíz de maíz del oeste (*Diabrotica virgifera virgifera*) (ver por ejemplo D1, página 150, línea

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

12), en una proteína activa contra dicho patógeno. Los inventores resolvieron el problema identificando primero una actividad proteasa que era abundante en el intestino del insecto objetivo. De manera sorpresiva e inesperada, los inventores identificaron una actividad serina proteasa similar a catepsina G en el intestino del gusano de la raíz de maíz del oeste (ver Tabla 1).

Antes de la presente divulgación, se creía que las cisteína proteasas eran las proteasas predominantes en los insectos coleópteros (ver página 6, líneas 12-16 y página 57-59, Ejemplo 2). Los inventores también demostraron que el intestino del gusano de la raíz de maíz del oeste no procesa el sustrato de tripsina R-R (Tabla 1 en página 58). Basados en este descubrimiento, se insertó una secuencia de catepsina G, AAPF, en el Dominio I, Dominio III y Dominios I y III en múltiples ubicaciones dentro de los dominios de la proteína Cry3A, de manera que la Cry3A modificada pudiera ser procesada por el intestino del insecto objetivo en toxinas insecticidas activas. Sobre este punto pongo de presente a su Despacho que no existen en D1 enseñanzas que motivaran a una persona versada en el arte, frente a este problema técnico, a lograr lo que la presente invención logra.

El documento D1 enseña que una proteína Cry3Bb nativa no modificada tiene actividad insecticida contra los patógenos objetivo gusano de la raíz de maíz del sur (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) y gusano de la raíz de maíz del oeste.

D1 también enseña que la inserción de un sitio de reconocimiento de tripsina adicional (arginina) en la horquilla 1 α 3,4 del dominio I de la proteína Cry3Bb incrementa la actividad de Cry3Bb contra el gusano de la raíz de maíz del sur. Igualmente, D1 enseña que la inserción de un sitio de reconocimiento de proteasa adicional, de un tipo que está naturalmente presente en la horquilla 1 α 3,4, mejora la bioactividad de Cry3Bb contra el gusano de la raíz de maíz del sur. Por ejemplo, D1 enseña la inserción de un sitio de tripsina adicional (R158) inmediatamente corriente arriba del sitio de tripsina naturalmente presente (R159) en la horquilla 1 α 3,4, creando un sustrato de tripsina "R-R".

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

En contraste, la reivindicación 1 de la presente solicitud reclama la inserción en el Dominio I, Dominio III, o Dominios I y III de Cry3A de un sitio de reconocimiento de proteasa que **no está naturalmente presente**, y que modifica la proteína Cry3A, **convirtiéndola de una proteína no activa contra el patógeno, en una toxina activa**. Las construcciones del Dominio I están ejemplificadas en la presente aplicación, en las cuales un sitio de reconocimiento de proteasa no presente naturalmente, AAPF, que no está presente en ningún lugar de la secuencia de Cry3A nativa, se inserta en la región de la horquilla 1α3,4.

La presente solicitud demuestra que agregando el sitio AAPF a la horquilla 1α3,4 corriente arriba del sitio nativo de tripsina (arginina), se crea una proteína activa denominada Cry3A055 (SEQ ID NO:9) pero también demuestra que reemplazando el sitio de tripsina nativo en la horquilla 1α3,4 con la secuencia AAPF se crea una proteína activa contra el gusano de la raíz de maíz del oeste denominada Cry3A054 (SEQ ID NO:7). Por lo tanto, la presente solicitud enseña a una persona versada en el arte que una proteína Cry3A no activa puede ser diseñada para ser una toxina activa contra el gusano de la raíz de maíz del oeste insertando un sitio de proteasa no natural en la horquilla 1α3,4 adicionado al sitio de reconocimiento de proteasa natural o en lugar del sitio de reconocimiento de proteasa natural. En consecuencia, D1 no sugiere ni hace obvia la presente invención.

Por otro lado, D1 afirma que Cry3A y Cry3B son altamente homólogos. De hecho, Cry3A y Cry3B presentan sólo un 68% de identidad a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos (ver Anexo A adjunto) y, más importante, presentan sólo un 42% de identidad en la región de la horquilla 1α3,4 del Dominio I.

D1 enseña que la horquilla 1α3,4 es importante para permitir que la toxina forme canales iónicos en el intestino del insecto. D1 también indica que realizar cualquier cambio en esta región de la horquilla puede resultar en cambios sutiles que influyen la funcionalidad del canal iónico (D1, página 61, líneas 25-27). Por lo tanto, en base a la divulgación de D1 relacionada a Cry3B, una persona versada en el arte no podría predecir o esperar un resultado positivo de la inserción de una secuencia de reconocimiento de proteasas no natural en la región de la horquilla 1α3,4 de la proteína Cry3A.

CASTELLANOS & CO.
A B O G A D O S
Calle 94 A No. 7 A - 09
Bogotá, D.C., COLOMBIA

D1 enseña que la inserción de un sitio de proteasa adicional en una región de la horquilla del Dominio I de Cry3Bb resulta en una actividad incrementada de la proteína Cry3Bb contra el gusano de la raíz de maíz del sur. D1 basa esta afirmación en la actividad insecticida de la mutante designada Cry3Bb11221 (ver D1, Ejemplo 5.2.7, página 129-130). Sin embargo, D1 no proporciona absolutamente ninguna evidencia de que el aumento en la bioactividad de esta mutante sea debido a una arginina adicional (R) en la región de la horquilla 1α3,4.

D1 divulga que Cry3Bb11221 tiene cuatro sustituciones de aminoácidos en la horquilla 1α3,4 incluyendo la sustitución L158R que introduce un sitio de tripsina adicional (ver la Tabla 2 en la página 15; y en página 129, línea 26). Las otras tres sustituciones de aminoácidos, T154F, P155H, y L156H, no son necesariamente para el reconocimiento de una proteasa como la tripsina, que reconoce y corta el lado carboxilo de residuos de arginina disponibles. El solicitante ha analizado estos cambios y ha encontrado que las cuatro sustituciones de aminoácido cambian significativamente el índice hidropático de la horquilla 1α3,4 (ver Anexo B adjunto).

D1 indica que el carácter hidropático de los aminoácidos en las horquillas "contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, sustratos, receptores y similares" (D1 en página 56, líneas 10-14). Por lo tanto, no sería claro para una persona versada en el arte, basada en lo divulgado por D1, determinar si los responsables de la bioactividad incrementada de Cry3Bb11221 contra el gusano de la raíz de maíz del sur es el sitio adicional de reconocimiento de tripsina (arginina) o las otras sustituciones de aminoácidos.

Dada la baja identidad entre Cry3A y Cry3B en la región de la horquilla 1α3,4, la divulgación de la proteína mutante Cry3Bb11221 no haría obvia la presente invención.

De hecho, D1 se contradice a sí misma, lo que alejaría a una persona versada en el arte de la presente invención. D1 enseña que los residuos de aminoácidos del Dominio I están expuestos a solventes y están por lo tanto disponibles para varias interacciones moleculares.

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A - 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

D1 específicamente afirma que "la alteración de estos aminoácidos podría resultar en mayor estabilidad de la proteína eliminando u ocluyendo sitios sensibles a proteasas" (ver D1 en página 61, líneas 27-30). Entonces, por un lado D1 sugiere a la persona versada agregar sitios de proteasas adicionales a la horquilla 1 α 3,4 y por otro, sugiere eliminar estos sitios. Esta contradicción puede alejar a la persona versada en el arte de la presente invención o al menos sugerir que la inserción de un sitio de proteasa en la región de la horquilla 1 α 3,4 puede en realidad desestabilizar la proteína. En base a las enseñanzas de D1 una persona versada no esperaría llegar a la invención tal como se reclama en la reivindicación 1.

Aún cuando uno asuma que la actividad mejorada de Cry3Bb11221 contra el gusano de la raíz de maíz del sur es debido a la inserción del sitio de tripsina natural en la horquilla 1 α 3,4, D1 no enseña que la mutante sea activa contra el gusano de la raíz de maíz del oeste.

El solicitante afirma que la demostración de la bioactividad de una proteína contra el gusano de la raíz de maíz del sur no permite a una persona versada en el arte tener una expectativa razonable de predecir la bioactividad de una proteína completamente diferente contra el patógeno objetivo de la presente invención, el gusano de la raíz de maíz del oeste, como indica la reivindicación 1. Si bien las dos especies pertenecen al mismo género, existen diferencias significativas entre ambas, que son relevantes para el diseño exitoso de una proteína insecticida. Una de estas diferencias se relaciona con el ambiente del intestino y particularmente con las proteasas presentes en el intestino.

Las larvas del gusano de la raíz de maíz del sur son polifágicas, alimentándose de plantas de al menos ocho familias (Krysan & Miller 1986. *Methods for Study of Pest Diabrotica*, Springer-Verlag, p.19). Para ser exitoso en nutrirse de tantas plantas, éste gusano debe tener una amplia diversidad de proteasas intestinales para procesar las diversas fuentes de alimento. La actividad cisteína proteasa, constituye la mayor actividad digestiva en el intestino medio de las larvas del gusano de la raíz de maíz del sur. La inhibición de esta actividad enzimática ha resultado en un retraso del crecimiento e incremento de la mortalidad. De hecho, se ha divulgado que la principal actividad proteasa en el gusano de la raíz de maíz del sur es una cisteína proteasa que prefiere sustratos que contienen un residuo de arginina en la posición P1, por ejemplo R-R como se divulga en D1 (ver Fabrick et al. 2002. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:405-145;).

CASTELLANOS & CO.

A B O G A D O S

Calle 94 A No. 7 A 09

Bogotá, D.C., COLOMBIA

Por otro lado, las larvas del gusano de la raíz de maíz del oeste son monofágicas, alimentándose sólo de raíces de ciertas pasturas (Krysan & Millar 1986. Methods for Study of Pest Diabrotica, Springer-Verlag, p.19). Las larvas del gusano de la raíz de maíz del oeste por lo tanto no requieren una gran diversidad de proteasas para explotar este pequeño rango de alimentos.

Si bien se ha reportado que las cisteína proteasas son abundantes en el intestino del gusano de la raíz de maíz del oeste, la presente solicitud divulga por primera vez que la serina proteasa similar a catepsina G es abundante.

Dadas las significativas diferencias entre los complejos de proteasas en el intestino de ambas especies, una persona versada en la materia no podría utilizar las enseñanzas de D1 para predecir el diseño exitoso de una proteína Cry3A modificada, en la cual se ha insertado un sitio de reconocimiento de proteasa no natural en el dominio I, dominio III ó dominios I y III, que crea una proteína activa contra el gusano de la raíz de maíz del oeste a partir de una proteína sin actividad. La presente solicitud sustenta por sí misma el argumento de que la bioactividad contra una especie de gusano de la raíz no permite predecir la actividad insecticida contra otra especie. De manera notable, las proteínas Cry3A modificadas de la presente invención, que presentan altos niveles de actividad insecticida contra el gusano de la raíz de maíz del oeste, no tienen actividad alguna contra el gusano de la raíz de maíz del sur (ver Ejemplo 4 en las páginas 68-69).

En base a las enseñanzas de D1, una persona versada en el arte no predeciría éste resultado sorprendente. Los inventores de la presente solicitud identificaron una actividad proteasa específica en el intestino del insecto objetivo, que en aquel momento era desconocida en el gusano de la raíz, diseñaron una Cry3A activa contra el insecto objetivos en base a la actividad proteasa descubierta, y diseñaron de modo sorprendente una proteína que fue selectiva, presentando actividad contra el gusano de la raíz de maíz del este y no contra el gusano de la raíz de maíz del sur.

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

①

SOLICITUD DE:

☐

Corrección de Error Material

☒

Modificación a una solicitud

②

SOLICITANTE

Nombre: SYNGENTA PARTICIPATIONS AG

Dirección: Schwarzwaldallee 215
CH-4058 Basilea
Suiza

Domicilio: CH-4058 Basilea
Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: MARGARITA CASTELLANOS A.

