

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO TOXINAS CRY INSECTICIDAS DIG-3

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaguén

22. BOGOTÁ, D. C., _____

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156684- -00000-0000

Fecha: 2011-11-17 12:32:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **DOW AGROSCIENCES LLC**
Sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América.Dirección: 9330 Zionsville, Road,
Indianápolis,
Indiana 46268-1054,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Indianápolis,
Indiana
Estados unidos de América**IDENTIFICACIÓN**

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. Justin LIRA

12373 Ensley Drive,
Fishers,
Indiana 46038,
Estados Unidos de América

3. Doug SMITH

19038 Edwards Grove Drive,
Noblesville,
Indiana 46062
Estados Unidos de América

5. Thomas MEADE

1141 Huntington Woods Pointe,
Zionsville
Indiana 46077
Estados Unidos de América

2. Holly BUTLER

1106 Fairway Drive,
Indianapolis,
IN 46260
Estados Unidos de América

4. Kenneth NARVA

4372 Creekside Pass,
Zionsville,
Indiana 46077
Estados Unidos de América

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/US2010/028381Fecha: 24 de marzo 2010Publicación Internacional No. WO2010/120452 A1Fecha: 21 de Octubre de 2010

6

Título (54)**TOXINAS CRY INSECTICIDAS DIG-3**

2

7

Clasificación Internacional (51) C07K 014/325

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐US17 de Abril de 200961/170,189

9

Comprobante de pago No.: 11-108557**Fecha: 08 de Noviembre de 2011****Comprobante de pago No.: 11-108499****Fecha: 08 de Noviembre de 2011****Comprobante de pago No.: 11-108500****Fecha: 08 de Noviembre de 2011****Comprobante de pago No.: 11-103492****Fecha: 21 de Octubre de 2011**

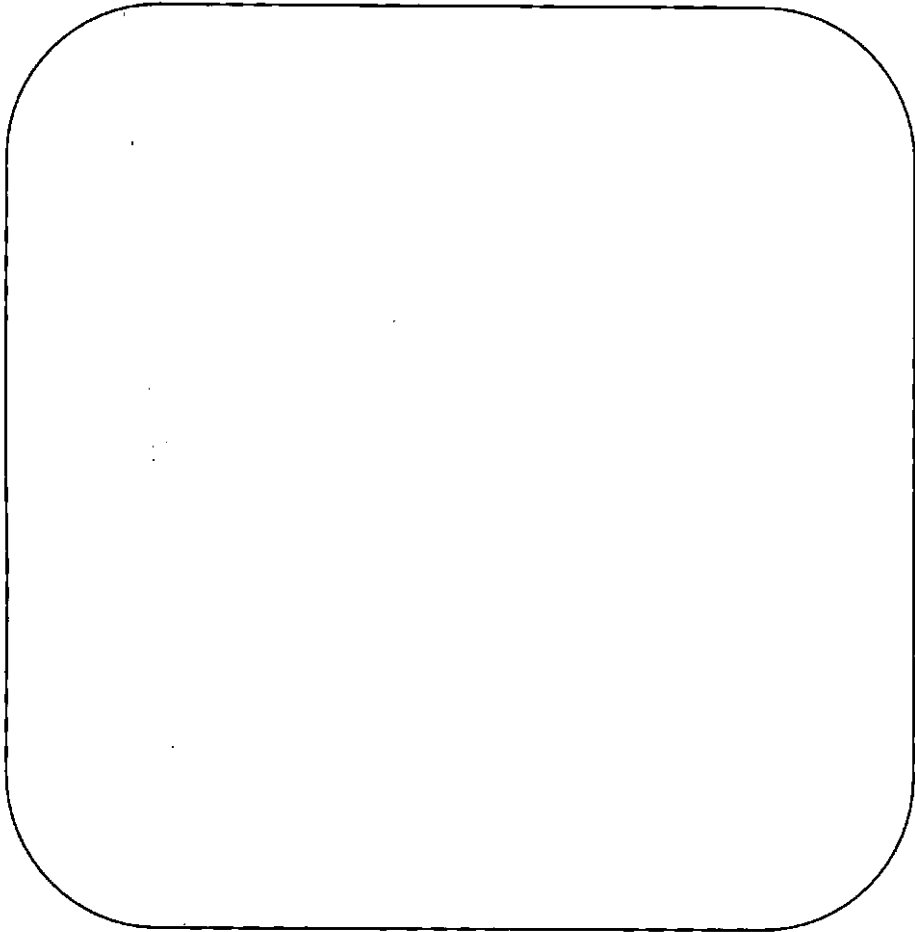
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00
- ☒ Comprobante de pago por 3 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$81.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poder de **DOW AGROSCIENCES LLC.**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2010/120452 A1.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia De Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/120452 A1

Descripción:

Páginas 59 en español

Reivindicaciones: Número (s) 13

Figuras: Número (s)

2. ☒ Forma **PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Listado de Secuencias.
4. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, 6 - COLOMBIA

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseññas, lemas comerciales.