Dirección: Calle 94 A No. 7 A-09

Teléfono: 610 7420 Fax: 610 0706

E-mail: mail@alvarocastellanos.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39'779.654

TPA

70.819

④

Número de Expediente:

04.017.803

⑤

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 31 reivindicaciones sobre el cual solicito se realice el examen de patentabilidad

⑥

Comprobante de pago No.

08-6,544

Fecha

24 de enero de 2008

⑦

Anexos:

☒

Comprobante de pago de la tasa.

☐

Poderes si fuere el caso, junto con la sustitución de los mismos a mi favor.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas

☒

Nuevo capítulo reivindicatorio

⑧

NOMBRE

MARGARITA CASTELLANOS A.

FIRMA


CC 39'779.654 Usaquén - TPA 70.819 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página - LPL/JDF-P1052

28 ENE. 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 6,544
FECHA : ENERO 24 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-017803-00008-0000

Fecha: 2008-01-28 15:16:37 Dep: 2020 M
Tra. 11 PATENTEIY! Evt: 379 F
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folio

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ALVARO CASTELLANOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	1245666	23/01/2008	700,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTIESTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50003-01-03	CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	
12		MARCAS Y LEHAS COMERCIALES	103,000.00
TOTAL :			\$ 103,000.00

SON: CIENTO TRES MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

REIVINDICACIONES

1. Una toxina Cry3A modificada que comprende un sitio de reconocimiento de proteasa no natural, donde dicho sitio de reconocimiento de proteasa modifica una toxina Cry3A y está situada en una posición seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una posición comprendida entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 115 de la SEC ID NO: 4;
- b) una posición comprendida entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 536 y 542 de la SEC ID NO: 4; y
- c) una posición comprendida entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 115 de la SEC ID NO: 4; y entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 536 y 542 de la SEC ID NO: 4;

donde dicho sitio de reconocimiento de proteasa es reconocible por una proteasa intestinal del gusano de la raíz del maíz del oeste, y donde dicha toxina Cry3A modificada causa una mortalidad más elevada en el gusano de la raíz del maíz del oeste que la mortalidad causada por dicha toxina Cry3A al gusano de la raíz del maíz del oeste en un bioensayo de dieta artificial.

2. La toxina Cry3A modificada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha serina proteasa intestinal es catepsina G.

3. La toxina Cry3A modificada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho sitio de reconocimiento de serina proteasa está:

- i) situada entre los aminoácidos números 107 y 115 de la SEC ID NO: 4; o
- ii) situada entre los aminoácidos números 536 y 542 de la SEC ID NO: 4; o
- iii) situada entre los aminoácidos números 107 y 115 y entre los aminoácidos números 536 y 542 de la SEC ID NO: 4.

4. La toxina Cry3A modificada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho sitio de reconocimiento de serina proteasa está:

- i) situada entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 113 de la SEC ID NO: 4; o
- ii) situada entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 111 de la SEC ID NO: 4; o
- iii) situada entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 536 y 541 de la SEC ID NO: 4; o
- iv) situada entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 540 y 541 de la SEC ID NO: 4; o
- v) situada entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 113 de la SEC ID NO: 4; y entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 540 y 541 de la SEC ID NO: 4; o
- vi) situada entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 111 de la SEC ID NO: 4; y entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 536 y 541 de la SEC ID NO: 4; o
- vii) situada entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 111 de la SEC ID NO: 4; y entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 540 y 541 de la SEC ID NO: 4.

5. La toxina Cry3A modificada de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho sitio de reconocimiento de serina proteasa está:

- i) situada entre los aminoácidos números 107 y 113 de la SEC ID NO: 4; o
- ii) situada entre los aminoácidos números 107 y 111 de la SEC ID NO: 4; o
- iii) situada entre los aminoácidos números 536 y 541 de la SEC ID NO: 4; o
- iv) situada entre los aminoácidos números 540 y 541 de la SEC ID NO: 4; o
- v) situada entre los aminoácidos números 107 y 113 y entre los aminoácidos números 541 y 541 de la SEC ID NO: 4; o
- vi) situada entre los aminoácidos números 107 y 111 y entre los aminoácidos números 536 y 541 de la SEC ID NO: 4; o

Igual
Rev 4.

vii) situada entre los aminoácidos números 107 y 111 y entre los aminoácidos números 540 y 541 de la SEC ID NO: 4.

6. La toxina Cry3A modificada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha toxina Cry3A modificada causa una mortalidad de por lo menos un 50% en el gusano de la raíz del maíz del oeste, al cual dicha toxina Cry3A causa hasta un 30% de mortalidad.

7. La toxina Cry3A modificada de acuerdo con la reivindicación 1, la cual

(i) es codificada por los nucleótidos 1-1791 de la SEC ID NO: 6, los nucleótidos 1-1806 de la SEC ID NO: 8, los nucleótidos 1-1812 de la SEC ID NO: 10, los nucleótidos 1-1794 de la SEC ID NO: 12, los nucleótidos 1-1818 de la SEC ID NO: 14, los nucleótidos 1-1812 de la SEC ID NO: 16, los nucleótidos 1-1791 de la SEC ID NO: 18 o los nucleótidos 1-1818 de la SEC ID NO: 20; o

(ii) comprende la secuencia de aminoácido establecida en las SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 21.

⑧ La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha toxina Cry3A modificada es activa contra el gusano de la raíz del maíz del norte. ??

9. Una molécula de ácido nucleico aislada comprendiendo la secuencia nucleotídica que codifica para una toxina Cry3A modificada de acuerdo a la reivindicación 1.

10. Una molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo a la reivindicación 9 comprendiendo la secuencia nucleotídica que codifica para una toxina Cry3A modificada de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8.

11) Un gen *cry3A* modificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican para una toxina Cry3A modificada comprendiendo un sitio de reconocimiento de serina proteasa que no ocurre naturalmente, en donde dicho gen *cry3A* modificada comprende una secuencia codificante que codifica dicho sitio de reconocimiento de serina proteasa, en donde dicha secuencia codificante modifica al gen *cry3A* y está insertada en una posición seleccionada del grupo que consiste en:

- a) una posición entre los codones que codifican para los aminoácidos correspondientes a aminoácidos número 107 y 115 de la SEQ ID NO:4;
- b) una posición entre los codones que codifican para los aminoácidos correspondientes a aminoácidos número 536 y 542 de la SEQ ID NO:4;
- c) una posición entre los codones que codifican para los aminoácidos correspondientes a aminoácidos número 107 y 115 de la SEQ ID NO:4, y entre los codones que codifican para los aminoácidos correspondientes a aminoácidos número 536 y 542 de la SEQ ID NO:4,

en donde dicho sitio de reconocimiento de serina proteasa es reconocible por una proteasa de intestino del gusano de raíz de maíz del oeste, y donde dicha toxina Cry3A modificada causa una mortalidad más alta al gusano de la raíz del maíz del oeste que la mortalidad causada por dicha toxina Cry3A al gusano de la raíz del maíz del oeste en un bioensayo de dieta artificial.

12. El gen *cry3A* modificado de acuerdo a la reivindicación 11, en donde dicha serina proteasa es catepsina G.

13. El gen *cry3A* modificado de acuerdo a la reivindicación 11, en donde

- (i) dicha secuencia de nucleótidos comprende los nucleótidos 1-1791 de la SEC ID NO: 6, los nucleótidos 1-1806 de la SEC ID NO: 8, los nucleótidos 1-1812 de la SEC ID NO: 10, los nucleótidos 1-1794 de la SEC ID NO: 12, los nucleótidos 1-1818 de la SEC ID NO: 14, los nucleótidos 1-1812 de la SEC ID NO: 16, los nucleótidos 1-1791 de la SEC ID NO: 18 o los nucleótidos 1-1818 de la SEC ID NO: 20; o

Repte
Inf. EV 1
solo cambio
preambulo
Implicito
en EV 8 y 9

Repte
EV 2

Igual.
EV 7
solo cambio
preambulo

(ii) dicha toxina Cry3A modificada comprende la secuencia de aminoácido establecida en las SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 17, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 21.

Igual a 8 14. El gen cry3A modificado de acuerdo a la reivindicación 11, donde dicha toxina Cry3A modificada es activa contra el gusano de la raíz del maíz del norte. ??

15. Una célula de raíz de maíz transgénica que comprende una secuencia de nucleótidos que codifican una toxina Cry3A modificada de acuerdo a la reivindicación 1 en donde dicha célula de raíz de maíz transgénica expresa dicha toxina Cry3A modificada en el tejido de raíz a un nivel que causa la mortalidad del gusano de raíz de maíz del oeste. ??

16. Una célula de raíz de maíz transgénica que comprende un gen cry3A modificado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una toxina Cry3A, siendo dicho gen cry3A modificado como se define en la reivindicación 11, en donde dicha célula de raíz de maíz transgénica expresa dicha toxina Cry3A modificada en el tejido de raíz a un nivel que causa la mortalidad del gusano de raíz de maíz del oeste. ?

17. La célula de raíz de maíz transgénica de acuerdo a la reivindicación 15, en donde dicho sitio de reconocimiento de serina proteasa es

- i) ubicado entre los aminoácidos número 107 y 111 de SEQ ID NO:4; o
- ii) ubicado entre los aminoácidos número 540 y 541 de SEQ ID NO:4; o
- iii) ubicado entre los aminoácidos número 107 y 111 de SEQ ID NO:4 y entre los aminoácidos número 540 y 541 de SEQ ID NO:4.

18. La célula de raíz de maíz transgénica de acuerdo a la reivindicación 15 o reivindicación 16, donde

*= R/ 1
y m solo
cambio
prembulo.*

(i) dicha secuencia de nucleótidos comprende los nucleótidos 1-1806 de la SEC ID NO: 8, los nucleótidos 1-1818 de la SEC ID NO: 14, los nucleótidos 1-1791 de la SEC ID NO: 18; o

(ii) dicha toxina Cry3A modificada comprende la secuencia de aminoácido establecida en las SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 15, SEC ID NO: 19.

19. La célula de raíz de maíz transgénica de acuerdo a la reivindicación 15, donde dicho tejido de raíz causa un 40% de mortalidad al gusano de raíz de maíz del oeste.

20. La célula de raíz de maíz transgénica de acuerdo a la reivindicación 15, donde dicha célula de raíz expresa la toxina Cry3A modificada a un nivel suficiente para

(i) prevenir que el gusano de la raíz del maíz del oeste deteriore seriamente las raíces de una planta transgénica; o

(ii) prevenir que el daño producido por la alimentación del gusano de la raíz del maíz del oeste cause que la planta se caiga.

21. Un método para controlar la infestación de plantas de maíz por el gusano de la raíz del maíz del oeste, comprendiendo el método:

i) proveer la planta transgénica de maíz de acuerdo a la reivindicación 15; y

ii) contactar dicho gusano de la raíz del maíz del oeste con la planta.

22. Un método para producir la toxina Cry3A modificada, que comprende:

(a) obtener una célula huésped bacteriana transgénica que comprende una construcción quimérica comprendiendo la secuencia de un promotor heterólogo operativamente unido con el ácido nucleico de la reivindicación 9;

(b) cultivar la célula huésped transgénica bajo condiciones que permiten la expresión de la toxina Cry3A modificada; y

(c) recuperar la toxina Cry3A modificada expresada.

(23) Un método para producir plantas resistentes a insectos, comprendiendo:

- a) integrar establemente la molécula de ácido nucleicos de acuerdo a la reivindicación 9 en el genoma de células de plantas; y
- b) regenerar plantas transformadas establemente a partir de dichas células de plantas transformadas, donde dichas plantas establemente transformadas expresan una cantidad efectiva de toxina Cry3A para tornar dichas plantas transformadas resistentes al menos al gusano de raíz de maíz del oeste.

Objeto de la invención

(24) Un método para controlar al menos el gusano de raíz de maíz del oeste, que comprende administrar oralmente al gusano de la raíz del maíz del oeste una cantidad efectiva de toxina de acuerdo a la reivindicación 1.