REPRESENTATION, RATIFICATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (s)
Dow AgroSciences LLC

of/domiciliado (s) en 9330 Zionsville Road,
Indianapolis, Indiana 46268, United
States of America,

por el presente ratificamos la _____

presentada por _____
como agente oficioso ante _____

en _____

el _____
y por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa.
31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados
en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a
lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de
Comercio, el primero como principal y los demás como
suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en
todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para
recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o
extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al
principal en caso de ausencia o impedimento temporal o
definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el
segundo representante suplente haya de reemplazar al primero,
o el tercero al segundo. En tales casos, el representante
principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos,
declararán su intención de no ejercer la representación
ante declaración autenticada por Notario Público en
Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul
de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento,
con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare
definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la
ausencia o impedimento del representante principal, o de su
primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la
representación, en su orden, uno u otros según el caso,
asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese
momento el ejercicio de la representación por el primero,
segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba
nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra)
propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo
efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me
(nos) representen ante cualesquiera entidades o personas,
ejerczan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden
administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como
los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los
siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención,
modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas
de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales,
nombres comerciales, enseññas, variedades vegetales y
denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de
nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de
licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de
competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u
observaciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad,

hereby ratify the _____

filed without a Power of Attorney by _____

before _____

in _____

on _____

and do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832;
GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa.
31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled
at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, in due compliance
with the terms of Paragraph 1st. of Article 543 of the
Commercial Code, the first as principal and the others as
alternates, in the order of their appointment, as our
representatives for all industrial property matters with faculty
to receive notifications and to appoint attorneys in and out of
Court. The first alternate shall replace the principal in case of
his absence or of temporal or definitive impediment. The same
rule will apply when the second alternate is to replace the first or
second alternate in their turn, or both of them, second. In such
cases, the principal representative, or the first or second
alternate, shall state their intention to act as representatives through a declaration
given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or
another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in
case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If
any of the above-named attorneys are absent, the following alternate shall take their place when the absence or
impediment of the principal representative, or of the first or
second alternate in their turn, shall be the case, the representation can be
taken again in their sequence by the principal, the first or
second alternate depending on the facts of the case and its
exercise will suffice. The exercise of the representation by the
first, second or third alternates shall end at such
time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the
above-named attorneys-at-law, so that they may obtain the
protection of my (our) industrial property and against the
unfair competition, for which purpose (we) authorize the said
attorneys to represent me (us) before any authorities or persons,
with or without jurisdiction, specially those administrative,
administrative contentious and judicial, as well as before
Arbitration Court, in all matters concerning the following: a)
Obtainment of patents, utility models and industrial designs;
the registration of trademarks, collective, defensive and service
marks, slogans, commercial names, trade emblems, and vegetal
varieties and denominations of origin; its renewal, assignment,
change of name or domicile, voluntary cancellation; and the
registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of

A la vuelta →

Over →

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA



medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy _____

February 6, 1978

in/en Indianapolis, Indiana 46268

United States of America

Kenneth L. Loertscher Firma

Signature
Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary
& General Patent Counsel





Consulado General de Colombia

500 NORTH MICHIGAN AVENUE, SUITE 2040
CHICAGO, ILLINOIS 60611

TEL (312) 923-1196 FAX (312) 923-1197

No. 254

Chicago, FEB 20 1998

El suscrito Cónsul General de Colombia, CERTIFICA, que el señor (a)
MARY REEVER, quien como

SECRETARIA DELEGADA ESTADO, IN., autenticó la
firma del signatario del poder precedente, ejercía en la fecha las
funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este
Consulado; que la compañía DOW AGROSCIENCES LLC
es una sociedad constituida de acuerdo con las leyes de
DELAWARE y cumple su objeto conforme a las mismas;
que el (a) señor (a) KENNETH L. WERTSCHER,
quien en su carácter de REPRESENTANTE LEGAL
de la citada compañía confiere el poder precedente, es su
representante legal en este país.