(25) Un método para hacer una toxina Cry3A modificada, que comprende:

- a) obtener un gen cry3A que codifica para una toxina Cry3A;
- b) identificar una proteasa de intestino del gusano de raíz de maíz del oeste;
- (a) obtener un gen cry3A que codifica una toxina Cry3A;
- (b) identificar una proteasa intestinal del gusano de la raíz del maíz del oeste;
- (c) obtener una secuencia nucleotídica que codifica un sitio de reconocimiento para dicha proteasa intestinal;
- (d) insertar dicha secuencia nucleotídica en dicho gen cry3A, de modo que dicho sitio de reconocimiento esté situado en dicha toxina Cry3A en una posición comprendida entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 115 de la SEC ID NO: 4, o en una posición comprendida entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 536 y 542 de la SEC ID NO: 4, o en una posición comprendida entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 107 y 115 de la SEC ID NO: 4, y entre los aminoácidos que corresponden a los aminoácidos números 536 y 542 de la SEC ID NO: 4, creando de este modo el gen cry3A modificado;
- (e) insertar dicho gen cry3A modificado en un cassette de expresión; y

(f) transformar dicho cassette de expresión en una célula huésped no humana, donde dicha célula huésped produce una toxina Cry3A modificada.

- (26) Una construcción quimérica que comprende una secuencia promotora heteróloga unida operativamente a
- (i) la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9; o
 - (ii) el gen cry3A modificado de la reivindicación 11.

(27) Un vector recombinante que comprende la construcción quimérica de la reivindicación 26.

Sustento? (28) Una célula huésped transgénica no humana que comprende la construcción de la reivindicación 26.

29. La célula huésped transgénica de acuerdo con la reivindicación 28, la cual es una célula bacteriana o una célula de planta.

30. Una célula de planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 29, donde dicha célula de planta es una célula de planta de maíz.

31. Una composición que comprende una cantidad efectiva de la toxina de la reivindicación 1 para causar la mortalidad del gusano de raíz de maíz del oeste.

Sustento?
Definición composición, elementos y [c/u] q' lo componen.



Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae)

J. Fabrick ^a, C. Behnke ^a, T. Czapla ^b, K. Bala ^{1,b}, A.G. Rao ^b, K.J. Kramer ^{2,c},
G.R. Reeck ^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Willard Hall, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA

^b Pioneer Hi-Bred International Co., Johnston, IA 50131, USA

^c Grain Marketing and Production Research Center, Agricultural Research Service, US Department of Agriculture, Manhattan, KS 66502, USA

Received 12 October 2000; received in revised form 30 May 2001; accepted 15 June 2001

Abstract

The major proteinase activity in extracts of larval midguts from the southern corn rootworm (SCR), *Diabrotica undecimpunctata howardi*, was identified as a cysteine proteinase that prefers substrates containing an arginine residue in the P1 position. Gelatin-zymogram analysis of the midgut proteinases indicated that the artificial diet-fed SCR, corn root-fed SCR, and root-fed western corn rootworms (*Diabrotica virgifera virgifera*) possess a single major proteinase with an apparent molecular mass of 25 kDa and several minor proteinases. Similar proteinase activity pH profiles were exhibited by root-fed and diet-fed rootworms with the optimal activity being slightly acidic. Rootworm larvae reared on corn roots exhibited significantly less caseinolytic activity than those reared on the artificial diet. Midgut proteolytic activity from SCR was most sensitive to inhibition by inhibitors of cysteine proteinases. Furthermore, rootworm proteinase activity was particularly sensitive to inhibition by a commercial protein preparation from potato tubers (PIN-II). One of the proteins, potato cysteine proteinase inhibitor-10', PCPI-10', obtained from PIN-II by ion-exchange chromatography, was the major source of inhibitory activity against rootworm proteinase activity. PCPI-10' and E-64 were of comparable potency as inhibitors of southern corn rootworm proteinase activity (IC_{50} = 31 and 35 nM, respectively) and substantially more effective than chicken egg white cystatin (IC_{50} = 121 nM). Incorporation of PCPI-10' into the diet of SCR larvae in feeding trials resulted in a significant increase in mortality and growth inhibition. We suggest that expression of inhibitors such as PCPI-10' by transgenic corn plants in the field is a potentially attractive method of host plant resistance to these *Diabrotica* species. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Midgut; Rootworm; Cysteine proteinase; Potato inhibitor; Engineered host plant resistance

1. Introduction

The southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi*, infests the roots of many grass crops

and weeds as well as those of peanuts, alfalfa, and occasionally cucurbits (Anonymous, 1998). It is one of the most damaging pests of corn and peanuts and is widely distributed, occurring in most areas east of the Rocky Mountains, in southern Canada and in Mexico, but it is most abundant and destructive in the southern US. The beetles are general feeders on at least 280 plant species, including most cultivated crops.

Both cultural and chemical methods are used to control rootworms. For example, early plowing and/or disking at least 30 days before planting corn removes vegetation and discourages egg-laying. Also, early planting

* Corresponding author. Tel.: +1-785-532-6117; fax: +1-785-532-7278.

E-mail addresses: kjkramer@ksu.edu (K.J. Kramer), reeck@ksu.edu (G.R. Reeck).

¹ Present address: Genomic Solutions Inc., Ann Arbor, MI 48103, USA.

² Corresponding address: GMPRC, 1515 College Avenue, Manhattan, KS 66502, USA. Tel.: +1-785-776-2711; fax: +1-785-537-5584.

and seeding rates near the maximum for the variety ensure a good stand. Finally, carrying out recommended agronomic practices leads to vigorous plants with improved tolerance. Pre-emergence granular insecticides can be used for the control of larvae, but it is not economically feasible to control larvae by spraying of the adults.

Cultivars resistant to insect attack offer another strategy for rootworm control. Although some success in attaining resistance to rootworms has been obtained through conventional breeding programs, more resistance germplasm is needed. Transgenic plant technology is now producing resistant crops by introducing novel resistance genes into plant species (Estruch et al., 1997; Hilder and Boulter, 1999). Genes encoding inhibitors of insect proteinases are one example of insecticidal protein genes that have been isolated from various sources and transferred to crops by genetic engineering (Gatchouse and Gatehouse, 1998; Michaud and Vrain, 1998; Recek et al., 1998). A number of transgenic plants, including tobacco, potato, rice, strawberry, oilseed rape, and poplar have been produced, which express foreign protease inhibitors, some of which exhibit enhanced resistance to their insect pests. Expression of cystatins, a family of proteinaceous inhibitors of cysteine proteinases, in transgenic plants to increase host-plant resistance has only been marginally successful. For example, transgenic potato expressing rice cystatin inhibited larval growth and exhibited mortality of the Colorado potato beetle (Lecardonnell et al., 1999). However, growth compensation and faster development of the same species feeding on potato foliage expressing rice cystatin has also been observed (Cloutier et al., 1999, 2000). In two varieties of transgenic poplar expressing cysteine proteinase inhibitors from rice (Leple et al., 1995) and *Arabidopsis* (Delledonne et al., 2001), substantial levels of resistance to two chrysomelid beetle species were achieved.

Use of genes that encode foreign proteinase inhibitors in transgenic plants for host plant resistance to rootworms has not yet been reported. In an artificial diet, soyacystatin N, a soybean cysteine proteinase inhibitor, inhibited both western corn rootworm gut proteolysis and larval growth (Kiowa et al., 2000). Apparently, one or more cathepsin L-like cysteine proteinases of the papain superfamily, present in the rootworm gut, are the targets of this inhibitor.

As a further step in identifying potential inhibitors that might be used for transgenic crop protection against rootworms, we have determined some biochemical characteristics of the midgut proteolytic enzymes of southern and western corn rootworms, and also evaluated numerous potential protease inhibitors *in vitro* for inhibitory activity toward midgut proteinases in the southern corn rootworm. The most abundant or active proteinase is a cysteine proteinase with an apparent preference for peptide bonds involving arginine residues.

From a heterogeneous, commercial preparation potato tuber proteins, we have purified and sequenced a particularly effective inhibitor of this major proteinase. This protein is a member of a previously well-characterized group of closely related inhibitors of cysteine proteinases (Yamagishi et al., 1991; Krizaj et al., 1993; Gruden et al., 1997) and based on sequence similarity, we have assigned the name potato cysteine proteinase inhibitor-10' (PCPI-10') to this protein.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Casein, ¹⁴C-methylated casein, fluorescein isothiocyanate (FITC)-casein, buffer salts, trichloroacetic acid (TCA), and other chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Dithiothreitol and scintillation cocktail were obtained from Fisher (Pittsburgh, PA). Inhibitors were from Sigma or Calbiochem (San Diego, CA). Calbiochem was the source of the PIN-II inhibitor preparation from potato (catalog number 230907), which was used as the starting material for our purification of PCPI-10'. The bicinchoninic acid protein assay kit was obtained from Pierce (Rockford, IL). Recombinant oryzacystatin (rOC) was prepared by the method of Chen et al. (1992).

2.2. Purification of PCPI-10'

PIN-II, a heterogeneous protein preparation from potato purchased from Calbiochem, was fractionated to identify the major component that inhibited the major proteinase in rootworm extracts. The PIN-II preparation was dissolved in 25 mM sodium acetate, pH 5.5, and subjected to anion exchange chromatography on an HR 10/16 Sepharose FF column equilibrated with the same buffer. A gradient was developed from 0 to 0.5 M NaCl in sodium acetate, pH 5.5, over 170 min at a flow rate of 1 ml/min. Five distinct peaks of protein were eluted. The last peak to elute contained strong inhibitory activity and was essentially homogeneous as judged by SDS gel electrophoresis and capillary electrophoresis. It was subjected to amino acid sequence determination (see Section 2.5) and was named PCPI-10' on the basis of its sequence.

2.3. Insects and gut extracts

Southern corn rootworm larvae were routinely reared using Stoneville artificial media as described by Czaplak and Lang (1990). In two experiments (see Figs. 1 and 2), southern corn rootworm larvae were grown on roots of corn plants, as were larvae of the western corn rootworm. Midguts of the larvae were dissected into liquid

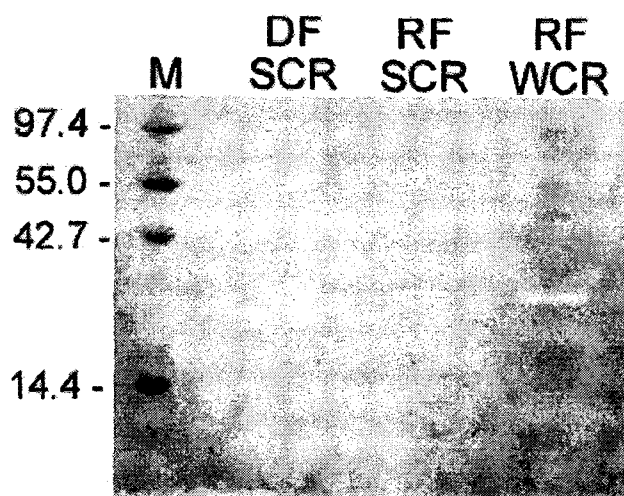


Fig. 1. Substrate-gel electrophoresis of caseinolytic activity in midgut extracts of, from left to right: artificial diet-fed southern corn rootworm (DF SCR); corn root-fed southern corn rootworm (RF SCR); corn root-fed western corn rootworm (RF WCR). Each sample-well contains approximately 10 μ g of protein from each gut extract. Separation was conducted under denaturing/non-reducing conditions using 12% SDS-PAGE gels copolymerized with bovine gelatin. Following electrophoresis, the gel was allowed to incubate in a solution of Triton X-100 to remove SDS and allow subsequent recovery of proteolytic activity. Proteolysis of the gelatin substrate within the gel occurred during incubation in a pH 6.2 buffered solution. The dark blue background was obtained by staining the gel in a Coomassie Brilliant Blue R-250 solution and the clear bands of proteolytic activity were visualized following incubation in destaining solution. The apparent molecular masses of the proteolytic activity bands were estimated by comparison with the protein molecular weight marker (M).

nitrogen at Pioneer Hi-Bred International and shipped on dry ice to Kansas State University. The guts, approximately 50 mg tissue per ml, were homogenized in a cooled glass mortar with a teflon pestle, using 10–20 strokes, in chilled distilled water. The homogenate was centrifuged for 5 min at 10,000g at 4°C. The supernatant was divided into aliquots and stored at –80°C. Microscopic examination of the pellet revealed that the midgut cells were lysed by the homogenization procedure.