El Cónsul General no asume responsabilidad alguna por el contenido
del documento.

PAGADO IMPUESTO DE TIMBRE Y DERECHOS CONSULARES
US\$56.00 (Cincuenta y seis dólares)

CARLOS ALFONSO NEGRETE
Cónsul General de Colombia

NOTARIO ENCARGADO
09 NOV 2011
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
COPIA CONSTA QUE LA FOTOCOPIA CONCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

UNITED STATES OF AMERICA
CERTIFICATE OF OFFICE
STATE OF INDIANA

REPUBLICA DE COLOMBIA
Jaime Vargas
NOTARIO ENCARGADO
NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA

Sue Anne Gilroy

Secretary of State of Indiana, Do

according to records on file in my office, Lydia S. Owens was duly elected

or appointed to the office of Notary Public in and for Hendricks County

and that the term of said office included the date of February 6, 1998: that to all his/her official acts as said offi-

cial, full faith and credit ought to be given in all Courts of

Justice and elsewhere. In testimony whereof, I have here unto

set my hand and affixed the Great Seal of the State of Indiana,

at Indianapolis, this Tenth day of

February, 1998

Secretary of State

by:
Deputy



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 11:55

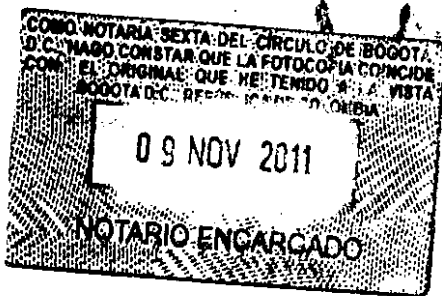
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Carlos
221220

AFIJAMIENTO DE LA PAREJA EN EL
DOCUMENTO DESEMPLEA
FUNCIONES DEFINIDAS

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1994



CERTIFICADO

... días del ...

Notario Público

... ció(eron)

... es) doy ...
... s) firman ...
... apacidad

CERTIFICADO

... de ...

... ió(eron)

... VNETH

... i) cono

... ata

... da ...

visto

CADO

CADC

ON

MI

109

De

es una Sociedad

lco

de

Zi

1

lo

Ar

la

(l)

R

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

o

CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los 6 días del mes de FEBRERO de 19 98
ante mí, Notario Público de ESTADO DE INDIANA
compareció(eron) personalmente KENNETH L. LOERTSCHER

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

Notario Público — Notary Public

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy, 6 de FEBRERO de 19 98
compareció(eron) ante mí
KENNETH L. LOERTSCHER
a quien(es) conozco personalmente y que firma(n) este documen
to en representación de la Sociedad/compañía
denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:

CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT. 1997
CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente

de acuerdo con las leyes de Estado de Delaware,
Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, Estados Unidos de America.

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente
poder están comprendidos dentro del objeto social de la
mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) KENNETH L. LOERTSCHER
SECRETARIO ASISTENTE Y ASESOR LEGAL PATENTES

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad INDIANAPOLIS
Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

Notario Público — Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

On this 6th day of February 19 98
before me, a Notary Public of State of Indiana.
personally appeared Kenneth L. Loertscher

to me known, and known to me to be the person(s) who
executed that foregoing document, and who has(have) legal
capacity to execute it.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98
appeared before me
Kenneth L. Loertscher
who(m) I know personally and who(m) signed this document as
representative(s) of the Dow AgroSciences LLC Limited
named Dow AgroSciences LLC Liability
Company.

I Certify:

1. That I have seen the following documents:

Certificate of formation, dated July 1, 1997
Certificate of amendment, dated October 1, 1997
Board resolution, dated October 23, 1997
Board written consent

2. That the above documents prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC

is a Limited Liability Company, NOTARIO ENCARGADO existence

in accordance with the laws of State of Delaware,
United States of America

2.2. That the domicile of said Dow AgroSciences LLC is
9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana
46268, United States of America.

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power
of Attorney is granted are comprised within the corporation
purposes set forth in the charter of the mentioned
Corporation/Company, limited liability company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary and General Patent Counsel

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 19 98

Lydia S. Owens

Lydia S. Owens
Notary Public, State of Indiana
Hendricks County
My Commission Expires 03/05/00

* Documents must be identified with date and origin.