2.4. Protein concentration and assays for protease activity

Protein concentration in homogenates was determined using the Pierce BCA protein determination kit as directed by Pierce, using bovine serum albumin as a standard.

Proteolytic activity was determined using the procedure of Gillikin et al. (1992) with minor modifications as explained in Section 3. Aliquots of homogenate, inhibitors, and buffer were combined in a volume of 25 μ l and 25 μ l of the substrate was added. Between 0.08 and 0.15 μ g of extract protein was used per assay. Substrate consisted of 0.5 μ l of 14 C-casein (5 nCi/ μ l or 2.5 nCi/assay) or FITC-casein (2.5 μ g), 0.6 μ l of casein

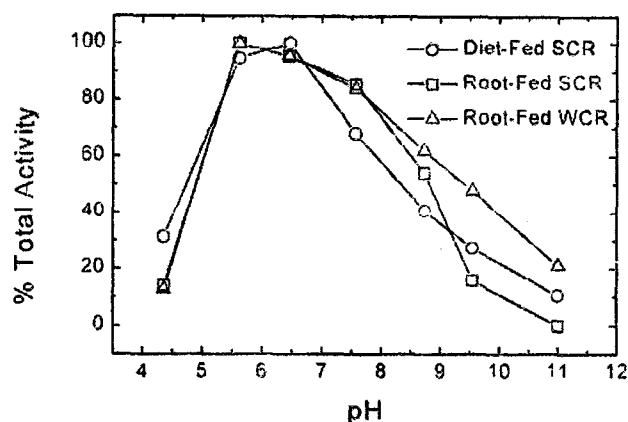


Fig. 2. pH dependence of the caseinolytic activity in midgut extracts of artificial diet-fed southern corn rootworm, corn root-fed southern corn rootworm, and corn root-fed western corn rootworm. In a total volume of 200 μ l, 1 μ g of diluted gut extract protein was incubated in universal buffer at pH 4.4, 5.6, 6.5, 7.6, 8.8, 9.5, or 11.0 with 25 mM DTT for 20 min at 25°C. The assays were initiated by addition of FITC-casein followed by incubation at 37°C. The reactions were stopped by the addition of TCA and allowed to further incubate at 37°C for 5 min. Unhydrolyzed FITC-casein was precipitated on ice for 15 min followed by centrifugation. Four-tenths ml of the supernatants was added to 1.6 ml of 0.5 mM Tris pH 8.8 and the fluorescence intensity was measured at an excitation wavelength of 492 nm and an emission wavelength of 525 nm.

(5 mg/ml), 2.5 μ l 20 mM DTT (or buffer), and 21.4 μ l buffer. Universal buffer (Frugoni, 1957) was used for all assays. Final concentrations in the assay were 14 C-casein (50 nCi/ml), casein (60 μ g/ml), and DTT (1 mM). The mixture of substrate and sample was incubated for 5 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 50 μ l of 20% TCA. The mixtures were placed on ice for 15 min and then centrifuged for 5 min at 13,000g at room temperature. The supernatant (75 μ l) was added to 4 ml of scintillation fluid, vortexed for 10 s, and counted in a Packard 1600CA scintillation analyzer. One unit of activity was defined as the amount that would liberate 1% of the radioactivity in a sample in 1 min. Specific activities are expressed as units/ μ g protein.

Proteolytic activity using FITC-casein was monitored following the method adapted from Orr et al. (1994). About 1 μ g of gut extract was allowed to incubate in universal buffer pH 6.2 containing 25 mM DTT for 20 min at 25°C. The reaction was then started by adding 5 μ g of FITC-casein to each sample. The samples were allowed to incubate at 37°C for 30 min. The reactions were stopped by adding TCA to a final concentration of 3.5%. The quenched samples were allowed to further incubate at 37°C for another 5 min. The unhydrolyzed FITC-casein was precipitated on ice for 15 min followed by centrifugation at 10,000g for 5 min. Then 400 μ l of the supernatants were added to 1.6 ml of 0.5 M Tris pH 8.8 in a four-sided cuvette and the fluorescence intensity was determined using an excitation wavelength of

492 nm and an emission wavelength of 525 nm in a Hitachi F-4010 Fluorescence Spectrophotometer.

Three fluorescent peptides were also used as substrates for analysis of proteolytic activity using a method adapted from Sasaki et al. (1984). The three synthetic peptide substrates were *N*-*t*-BOC-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, *N*-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin, and *N*-succinyl-Ala-Pro-Ala-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma, St. Louis, MO). Prior to addition of the substrate, 5 µl of gut extract was incubated in 10 mM DTT for 5 min at 25°C. Then 1 µl of the enzyme mixture was pipetted into a four-sided cuvette with 1.985 ml of universal buffer pH 6.2 and 0.5 ml of 25 mM DTT. This mixture was allowed to incubate for 10 min at 25°C. The reaction was then started by adding 10.0 µl of 2 mM substrate in 40% DMSO with immediate mixing in the cuvette. The fluorescence intensity was determined using an excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 440 nm for 30 min with data collected every 5 min.

2.5. Amino acid sequence determination of PCPI-10'

The inhibitor, purified by ion-exchange chromatography as described above, was subjected to amino acid sequencing by Edman degradation at the Protein Structure Laboratory of Iowa State University. This was accomplished using a combination of enzymatic and chemical cleavage methods resulting in peptide fragments. These peptide fragments were purified by reversed phase chromatography. An explanation of the peptide mapping is given in the legend to Fig. 6.

2.6. Inhibitor assay and pH dependence of the protease activity

Potential inhibitors were incubated for 5 min with the extract before adding the substrate. The compounds and proteins as well as their sources and concentration in the assays are shown in Table 1. Potential inhibitors were dissolved in water, ethanol, or 1:1 water/ethanol, as appropriate, at 20 times the assay concentration, and 2.5 µl were used per 50 µl assay. For dose-response assays (shown in Fig. 7), varying concentrations of inhibitor were incubated with the extract for 5 min prior to assay. IC₅₀ values were estimated graphically from the plots of percent inhibition versus inhibitor concentration.

The gut extract was assayed at pH 4.4, 5.6, 6.5, 7.6, 8.8, 9.5 and 11.0 in universal buffer at a constant ionic strength of 0.1 M (Frugoni, 1957). The standard assay used 0.4 µg protein in a 30 min assay.

2.7. Zymogram analysis

Proteolytic activity was visualized by modification of the procedure used by Heussen and Dowdle (1980) and

Table 1

Concentrations of inhibitors used in protease assays (source of inhibitor, if not obtained from Sigma, given in parentheses, as are standard abbreviations)

Inhibitor	Assay concentration (mM)
E-64 ^a	0.020
Egg white cystatin	0.001
Recombinant oryzaeystatin (rOC)	0.002
Calpain inhibitor II (Calbiochem)	0.026
Human calpastatin (Calbiochem)	0.004
Antipain	0.132
Leupeptin	0.152
Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)	4.5
Diisopropyl fluorophosphate (DFP)	1.0
Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	0.030
Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK)	0.030
Bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI)	0.0001
Soybean Bowman-Birk trypsin inhibitor	0.0001
Soybean Kunitz trypsin inhibitor (STI)	0.00005
PIN-I preparation, potato (Calbiochem)	0.002
PIN-II preparation, potato (Calbiochem)	0.00075
Chymostatin (Calbiochem)	0.124
Elastase inhibitor (Calbiochem)	0.0002
Elastatinal (Calbiochem)	0.098
Carboxypeptidase inhibitor (Calbiochem)	0.018
Amastatin	0.158
EDTA	10.0
Iodoacetic acid (IAA)	2.0
Potato cystatin	0.001
Rice bran trypsin inhibitor (RBTI)	0.0005

^a 1-*trans*-Epoxy succinyl-leucylamino-4-guanidinobutane, an irreversible inhibitor.

Gillikin et al. (1992), in which 12% SDS-polyacrylamide gels containing 0.3% gelatin were used. About 10 µl of gut extract were diluted 1:1 with SDS-PAGE sample buffer [4.6% SDS, 20% glycerol, 132 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% bromophenol blue]. Then 10 µl samples (0.05 gut equivalents) were loaded directly into wells of the stacking gel. Ten microliters of 1:10 diluted Mid-Range Protein Molecular Weight Markers (Promega, Madison, WI) were loaded to estimate the electrophoretic mobility and apparent molecular masses of the proteolytic activity bands. Electrophoresis was conducted at a constant current of 12 mA at 25°C for approximately 1 h. Following electrophoresis, the gel was placed in 2.5% Triton X-100 (w/v) in water for at least 2 h with shaking to remove SDS. Following the Triton wash, the gel was washed with water until no detergent foaming was visible. The gel was then placed into universal buffer, pH 6.2 for approximately 12 h at 25°C. The gel was placed into a stain solution (50% methanol and 12% acetic acid containing 0.5% Coomassie Brilliant Blue R-250) until a dark-blue background developed. Visualization of the clear proteolytic bands was achieved by placing the gel into destaining solution (20% methanol and 10% acetic

acid) for 1 h with shaking. Gel-scan analysis was performed on a Macintosh computer using the public domain NIH Image program developed at the US National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/niH-image>. Six separate scanning measurements were made for each sample lane to obtain an average integrated density for the major proteinase band/peak.

2.8. Adsorption of protease to inhibitor-bound Sepharose beads

Cystatin, rOC, and the commercial PIN-II preparation were covalently bound to Affi-Gel 102 (Bio Rad, Hercules, CA) beads using the coupling method provided by the manufacturer. Then 100 μ l of the Affi-Gel 102 beads were rinsed with 25 mM MES pH 6.0 until a pH of 6.0 was achieved. Rinsed beads were centrifuged at low speed and the supernatant was discarded. Three-fourths ml of 25 mM MES pH 6.0 and the following protein amounts were added to the beads with gentle stirring: 1.0, 1.8, and 2.0 mg of cystatin, PIN-II preparation, and rOC, respectively. The pH was adjusted to 4.7–5.0 with 1 N HCl. About 3 mg of the 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide coupling reagent was added to the beads with continuous stirring. The pH was again adjusted to 4.7–5.0 with 1 N HCl and the coupling reaction was allowed to proceed overnight at 4°C with gentle end-over-end stirring. Inhibitor-bound beads, 100 μ l, were allowed to incubate with 10 μ l of extract for 30 min at 25°C with gentle stirring. Following the incubation period, the slurry was centrifuged for 10 min at 10,000g. The supernatants were collected and assayed for proteolytic activity using SDS-PAGE zymogram analysis as outlined above.

2.9. Bioassays

The purified PCPI-10' as well as the proteins of an unfractionated aqueous extract of potato were tested for growth inhibitory activity against the southern corn rootworm. Bioassay was performed using the Stoneville diet that was prepared in the standard fashion and allowed to cool to 38°C. Lyophilized inhibitor preparations were solubilized in PBS at pH 7.4 and vortexed thoroughly. Following sufficient cooling, 0.4 ml of the test compound or substance was added to 1.6 ml diet in solution and mixed vigorously. Negative controls were similarly prepared and consisted of PBS buffer pH 7.4 applied to the diet. The diet was then dispensed into 14-well acrylic microtrays and allowed to cool and solidify for several hours. Each well with solid diet containing the test compound or substance was then infested with a newly hatched southern corn rootworm larvae and covered with vented mylar strips to prevent escape while allowing proper air exchange. Fourteen larvae were used in each

of the two replicates of each treatment. The larvae were incubated on the diet for seven days at 28°C and 60% relative humidity. Mortality and weights of surviving insects were recorded. Significant differences between diet treatments were determined using the Tukey HSD multiple comparison test from the software program SYSTAT (Wilkinson, 1989).

3. Results

3.1. Extraction and stability of proteinase activity

Because much of the proteolytic activity in midgut extracts of corn rootworms is apparently from cysteine proteinases (Gillikin et al., 1992 and see later), we included a reducing agent (1 mM dithiothreitol) in all enzyme assays. In addition we examined the potential for enhanced release of proteolytic activity by including Triton X-100 in the extraction buffer. This nonionic detergent has been successfully used to enhance the extraction of proteolytic activity from other insect tissues, presumably by releasing membrane-bound proteases. After an extraction using our conditions but lacking Triton-X-100, we carried out a second extraction of the tissue residue under the same conditions that included Triton X-100 at 0.1% (v/v). The second extract had only about 5% of the caseinolytic activity of the first extract. We concluded that approximately 95% of the caseinolytic activity in rootworm midguts was soluble and that only as much as 5% was membrane bound. We therefore omitted Triton-X-100 from subsequent extractions and utilized the soluble activity for subsequent analyses.

Extracts made under our standard conditions could be stored at –70°C for several weeks without loss in caseinolytic activity or change in the pattern of protease bands observed after substrate-containing polyacrylamide gel electrophoresis (data not shown).

3.2. Substrate-gel electrophoretic analysis of proteases in midgut extracts

Fig. 1 shows the results of a gelatin substrate-gel electrophoretic analysis of gut extracts from laboratory diet-fed and corn root-fed southern corn rootworms and corn root-fed western corn rootworms. All three of the extracts exhibited only one major gelatin-digesting protease that has an apparent molecular mass of approximately 25 kDa. Numerous less intense bands of proteolysis were also visible, with the laboratory diet-fed southern corn rootworms displaying the highest levels. The apparent molecular masses of the minor protease-activity bands were about 20, 40, 70, and >100 kDa.

When we stained gels with Coomassie brilliant blue, more than 20 proteins bands were visualized in gels of

midgut extracts from laboratory diet-fed and corn root-fed southern corn rootworms and laboratory diet-fed western corn rootworms (data not shown). These included several protein bands in the 25 kDa region of the gel.

3.3. Effect of pH on caseinolytic activity

Two types of modified casein were used as substrates to examine the effect of pH on proteolytic activity. Fig. 2 shows that the pH activity profiles for gut extracts from laboratory diet-fed and corn root-fed southern corn rootworms and corn root-fed western corn rootworms were comparable, with optimum pH values of 5.5–6.5 when FITC-casein was used as the substrate. A similar profile was obtained when gut extracts from laboratory diet-fed southern corn rootworms were assayed using radiolabeled casein as the substrate (data not shown). Similarly, Gillikin et al. (1992) found the pH optimum for *Diabrotica virgifera* against a similar substrate to be between pH 5 and 6.

3.4. Substrate specificity

The time course for hydrolysis of a low molecular weight fluorescent peptide, *N*-*t*-BOC-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (P1-Arg substrate), by the three midgut extracts is shown in Fig. 3. Using the same midgut equivalents, relative hydrolytic activities for laboratory diet-fed southern corn rootworms, corn root-fed western corn rootworms, and corn root-fed southern corn rootworms were 1.0/0.2/0.1. Midgut extracts from the laboratory diet-fed southern corn rootworms were used for further analyses because this preparation exhibited the highest activity, all of the gut extracts from laboratory diet-fed and root-fed insects were similar in both electrophoretic patterns and pH activity profiles, and the laboratory diet-fed southern corn rootworms were most readily available as a tissue source.

Two other fluorescent peptides, *N*-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (P1-Tyr substrate) and *N*-succinyl-Ala-Pro-Ala-7-amido-4-methylcoumarin (P1-Ala substrate), were used to further examine the substrate specificities of the southern corn rootworm proteases. Fig. 3 shows the time course for hydrolysis of the P1-Arg substrate and, for comparison, those of the P1-Ala and P1-Tyr peptides. While the P1-Arg compound was a good substrate for the midgut enzymes, little hydrolysis occurred with the latter two substrates.

3.5. Effects of potential inhibitors

About 25 potential inhibitors of southern corn rootworm proteolytic activity were surveyed using ^{14}C -casein as the substrate (Fig. 4). The most inhibitory were a mixture of E-64 with PMSF (95%) or antipain (94%).

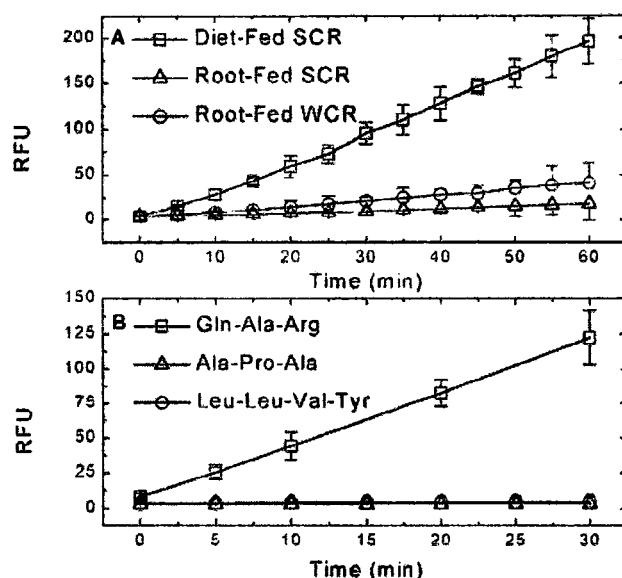


Fig. 3. Hydrolysis of P1-Arg-fluorescent substrate by midgut extracts of artificial diet-fed southern corn rootworm, corn root-fed southern corn rootworm, and corn root-fed western corn rootworm. (A) Gut extract protein (2.5 μg) from diet-fed southern corn rootworm, root-fed southern corn rootworm, and root-fed western corn rootworm were assayed against the fluorescent substrate *N*-*t*-BOC-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin in pH 6.2 Universal buffer with 10 mM DTT. (B) Diet-fed southern corn rootworm gut extract protein (2.5 μg) was assayed against *N*-*t*-BOC-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, *N*-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin, and *N*-succinyl-Ala-Pro-Ala-7-amido-4-methylcoumarin in pH 6.2 universal buffer containing 10 mM DTT for 30 min at 25°C. All values were corrected for spontaneous hydrolysis by running identical samples without enzyme. Samples were assayed in duplicate with mean relative fluorescence units and their corresponding 0.5 range values given.

These were followed in effectiveness by calpain inhibitor (90%), chymostatin (90%), a mixture of PMSF and DFP (85%), the commercial PIN-II preparation (80%), a commercial PIN-I preparation (78%), PMSF (75%), potato cystatin (74%), E-64 (71%), hen's egg white cystatin (68%), and recombinant oryzacystatin (64%). Other materials ranged from 0–60% in inhibitory activity. Based on these data, it appeared that most of the proteolytic activity in the rootworm midgut was due to a mixture of both cysteine and serine proteinases with the former type being more predominant.

3.6. Identification of a PCPI-10' as a strong inhibitor of rootworm proteinases

As described in Section 2, PIN-II, a commercially available, heterogeneous preparation from potato tubers was fractionated by ion-exchange chromatography. The last of the five major peaks of protein to elute was a potent inhibitor of proteinase activity in rootworm gut extracts (Fig. 5). Amino acid sequence determination of the protein in this peak (Fig. 6) revealed a sequence that is very similar to previously sequenced inhibitors from

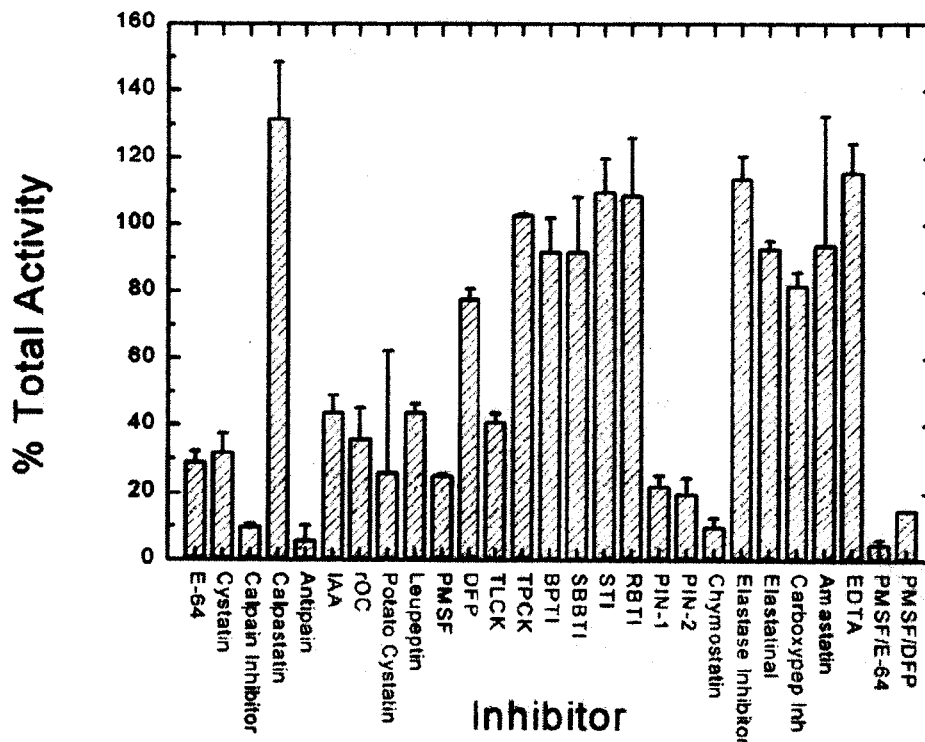


Fig. 4. Effects of 25 potential inhibitors on the caseinolytic activity in midgut extracts of artificial diet-fed southern corn rootworm. See Table 1 for abbreviations, source, and concentrations of potential inhibitors. Gut extract protein from diet-fed southern corn rootworm was assayed for ^{14}C -casein hydrolysis in Frugoni's universal buffer, pH 6.2 in the presence or absence of 25 potential inhibitors. Activity is expressed as percent inhibition of total activity without inhibitor. All samples were run in duplicate and corrected for spontaneous hydrolysis by running identical samples without enzyme. Error bars represent 0.5 range values for duplicate samples.

potato (for the first of these, see Yamagishi et al., 1991; Krizaj et al., 1993). Numerous sequences are now known for proteins in this family or variants of this protein. The sequence of the inhibitor as purified from the commercial PIN-II preparation is most similar to PCPI-10 (Gruden et al., 1997) and hence we have called our protein PCPI-10'. PCPI-10' is identical at 169 of the 179 corresponding positions in the translated amino acid sequence of PCPI-10 (Gruden et al., 1997). The molecular mass and pI of PCPI-10' are 20,162 Da and pH 8.62 for the form of PCPI-10' with Arg at position 131, where Pro is also found.

3.7. Comparison of inhibitor–titration curves

Fig. 7 shows dose–response curves for three of the proteinase inhibitors, E-64, hen's egg white cystatin, and our purified PCPI-10', on southern corn rootworm proteolytic activity using ^{14}C -casein as the substrate. The low-molecular-weight epoxy irreversible inhibitor, E-64, eliminated approximately 80% of the activity at about 1 μM concentration. Hen's egg cystatin was approximately four-fold less effective on a molar basis as an inhibitor. PCPI-10' was the most potent, with an IC_{50} of 31 nM, followed the irreversible inhibitor, E-64 (35 nM), and chicken egg white cystatin (121 nM).

3.8. Selective batch-adsorption of major proteinase in southern corn rootworm gut extract

Three proteinaceous inhibitors, the commercial PIN-II preparation (containing PCPI-10'), recombinant oryzacystatin, and hen's egg cystatin, were covalently attached to AffiGel 107 beads to determine whether they might be used for selective adsorption of the proteases in southern corn rootworm midgut extracts. Fig. 8 shows a densitometric gel scan analysis of a zymogram and demonstrates that, under these conditions, a component of PIN-II, presumably PCPI-10', selectively adsorbed the 25 kDa proteinase from the gut extract, whereas hen's egg cystatin and rOC adsorbed little or none of the proteinase. Apparently, only the enzyme complex with PCPI-10' was tight enough for effective adsorption from solution.