**CERTIFICACION NOTARIAL
Y AUTENTICACION CONSULAR**

1. Es necesaria la legalización con certificado notarial. El Notario Público debe certificar:
 - 1.1. Que la compañía está legalmente constituida y actualmente existente.
 - 1.2. Su domicilio.
 - 1.3. Que el propósito del poder está incluido en el objeto social de la compañía.
 - 1.4. Que el poderdante está autorizado para dar el poder en nombre de la compañía.
2. Los documentos que hay que mostrarle al Notario Público para probar los puntos anteriores, deben estar expresados en el Certificado Notarial con fecha y origen:
 - 2.1. Respecto a los puntos 1.1, 1.2 y 1.3 sugerimos referirse a los artículos de constitución con fecha y lugar de otorgamiento; y
 - 2.2. Para el punto 1.4 sugerimos mencionar la resolución de la Junta Directiva o los estatutos, según los cuales la persona que otorga el poder está autorizada para ello.
- Enseguida el Señor Cónsul de Colombia debe autenticar la firma del Notario Público.

**NOTARIAL CERTIFICATION AND
CONSULAR AUTENTIFICATION**

1. Notarial legalization is necessary. The Notary Public must certify:
 - 1.1. That the company is legally constituted and presently existent.
 - 1.2. Its place of business.
 - 1.3. That the purpose of the Power-of-Authority is included in the activities of the company.
 - 1.4. That the grantor is empowered to give the Power of Attorney in the name of the company he represents.
2. The documents which the Notary Public had before him to prove the above points must be listed by him in the Notarial Certificate with dated and origin:
 - 2.1. In connection with points 1.1., 1.2. and 1.3 we suggest referring to the articles of incorporation with date and place of incorporation.
 - 2.2. For point 1.4 we suggest to mention the resolution of the Board of Directors and/or the by-laws whereby the person who grants the Power of Attorney has been authorized to give.
3. Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

COPIA DEL CIRCULO DE INCORPORACION
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
NOTARIO ENCARGADO



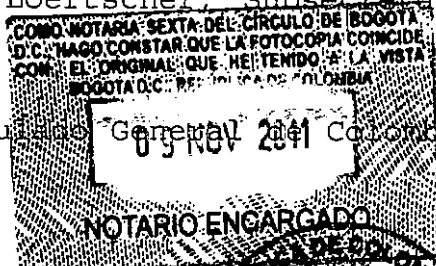
NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL COLOMBIANO: Según el artículo 259 del C. de P.C. el Señor Cónsul debe autenticar la última precedente autenticación.

TRADUCCION OFICIAL No.03.075.98 de un documento escrito en inglés el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor al mismo tiempo que la presente. Esta traducción ha sido preparada por Bernarda R. de Martínez, Traductora Oficial debidamente reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobada por el Ministerio de Justicia de Colombia mediante Resolución No. 683 de 1991.

(Se traducen sellos y legalizaciones que aparecen a continuación de un documento escrito en inglés y español por medio del cual Dow AgroSciences LLC, otorga Poder a favor de GERMAN CAVELIER, GONZALO PERDOMO, EMILIO FERRERO y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ.)

Dado y firmado hoy 6 de febrero de 1998, en Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., por Kenneth L. Loertscher, Subsecretario y Asesor General de Patentes.

(Sellos parciales en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)



CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO), en inglés y español referente a la capacidad legal que tenía KENNETH L. Loertscher para otorgar el documento antes mencionado, expedido el 6 de febrero de 1998 en el Estado de Indiana.



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD), en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad Dow AgroSciences LLC, expedido en la Ciudad de Indianápolis, Indiana, E.E.U.U., el 6 de febrero de 1998.

-2-

(Firmado), Lydia S. Owens, Notario Público

(Sello notarial en tinta), LYDIA S. OWENS Notario Público,
Estado de Indiana, Condado de Hendricks Mi comisión expira el
03/05/00

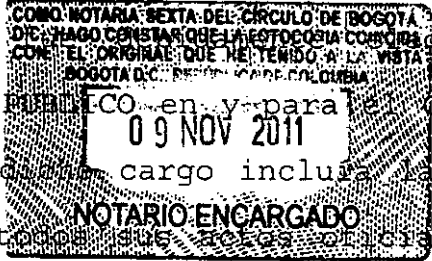
(Sello notarial seco), LYDIA S. OWENS NOTARIO PUBLICO INDIANA

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en
Chicago.)