3.9. Feeding studies using PCPI-10'

Incorporation of PCPI-10' into artificial diets for southern corn rootworm showed marked effects on mortality and weight loss (Table 2). Rootworm larvae reared on diet containing 500-, 750-, and 1000-ppm PCPI-10' exhibited significantly higher mortality ($p < 0.030$) and weight loss ($p < 0.000$) compared to larvae reared on

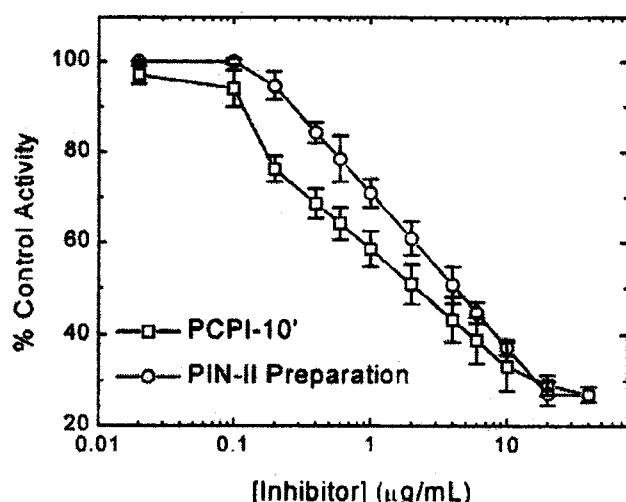


Fig. 5. Inhibitory potencies of the potato PIN-II preparation and a purified component, PCPI-10', of that preparation. The dose effectiveness of the crude PIN-II preparation and a purified component of PIN-II, PCPI-10', as inhibitors against artificial diet-fed southern corn rootworm gut proteolytic activity was monitored using FITC-labeled casein as a substrate. Then 1 μ g of gut extract protein was incubated with appropriately diluted PIN-II or PCPI-10' in pH 6.2 Universal buffer containing DTT at a final concentration of 12.5 mM for 15 min at 25°C. Final inhibitor concentrations were 0.02, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 1, 2, 4, 6, 10, 20, and 40 μ g/ml. The reactions were initiated by the addition of 25 μ g FITC-casein to the reaction mixture. Reactions were carried out for 30 min at 37°C. The reactions were stopped by the addition of TCA to precipitate unhydrolyzed FITC-casein and assayed for proteolytic activity as outlined in Section 2. Control activity was determined by running simultaneous reactions without inhibitor. All samples were run in duplicate and corrected for spontaneous hydrolysis by running identical samples without enzyme. Error bars represent 0.5 range values for duplicate samples.

1	LVLPEVYDQD	GNPLRIGERY	IKNPLLGGAG	30
31	AVYLDNIGNL	QCPNAVQLQM	SIPQFLGDGT	60
61	PVVFVRKSES	DYGDVRLMT	AVYIKFFVKT	90
91	TKLCVDQTVW	KVNDEQLVVT	GGKVGNNENDI	120
121	FKIRKIDLVT	RGMKNVYKLL	HCPSHLQCKN	150
151	IGSNFKNQYP	RLVTVNDDKD	FIPFVFIKA	179

Fig. 6. Amino acid sequence of the inhibitory component of PCPI-10'. The following regions of the sequence of the indicated fragments were sequenced (numbers refer to the positions in the protein, not in the fragments): 1–49, the intact protein; 1–20, a GluC fragment; 25–53, a LysC fragment; 51–67, a cyanogen bromide fragment; 59–66, a GluC fragment; 64–71, a secondary fragment released by CNBr cleavage; 68–84, a GluC fragment; 80–93, a cyanogen bromide fragment; 92–101, a LysC fragment; 101–137, a BNPS-skatole fragment; 123–131, a LysC fragment; 132–161, an ArgC fragment; 133–169, a cyanogen bromide fragment; 138–156, a LysC fragment; 157–170, a LysC fragment; 171–179, a LysC fragment. At position 131, proline is found in addition to Arg. An exhaustive set of overlaps was not obtained since the sequence exhibited such high sequence similarity to PCPI-10 and other members of that family. Differences with the PCPI-10 sequence are at positions 58 (D in PCPI-10'/K in PCPI-10), 65 (V/I), 97(Q/E), 104(D/N), 113(K/N), 124(R/K), 126(I/T), 130(T/I), 147(Q/E), and 168(D/E). The predicted molecular weight of the sequence we determined (20,182) agrees well with the molecular weight of the protein itself as determined by mass spectroscopy (20,130).

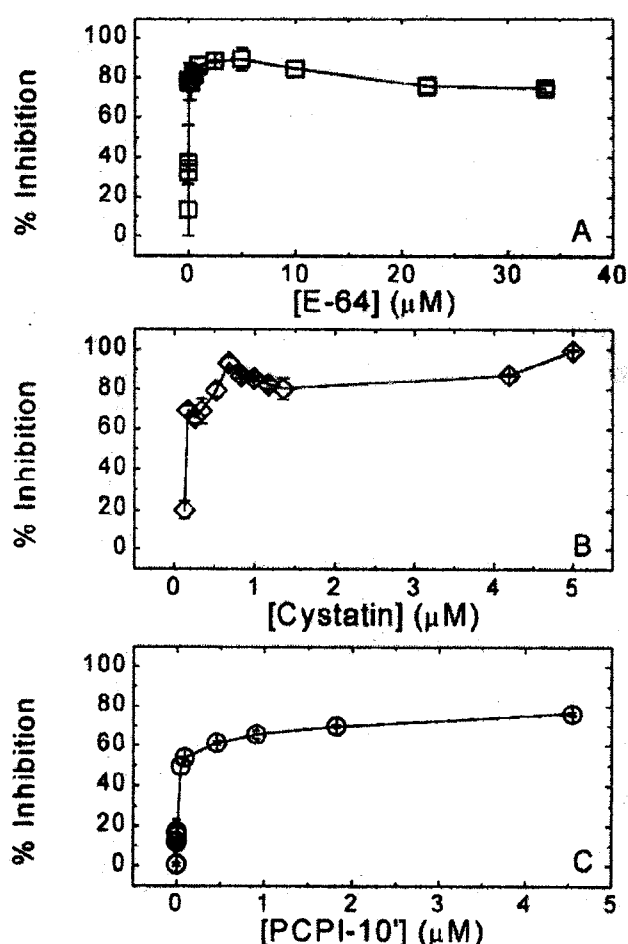


Fig. 7. Titration of 14 C-casein hydrolyzing activity in midgut extracts of artificial diet-fed southern corn rootworm by E-64 (A), chicken egg-white cystatin (B), and PCPI-10' (C). About 80–150 ng of total gut extract protein was allowed to incubate with different inhibitor concentrations at 25°C for 5 min before adding the 14 C-casein substrate. Assays were conducted as previously outlined in Section 2. The concentration range of inhibitors is as follows: 0–33.6 μ M E-64, 0–5 μ M hen's egg cystatin, and 0–4.5 μ M PCPI-10' from this study. All samples were run in duplicate and corrected for spontaneous hydrolysis. Error bars represent 0.5 range values for duplicate samples.

control media. PCPI-10' was considerably more potent on a mass basis than an unfractionated protein extract from potato, an effect most evident at the lowest levels examined in the diet (500 ppm, $p=0.002$). The protein extract fraction, which was also assayed and was more complex in composition than PIN-II, exhibited a somewhat unexpectedly high potency in this assay and may contain inhibitors other than PCPI-10'.

4. Discussion

Midgut proteinases are potentially good targets for genetically engineered enhanced resistance of plant species towards insects (for reviews see Jongsma et al.,

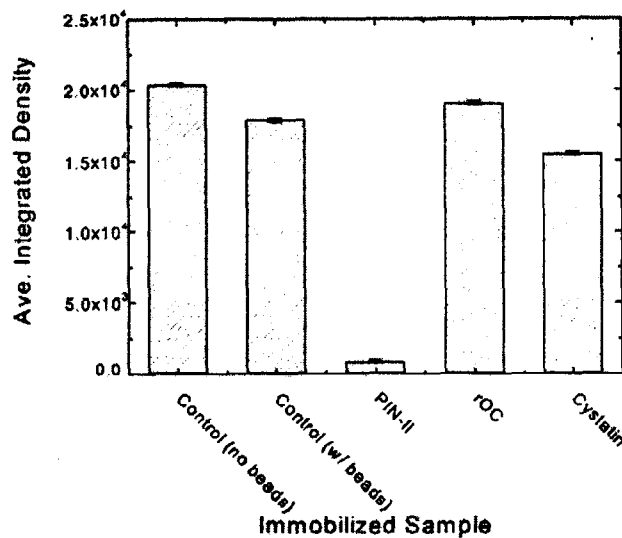


Fig. 8. Depletion of proteolytic activity in southern corn rootworm gut extracts by immobilized PIN-II, recombinant oryzacystatin and hen's egg cystatin. Then 10 µg of diet-fed southern corn rootworm gut extract was allowed to incubate with the inhibitor-bound beads for 30 min at 25°C. Unbound proteins were collected by centrifugation of resin. About 10 µl of the supernatants was diluted in SDS sample buffer and loaded onto a 12% SDS-PAGE zymogram gel. Electrophoresis and development of activity bands was conducted as outlined in Section 2. Each bar represents the mean of six gel scans.

Table 2
Effect of potato extract and PCPI-10' on southern corn rootworm growth and mortality

Additive	Treatment level (ppm)	Mortality (%) ^a	Weight loss (%) ^a
PCPI-10'	1000	57.0±0.0 a	86.0±3.0 a
	750	39.5±10.5 a,b	78.0±5.0 a,b
	500	28.5±7.5 b,c,d	61.5±0.5 b,c
Protein extract	1000	43.0±0.0 a,c	67.0±1.0 a,c
	750	17.5±3.5 b,d,e	62.0±8.0 b,c
	500	14.0±0.0 d,e	32.0±1.5 d
Buffer control	–	3.5±3.5 e	19.0±2.0 d

^a Larval mortality and weight loss determined seven days after placement on test diets. Mean values±SE based on two replicates of n=14 insects per treatment. Data with the same letter were not significantly different (α=0.05) as determined by the Tukey HSD multiple comparison test.

1997; Reeck et al., 1998; Gatehouse and Gatehouse, 1998). Insects typically contain complex mixtures of classes and families of enzymes in their midguts. A well-informed attempt at genetic engineering of plant-resistance would include, as a first step, the identification of major proteases in the insect of interest and of inhibitors of them. It is with that perspective in mind that we have undertaken studies of midgut proteinases of the southern and western corn rootworms.

Murdock et al. (1987) first demonstrated the presence of cysteine proteinase activity in the southern corn root-

worm. Subsequently, two other groups evaluated the potency of several kinds of proteinase inhibitors towards the midgut fluid proteinases from the southern (Purcell et al., 1992) and western (Gillikin et al., 1992) corn rootworms and identified inhibitors of cysteine proteinases (particularly E-64 and cystatins) as the most potent inhibitors. Edmonds et al. (1996) showed that not only E-64 but also chicken egg-white cystatin and oryzacystatin were strong inhibitors in vitro, and that the latter protein, when incorporated into an artificial diet at concentrations of ≥10 mM, caused significant decreases in larval survival and weight gain of *D. undecimpunctata*. Zhao et al. (1996) reported that the two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors were more effective in vitro against gut cysteine proteinases of western corn rootworms than either a constitutive homologue or E-64. Our data are consistent with those earlier results in that we too have found that cysteine proteinase activity is the major class of proteolytic activity in southern corn rootworm midgut extracts. In our case, much of that activity appears to reside in a single enzyme and that enzyme has specificity for positively charged side chains in its substrates. Beyond that, we have identified a particularly strong inhibitor of this cysteine proteinase in the form of a potato protein, PCPI-10'.

In the work reported here, we have found that a single proteinase or at least a single proteinase activity band is responsible for most of the protease activity against casein and a synthetic substrate that has arginine at the P1 position. This proteinase has an apparent mass of about 25 kDa. Based on the compounds and proteins that inhibit it, the enzyme can be classified as a cysteine proteinase with a preference for basic amino acid residues at the P1 site. It would appear to be a good target for genetically engineered increased resistance in corn towards attack by corn rootworms.