ESTADO UNIDOS DE AMERICA

CERTIFICADO DEL CARGO

ESTADO DE INDIANA

Yo, SUE ANN GILROY, Secretario de Estado de Indiana, POR EL
PRESENTE CERTIFICO: que, de acuerdo con los archivos que obran
en mi oficina, LYDIA S. OWENS  en y para el Condado
nombrado para el cargo de NOTARIO PUBLICO en y para el Condado
de Hendricks y que el término de ~~este~~ cargo incluya la fecha
del 6 de febrero de 1998: que a ~~todos~~  se
les debe dar completa fe y crédito dentro y fuera de todas las
Corte de Justicia. EN TESTIMONIO DE LO CUAL ~~se~~  firmado y
estampado el Gran Sello del Estado de Indiana, Indianapolis,
hoy 10 de febrero de 1998.

(Firma facsimilar), Sue Ann Gilroy

Secretario de Estado

(Firmado),

Por: Mary Reeve

Suplente

(Adherido se encuentra sello de oblea dorado con texto en
relieve), SELLO DEL ESTADO DE INDIANA 1816

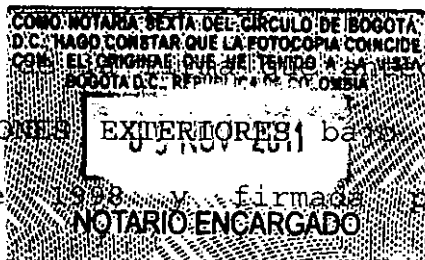
-3-

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(En español), Certificación de la firma y cargo de MARY REEVER, de la existencia legal de la compañía DOW AGROSCIENCES LLC y de la autoridad que tenía su representante Legal, KENNETH L. LOERTSCHER, para otorgar el poder mencionado arriba. Esta certificación fue expedida por el CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA EN CHICAGO, ILLINOIS, bajo el N° 254, de fecha 20 de febrero de 1998 y firmada por Carlos Alfonso Negret Mosquera, Cónsul General. Pagados Impuesto de Timbre y Derechos Consulares por valor de veintiún dólares.

(Sello parcial en tinta del Consulado General de Colombia en Chicago.)

(al dorso), Legalización con el sello del Ministerio de Relaciones Exteriores, expedida por el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, bajo el No. 221220, de fecha 11 de marzo de 1998, y firmada por el Jefe de Legalizaciones.



Es traducción fiel y completa de la copia en los archivos de esta oficina para su control, la cual me remito.



Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137

Bernarda R. de Martínez

Bernarda R. de Martínez
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 683 Minjusticia 1991

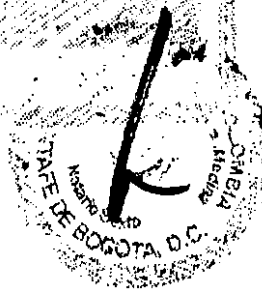
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AM 11:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

09 NOV 2011

NOTARIO ENCARGADO

MINISTERIO DE RELACIONES
REPUBLICA DE COLOMBIA

022686



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIAWEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.comTELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

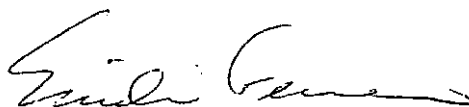
E. S. D.

Poderdante : DOW AGROSCIENCES LLC

Poder conferido el : 06/02/1998

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.



EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

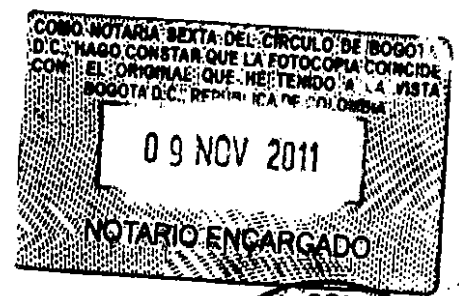
T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén



NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
Bogotá, D.C.
Ante mí AMPARO QUINTERO ARANGO **22 OCT 2009**
NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
BOGOTÁ, D.C.
Comparado(aron) *Emilio Ferrero*
Williamson y Luz Clemencia
Guarez de Paez
Quel(les) es(son) la(s) C.C.
CC 438019 TP 31929
CC 35456344 TP 23555
Y de(los) aus(ente) firme(s) que se reco(n)
ta en el presente documento es(son) la(s) hoy(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrero
Luz Clemencia Guarez de Paez