We have also identified a rather potent inhibitor of this enzyme. This inhibitor from potato has been purified and its amino acid sequence determined. It is a member of a closely related group of inhibitors called PCPI-10'. There are several members of this family or variants of the protein, and we have worked with only the variant or form as isolated from a commercial preparation of the potato proteins. The form we have isolated, which we have called PCPI-10' based on its strong similarity in sequence to PCPI-10, is a good candidate to be used for enhancing the resistance of corn to rootworm attack.

Besides its very strong sequence similarity to other PCPIs, the PCPI-10' sequence also exhibits sequence similarity to several functionally distinct inhibitors (Krizaj et al., 1993; Gruden et al., 1997) and to storage proteins. Homology (co-ancestry) with these proteins is a reasonable postulate or presumption, and it can be assumed that PCPI-10' has a three-dimensional structure similar to two of these presumed homologues, Kunitz soybean trypsin inhibitor (Song and Suh, 1998) and a

bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor from barley seeds (Vallee et al., 1998), for which three-dimensional structures are available. Other homologues, including cathepsin D (an aspartyl proteinase) inhibitors from potato (Maganja et al., 1992) and sporamin, a storage protein that accounts for up to 90% of the protein mass in potato (Hattori and Nakamura, 1988), can similarly be presumed to adopt a similar folding pattern. It is quite remarkable that a single protein architecture or scaffold has found application in the course of evolution as both a storage protein and as an inhibitor of no less than five different families of hydrolytic enzymes (two families of serine proteinases as well as cysteinyl proteinases, aspartyl proteinases and α -amylases). The binding sites on the scaffold for α -amylase and subtilisin are, not surprisingly, distinct (Vallee et al., 1998). It will be most interesting to extend that sort of comparison to the binding sites on the scaffold for both aspartyl proteinases and cysteinyl proteinases. Given the rather different catalytic mechanisms of these enzymes, it would not be surprising for their inhibitors' binding sites to be at still different locations on the scaffold although that is by no means necessary. But even with what is known at this point, it appears that nature has been very resourceful in developing a variety of functions based on this single protein fold or scaffold.

Many other coleopteran species are also known to utilize the cysteine proteases rather than serine enzymes as the major class of midgut proteinase activity (Murdock et al., 1987; Thie and Houseman, 1990; Michaud et al., 1996). The majority of gut proteolytic activity for southern corn rootworm second instar larvae appears to be cysteine proteases (Orr et al., 1994). Both proteinaceous and nonproteinaceous inhibitors of cysteine proteinase retard the growth and development of several coleopterans, including rootworm species (Murdock et al., 1987; Hines et al., 1990; Liang et al., 1991; Oppert et al., 1993; Orr et al., 1994). Our results are consistent with these earlier studies and begin to more thoroughly characterize perhaps the major individual cysteine proteinase and a potent proteinaceous inhibitor of it.

Acknowledgements

Tom Czapla, our friend as well as collaborator and co-author, died tragically at a young age on 21 January, 2000. Cooperative investigation between the USDA and Kansas State University (Contribution No. 01-157-J from the Kansas Agricultural Experiment Station). Mention of a proprietary product does not constitute a recommendation by the USDA. The Agricultural Research Service, USDA, is an equal opportunity/affirmative action employer, and all agency services are available without discrimination. This work was supported by the Kansas Agricultural Experiment Station and by a grant

to G.R.R. and K.J.K. from Pioneer Hi-Bred International.

References

- Anonymous, 1998. North Carolina Agricultural Chemicals Manual Internet version: <http://ipmwww.ncsu.edu/agchem/agchem.html>.
- Chen, M.S., Johnson, B., Wen, L., Muthukrishnan, S., Kramer, K.J., Morgan, T.D., Recek, G.R., 1992. Rice cystatin: bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibiting activity and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. *Protein Expr. Purif.* 3, 41–49.
- Czapla, T.H., Lang, B.A., 1990. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (*Lepidoptera*: Pyralidae) and southern corn rootworm (*Coleoptera*: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 83, 2480–2485.
- Cloutier, C., Fournier, M., Jean, C., Yelle, S., Michaud, D., 1999. Growth compensation and faster development of Colorado potato beetle (*Coleoptera*: Chrysomelidae) feeding on potato foliage expressing oryzaecystatin I. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 40, 69–79.
- Cloutier, C., Jean, C., Fournier, M., Yelle, S., Michaud, D., 2000. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata*, compensate for nutritional stress on oryzaecystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 69–81.
- Delledonne, M., Allegro, G., Belenghi, B., Balestrazzi, A., Picco, F., Levine, A., Zelascio, S., Calligaris, P., Confalonieri, M., 2001. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Mol. Breed.* 7, 35–42.
- Edmonds, H.S., Gatehouse, L.N., Hilder, V.A., Gatehouse, A.M., 1996. The inhibitory effects of cysteine protease inhibitor, oryzaecystatin, on digestive proteases and on larval survival and development of the southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*). *Entomol. Exp. Appl.* 78, 83–94.
- Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M.G., 1997. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. *Nat. Biotechnol.* 15, 137–141.
- Frugoni, J., 1957. Tampone universale di Britton e Robinson a forza ionica costante. *Gazzeta Chimica Italiana* 87, 403–407.
- Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A., 1998. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pestic. Sci.* 52, 165–175.
- Gillikin, J.W., Bevilacqua, S., Graham, J.S., 1992. Partial characterization of digestive tract proteinases from western corn rootworm larvae, *Diabrotica virgifera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 19, 285–298.
- Gruden, K., Strukelj, B., Ravnikar, M., Poljsak-Prijatelj, M., Mavric, I., Brzin, J., Pungercar, J., Kregar, I., 1997. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterisation and immunocytochemical localisation studies. *Plant Mol. Biol.* 34, 317–323.
- Hattori, T., Nakamura, K., 1988. Genes encoding for the major tuberous root protein of sweet potato: identification of putative regulatory sequence in the 5' upstream region. *Plant Mol. Biol.* 11, 417–426.
- Heussen, C., Dowdle, E.B., 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102, 196–202.
- Hilder, V.A., Boulter, D., 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance — a critical review. *Crop Prot.* 18, 177–191.
- Hines, M.E., Nielsen, S.S., Shade, R.E., Pomeroy, M.A., 1990. The effect of two proteinase inhibitors, E-64 and Bowman-Birk trypsin

- inhibitor, on the developmental time and mortality of *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Entomol. Exp. Appl.* 57, 201–207.
- Jongsma, M.A., Stiekma, W.J., Bosch, D., 1997. Combating inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *Trends Biotechnol.* 15, 331–333.
- Kiowa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., D'Urzo, M.P., Murdock, L.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 2000. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive proteinases (DvCALs) in the larval midgut of the western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBS Lett.* 47, 67–70.
- Krizaj, I., Drobnic-Kosorok, M., Brzin, J., Jerala, R., Turk, V., 1993. The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Lett.* 333, 15–20.
- Lecardomel, A., Chauvin, L., Jouanin, L.O., Beaujean, A., Prevost, G., Sangwan-Norreel, B., 1999. Effect of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.* 140, 71–79.
- Leple, J.C., Bonade Bottino, M., Augustin, S., Pilate, G., Dumanois Le Ran, V., Delplanque, A., Cornu, D., Jouanin, L., 1995. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol. Breed.* 1, 319–328.
- Liang, C., Brookhart, G., Feng, G.H., Reeck, G.R., Kramer, K.J., 1991. Inhibition of digestive proteinases of stored grain Coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. *FEBS Lett.* 278, 139–142.
- Maganja, D.B., Strukelj, B., Pangercar, J., Gubensek, F., Turk, V., Kregar, I., 1992. Isolation and sequence analysis of the genomic DNA fragment encoding an aspartic proteinase inhibitor homologue from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Mol. Biol.* 20, 311–313.
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Vrain, T.C., Fong, D., Yelle, S., 1996. Response of digestive proteinases from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and black vine beetle (*Ottorynchus sulcatiss*) to a recombinant form of human stefin A. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 451–464.
- Michaud, D., Vrain, T.C., 1998. Expression of recombinant proteinase inhibitors in plants. In: Cunningham, C., Porter, A.J.R. (Eds.), *Methods in Biotechnology. Vol. 3: Recombinant Proteins from Plants: Production and Isolation of Clinically Useful Compounds*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 49–64.
- Murdock, L.L., Brookhart, G., Dunn, P.E., Foard, D.E., Kelley, S., Kitch, L., Shade, R.E., Shukle, R.H., Wolfson, J.L., 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 783–787.
- Oppert, B., Morgan, T.D., Culbertson, C., Kramer, K.J., 1993. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 379–385.
- Orr, G., Strickland, J., Walsh, T., 1994. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by a multicystatin from potato tubers. *J. Insect Physiol.* 40, 893–900.
- Purcell, J.P., Greenplate, J.T., Sammons, R.D., 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 41–47.
- Reeck, G., Oppert, B., Denton, M., Kanost, M., Baker, J., Kramer, K., 1998. Insect proteinases. In: Turk, V. (Ed.), *Proteinases: New Perspectives*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 125–148.
- Sasaki, T., Kikuchi, T., Yumoto, N., Yoshimura, N., Murachi, T., 1984. Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J. Biol. Chem.* 259, 12489–12494.
- Song, H.K., Suh, S.W., 1998. Kunitz-type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina cuffra* and tissue-type plasminogen activator. *J. Mol. Biol.* 275, 347–363.
- Thie, N.M.R., Houseman, J.G., 1990. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochem.* 20, 313–318.
- Vallee, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, K.W., Svensson, B., Haser, R., 1998. Barley alpha-amylase bound to its endogenous protein inhibitor BAI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution. *Structure* 6, 649–659.
- Wilkinson, L., 1989. SYSTAT: The System for Statistics. SYSTAT, Inc., Evanston, IL.
- Yamagishi, K., Mitsumori, C., Kikuta, Y., 1991. Nucleotide sequence of a cDNA encoding the putative trypsin inhibitor in potato tuber. *Plant Mol. Biol.* 17, 287–288.
- Zhao, Y., Botella, M.A., Subramanian, I., Niu, X., Nielsen, S.S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1996. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiol.* 111 (4), 1299–1306.

Anexo B

Comparación de índices hidropáticos de las secuencias de la horquilla 1 α 3,4 de Cry3Bb nativa y Cry3Bb11221 del documento D1 y Cry3A y Cry3A055 de la presente solicitud.

	Cry3Bb nativa							Cry3Bb11221 de D1							
Secuencia de la horquilla 1 α 3,4	T	P	L	S	L	R	S	F	H	H	S	R	R	S	
Índice hidropático (D1, p. 56)	-0.7	-1.6	+3.8	-0.8	+3.8	-4.5	-0.8	+2.8	-3.2	-3.2	-0.8	-4.5	-4.5	-0.8	
Total	-1.2							-1.2							
	Cry3A nativa							Cry3A055 de la solicitud							
Secuencia de la horquilla 1 α 3,4	N	P	V	S	S	R	N	N	P	A	A	P	F	R	N
Índice hidropático (D1, p. 56)	-3.5	-1.6	+4.2	-0.8	-0.8	-4.5	-3.5	-3.5	-1.6	+1.8	+1.8	-1.6	+2.8	-4.5	-3.5
Total	-11.1							-10.5							

Anexo A: Resultado de Alineamientos

Alineamiento: Alineamiento proteico global contra una proteína de referencia

Parámetros: Matriz de puntaje: BLOSUM 62

Molécula de Referencia: Cry3A, Región 1-644

Número de secuencias alineadas: 2

Pos	Secuencia	Inicio	Final	Longitud	Identities	%Identities
Ref 1	Cry3A	1	644	644 aa		
2	Cry3Bb	1	652	652 aa	446	68
Cry3A	1	MNPNNRSEHDTIKTTENNEVPTNHVQYPLAETPNPTLEDLNYKEFLRMTADNNTEALDSS				
Cry3Bb	1	V.P.S.LQ...N.....DN..S...E.....E.SS..V..N.				
Cry3A	61	TTKDVQKGISVVGDLGVLGVPFGGALVSFYTNFLNTIWPSE-DPWKAFMEQVEALMDQ				
Cry3Bb	61	.V..AVGT.....QI.....V..A...T...QS.....DA.....A...V.I.K				
Cry3A	120	KIADYAKNKALAEQLQNNVEDYVSALSSWQKNPVSSRNPHSQGRIRELFSQAESHFRN				
Cry3Bb	121	..EE...S.....F....N..N..K.T.L.L.SKR..D.....				
Cry3A	180	SMPFSAISGYEVLFTTYAQANTHLFLKDAQIYGEEWGYEKEDIAEFYKRLKLTQEY				
Cry3Bb	181	V.KF.....P.....L.....VF.....SS..V....H.....Q.				
Cry3A	240	TDHCVKWYNVGLDKLRGSSYESWVNFNRYRREMTLTVDLIALFLYDVRLYPEVKTEL				
Cry3Bb	241	N.....NG...T.DA..K...F.....V...F..I...S.G.....				
Cry3A	300	TRDVLTDPIVGNNLRGYGTTFSNIENYIRKPHLFDYLHRIQFHTRFQPGYYGNDSEFNYW				
Cry3Bb	301	...IF....FSL.T.QE..P..LS...S.....QG.E....L....F.K.....				
Cry3A	360	SGNYVSTRPSIGSNDIITSPPFYGNKSSEPQNLFEFNGEKVYRAVANTNLAVWPSA-VYSG				
Cry3Bb	361	E.....SKT.....D..T...K.S.D.Q....TI...DV.A..NGK..L.				
Cry3A	419	VTKVEFSQYNDQTDASTQTYDSKRVGAVS-WDSIDQLPPETTDEPLEKGYSHQLNYVM				
Cry3Bb	421	D....D..KN.T.....N.H..AQ.....A.....AE				
Cry3A	478	CFLMQGSRGTIPVLTWTHKSVDFFNMIDSKKITQLPLVKAYKLSGASVVGPRFTGGDI				
Cry3Bb	481	DR.....FF....R.....T..AE.....V....A.S....IE..G....NL				
Cry3A	538	IQCTENG-SAATIIYVTPD-VSYSQKYRARIHYASTSQITFTLSLDGAPFNQYFDTKINK				
Cry3Bb	541	LFLK.SSN.I.KFK..LNSAALL.R..V..R...TNLRLFVQNSNND.LVI.IN..M..				
Cry3A	596	GDTLTYSNLFASFSTPFELSG--NNLQIGVTGLSAGDKVYIDKIEFIPVN-				
Cry3Bb	601	D.D...QT.D..TTNSNMGF..DK.E.I..AESFVSNE.I.....QL				

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

Abogado
MARGARITA CASTELLANOS

ASUNTO	Radicación	04-17803
	Trámite	002
	Evento	001
	Actuación	430
	Oficio	
	Folios	3 08166

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

1. Documentos estudiados

Descripción: Folios: 101 a 175 como se radicó inicialmente

Reivindicaciones: 1 a 105 Folios 176 a 192 como se radicó inicialmente
1 a 31, Folios 465 a 472 modificadas el 28/01/2008

Secuencias: Folios 194 a 276 como se radicó inicialmente

Prioridad: US 60/316421 de 31 de agosto de 2008

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: **"Toxinas de CRY3A modificadas y secuencias de ácido nucleico que las modifican".**

La presente solicitud se refiere a una molécula de toxina Cry3A modificada la cual presenta un sitio de reconocimiento de proteasa no natural y puede estar situado en cualquiera de las posiciones a) 107-115, b) 532-542, c) 107-115 y 532-542 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a CRY 3A denominada SEQ ID No 4. Dicho sitio de reconocimiento de proteasa es reconocible por una proteasa intestinal (cathepsina G) del gusano de la raíz del maíz del oeste y donde dicha toxina modificada causa una mortalidad más elevada en el gusano. La toxina modificada puede presentar cualquiera de las secuencias SEQ ID No 7, SEQ ID No 9, SEQ ID No 11, SEQ ID No 13, SEQ ID No 15, SEQ ID No 17, SEQ ID No 19, SEQ ID No 21. Dentro de la presente solicitud se reclaman los vectores que comprenden la anterior molécula de proteína, la secuencia de DNA que la codifica, la célula transformada con el mismo. De igual forma se reivindican las composiciones que comprenden la toxina, los métodos para el control del gusano, los métodos para la obtención de plantas transgénicas, para la expresión de la toxina etc...

IPC: C12N 15/31, 15/82, C07K 14/325, A61K 31/713.

3. De la solicitud de Patente

3.1. Reivindicaciones (artículo 30 D 486)

El capítulo reivindicatorio carece de claridad y concisión por cuanto:

- El capítulo comprende un número alto de reivindicaciones que repiten innecesariamente materia o que tienen el mismo alcance. Hay varias reivindicaciones que tienen en su parte caracterizante las misma característica técnica y solo difieren en el preambulo de las mismas, esto hace que la materia que se desea proteger sea descrita por características que no son apropiadas. Por ejemplo se caracteriza genes por las secuencias aminoácidas y con esa misma secuencia ya se había caracterizado la toxina modificada (proteína). Esto aplica para los grupos de reivindicaciones: a) 1, 3, 11, 17; b) 2, 12; c) 4, 5; d) 7, 13, 18; e) 8, 14.
- Algunas reivindicaciones caracterizan la materia por el resultado a alcanzar, como son las reivindicaciones: 6, 20.
- De acuerdo con el capítulo descriptivo y la respuesta dada por el solicitante, la invención se caracteriza porque se aplica para el control de plaga del gusano de raíz del oeste. Sin embargo, a lo largo del capítulo reivindicatorio se mencionan varios tipo de gusano, como son el gusano de la raíz del maíz del norte (reivindicaciones 8 y 14) y gusano de la raíz del maíz del oeste. Dada la variabilidad que existe en el sistema digestivo de estos gusanos, tal como lo argumenta el solicitante con las diferencias existentes entre el gusano del oeste y el del sur, y de acuerdo con la información divulgada en la descripción se solicita aclarar a que tipo de insecto se aplica la invención.
- Algunas reivindicaciones cuyo preambulo se refiere a un método, en realidad se refieren es al uso de la invención. No por el hecho de que el preambulo se refiera a un método, se convierte en un procedimiento, puesto que este se caracteriza por una secuencia de etapas para llevar a cabo la invención. En cambio, estas reivindicaciones solo se refieren a poner en contacto la invención con el sustrato blanco de la misma (reivindicaciones 21, 24).
- La reivindicación 28 carece de sustento, puesto que el único tipo de células que se utilizaron como células huésped fueron células bacteriales y células de raíz de la misma planta.
- La composición a la que se refiere la reivindicación 31 carece de sustento, puesto que no se preparó ni probó ninguna composición que contenga la toxina modificada. Además esta composición no esta definida a partir de los elementos que la componen y concentraciones de los mismos, sino que se define a partir del resultado a alcanzar.
- No se puede establecer que todas las endotoxinas modificadas exhiben un efecto inesperado, es por ello que se recomienda eliminar de la reclamación aquellas moléculas que ni siquiera fueron evaluadas.

De esta manera el capítulo reivindicatorio presentado no cumple con los requisitos estipulados en el artículo 30 de la D486.

4. Determinación del Estado de la Técnica

Considerando que la fecha de presentación de la primera solicitud de patente de la cual se reivindica prioridad es: 31 de agosto de 2001, se buscaron documentos del estado de la técnica relacionados, con fecha de publicación anterior a esta.

N°	Documento	Título	Fecha de Publicación*
D1	WO9931248	INSECT-RESISTANT TRANSGENIC PLANTS AND METHODS FOR IMPROVING delta -ENDOTOXIN ACTIVITY AGAINST TARGET INSECTS	1999-06-24
D2	US6063597	Polypeptide compositions toxic to coleopteran insects	2000-05-16

5. Análisis de patentabilidad (según requisito) (artículo 14 D486)

5.1. Nivel inventivo (artículo 18 D486)

Las reivindicaciones 1 y dependientes se refieren a una molécula de ácido nucleico que codifica para Cry3A modificada la cual presenta un sitio de reconocimiento de proteasa no natural y puede estar situado en cualquiera de las posiciones a) 107-115, b) 532-542, c) 107-115 y 532-542 de la secuencia de aminoácidos correspondiente a CRY 3A denominada SEQ ID No 4. Dicho sitio de reconocimiento de proteasa es reconocible por una proteasa intestinal (catepsina G) del gusano de la raíz del maíz del oeste y donde dicha toxina modificada causa una mortalidad más elevada en el gusano.

Sobre, el análisis de nivel inventivo se mantienen las observaciones hechas en el concepto técnico N° 1730 de 05/10/2007, respecto a los dos documentos que afectarían el nivel inventivo de la solicitud. Se llama la atención al solicitante puesto que en su respuesta de 03/01/2008 **no se refirió al documento D2.**

6. Conclusión:

Los requisitos de patentabilidad de la presente solicitud se encuentran afectados así:

N°	Documento N°	Reivindicaciones Afectadas	Requisito que Afecta
D1	WO9931248	1 a 31	Nivel Inventivo
D2	US6063597	1 a 31	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la resolución reglamentaria No. 00210 del 15 de enero de 2001, advirtiéndole que contra él no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de División de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 17 JUL. 2009

CONCEPTO TECNICO No. 2067	EXAMINADOR TECNICO Código No.202052
-------------------------------------	---

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION Nº 58196.

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. PCT/04-17803

RESUELVE:

ARTICULO PRIMERO: Negar el privilegio de patente de invención para la solicitud correspondiente a "TOXINAS DE CRY3A MODIFICADAS Y SECUENCIAS DE ACIDO NUCLEICO QUE LAS MODIFICAN", que entró en fase nacional en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT).

ARTICULO SEGUNDO: Notificar personalmente el contenido de la presente resolución a la doctora Margarita Castellanos Abondano, en su calidad de apoderada de SYNGENTA PARTICIPATIONS AG., o a quien haga sus veces, entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición interpuesto ante el Superintendente de Industria y Comercio, al momento de la notificación o dentro de los 5 días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CUMPLASE
Dada en Bogotá, D.C., a los

17 NOV. 2009

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,



GUSTAVO VALBUENA QUIÑONES

Doctora
MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Calle 94 A No. 7A-09
Bogotá D.C.

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCION Nº 58196

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. PCT/04-17803

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las que se confirieron en el artículo 3, numeral 30 del decreto 3523 de 2009, y

CONSIDERANDO:

PRIMERO: Que la solicitud de patente de invención titulada "TOXINAS DE CRY3A MODIFICADAS Y SECUENCIAS DE ACIDO NUCLEICO QUE LAS MODIFICAN", que corresponde a la solicitud internacional PCT/US2001/029613 de fecha 21 de septiembre del 2001, fue radicada en esta Superintendencia el 27 de febrero del 2004 bajo el número 04-017803 00000-0000, para que se dé comienzo a la fase nacional en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT).

SEGUNDO: Que efectuado el examen de forma en cuanto a los requisitos que debe llenar la solicitud y cumplidas las exigencias legales, se ordenó publicar el extracto sin que se hubieran presentado oposiciones por parte de terceros.

TERCERO: Que el artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina establece que: *"Si la oficina nacional competente encontrara que la invención no es patentable o que no cumple con alguno de los requisitos establecidos en esta Decisión para la concesión de la patente, lo notificará al solicitante. Este deberá responder a la notificación dentro del plazo de sesenta días contados a partir de la fecha de la notificación. Este plazo podrá ser prorrogado por una sola vez por un período de treinta días adicionales.(...) Si el solicitante no respondiera a la notificación dentro del plazo señalado, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, la oficina nacional competente denegará la patente"*.

CUARTO: Que realizado el examen de fondo, se requirió al solicitante en los términos del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, para que presentara respuesta a las observaciones de carácter técnico visibles a folios 486 a 488 del cuaderno administrativo, relacionadas con la patentabilidad o cumplimiento de los requisitos establecidos por esta Decisión para la concesión de la patente. Frente a dicho requerimiento no hubo pronunciamiento alguno por parte del solicitante, por lo cual es procedente negar el privilegio de patente solicitado con fundamento en lo dispuesto en el artículo 45 de la Decisión 486.