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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 October 2010 (21.10.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/120452 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/325 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/028381

(22) International Filing Date:
24 March 2010 (24.03.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/170,189 17 April 2009 (17.04.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **DOW AGROSCIENCES LLC** [US/US]; 9330 Zionsville Road, Indianapolis, IN 46268-1054 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **LIRA, Justin** [US/US]; 12373 Ensley Drive, Fishers, IN 46038 (US). **BUTLER, Holly** [US/US]; 1106 Fairway Drive, Indianapolis, IN 46260 (US). **SMITH, Doug** [US/US]; 19038 Edwards Grove Drive, Noblesville, IN 46062 (US). **NARVA, Kenneth** [US/US]; 4372 Creekside Pass, Zionsville, IN 46077 (US). **MEADE, Thomas** [US/US]; 1141 Huntington Woods Pointe, Zionsville, IN 46077 (US).

(74) Agent: **STUART, Donald**; 9330 Zionsville Rd, Indianapolis, Indiana 46268 (US).

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

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

Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

— with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: DIG-3 INSECTICIDAL CRY TOXINS

(57) Abstract: DIG-3 Cry toxins, polynucleotides encoding such toxins, and transgenic plants that produce such toxins are useful to control insect pests.

WO 2010/120452 A1



TOXINAS CRY INSECTICIDAS DIG-3Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

[0001] Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 61/170,189, presentada el 17 de abril de 2009, la cual se incorpora expresamente por referencia en esta especificación.

Campo de la Invención

[0002] Esta invención concierne a novedosas toxinas Cry insecticidas y a su uso para controlar insectos.

Arte Previo de la Invención

[0003] *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) es una bacteria que habita en el suelo, la cual produce proteínas de cristales plaguicidas, conocidas como delta endotoxinas o proteínas Cry. Las proteínas Cry son intoxicantes orales que funcionan actuando en las células del intestino medio de insectos susceptibles. Un listado extensivo de delta endotoxinas se mantiene y actualiza regularmente en http://www.lifesci.Sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html.

[0004] El barrenador europeo del maíz (ECB - *European Corn Borer*), *Ostrinia nubilalis* (Hübner), es la plaga de insectos más dañinos del maíz de un extremo al otro de los Estados Unidos y Canadá, y ocasiona una pérdida en ingresos calculada en \$1.000 millones cada año, debida a los estragos en el rendimiento de las cosechas y a los gastos para el manejo de los insectos (Witkowski *et al.*, 2002). El maíz transgénico que expresa genes que codifican proteína Cry, muy notoriamente CryIAb, CryIAc, o CryIF, proporciona niveles comerciales de eficacia contra el ECB.

[0005] A pesar del éxito del maíz transgénico resistente al ECB, la posibilidad del desarrollo de poblaciones de insectos resistentes amenaza la durabilidad a largo plazo de las proteínas Cry en el control del ECB y crea la necesidad de descubrir y desarrollar nuevas proteínas Cry para controlar el ECB y otras plagas. La resistencia de los insectos a las proteínas Cry *B.t.* puede desarrollarse mediante varios mecanismos (Heckel *et al.*, 2007, Pigott y Ellar, 2007). En los insectos se han identificado múltiples clases de proteínas de receptor para proteínas Cry, y existen múltiples ejemplos dentro de cada clase de receptor.

La resistencia a una proteína Cry particular puede desarrollarse, por ejemplo, por medio de una mutación en la porción de unión a toxina de un dominio de cadherina de una proteína de receptor. Un medio adicional de resistencia puede estar mediado por una proteasa de procesamiento de protoxina. Por consiguiente, la resistencia a toxinas Cry en especies de lepidópteros tiene una base genética compleja, con por lo menos cuatro principales genes distintos de resistencia. Insectos lepidópteros resistentes a proteínas Cry se han desarrollado en el campo dentro de la especie *Plutella xylostella* (Tabashnik, 1994), *Trichoplusia ni* (Janmaat y Myers 2003, 2005), y *Helicoverpa zea* (Tabashnik *et al.*, 2008). El desarrollo de nuevas proteínas Cry de alta potencia proporcionaría herramientas adicionales para el manejo de ECB y otras plagas de insectos. Las proteínas Cry con diferentes modos de acción, producidas en combinación con maíz transgénico, evitarían el desarrollo de resistencia del insecto ECB y protegería la utilidad a largo plazo de la tecnología *B.t.* para el control de plagas de insectos.

Breve Sumario de la Invención

[0006] La presente invención proporciona toxinas Cry insecticidas, incluyendo la toxina designada en esta especificación como DIG-3, así como variantes de DIG-3, ácidos nucleicos que codifican estas toxinas, métodos de controlar plagas utilizando las toxinas, métodos de producir las toxinas en células anfitrionas transgénicas, y plantas transgénicas que producen las toxinas. La secuencia prevista de aminoácidos de la toxina DIG-3 natural se da en SEQ ID NO:2.

[0007] Como se describe en Ejemplo 1, se aisló un ácido nucleico que codifica la proteína DIG-3 de una cepa *B.t.*, designada internamente por Dow AgroSciences LLC como PS46L. Se determinó la secuencia de ácido nucleico para la región codificante de longitud completa, y se dedujo la secuencia proteica de longitud completa de la secuencia de ácido nucleico. La toxina DIG-3 tiene alguna similitud con la proteína CryIBII (No. de Acceso Genbank AAM93496) y otras proteínas tipo CryIB de *B. thuringiensis* (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/intro.html).

[0008] Variantes insecticidamente activas de la toxina DIG-3 se describen también en esta especificación, y se designan colectivamente como toxinas DIG-3.

[0009] Las toxinas DIG-3 pueden usarse asimismo en combinación con metodologías ARNi para control de otras plagas de insectos. Por ejemplo, DIG-3 puede usarse en plantas transgénicas en combinación con un ARNdc (*dsRNA*) para supresión de un gen esencial en

el gusano de la raíz del maíz o un gen esencial en una plaga de insectos. Tales genes blanco incluyen, por ejemplo, ATPasa vacuolar, ARF-1, Act42A, CHD3, EF-1 α , y TFIIB. Un ejemplo de un gen blanco apropiado es ATPasa vacuolar, como se divulga en WO2000/035650.

[0010] Un hallazgo sorprendente referido en esta especificación es que las toxinas DIG-3 son activas contra poblaciones del barrenador europeo del maíz y la palomilla dorso de diamante, que son resistentes a las toxinas CryIA y CryIF. Por consiguiente, las toxinas DIG-3 son candidatos ideales para uso para el control de plagas lepidópteras. Las toxinas pueden utilizarse solas o en combinación con otras toxinas Cry, tales como Cry IF, CryIAb, y CryIAc, para controlar el desarrollo de poblaciones de insectos resistentes.

[0011] Fragmentos insecticidamente activos de SEQ ID NO:2, y nucleótidos que codifican tales fragmentos, son otro aspecto de la invención.

[0012] En una incorporación la invención provee un polipéptido de una toxina DIG-3 aislado, que incluye un segmento de toxina central seleccionado del grupo conformado por

- (a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 113 a 643 de SEQ ID NO:2;
- (b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de residuos 113 a 643 de SEQ ID NO:2;
- (c) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de residuos 113 a 643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones o modificaciones de aminoácidos que no afectan negativamente la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO:2.

[0013] En una incorporación la invención provee un polipéptido de una toxina DIG-3 aislado, que incluye un segmento de toxina central seleccionado del grupo conformado por

- (a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 73 a 643 de SEQ ID NO:2;
- (b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de residuos 73 a 643 de SEQ ID NO:2;
- (c) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de residuos 73 a

643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones o modificaciones de aminoácidos que no afectan negativamente la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO:2.

[0014] En otra incorporación la invención provee un polipéptido de una toxina DIG-3 aislado, que incluye un segmento de toxina central DIG-3 seleccionado del grupo conformado por

(a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 643 de SEQ ID NO:2;

(b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 643 de SEQ ID NO:2;

(c) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 643 de SEQ ID NO:2 con hasta 20 sustituciones, deleciones o modificaciones de aminoácido que no afectan negativamente la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO:2.

[0015] Por "aislado" los solicitantes dan a entender que el polipéptido o moléculas de ADN se han extraído de su entorno natural y se han puesto en un entorno diferente por la mano del hombre.

[0016] En otra incorporación la invención provee una planta que comprende una toxina DIG-3.

[0017] En otra incorporación la invención provee un método para controlar una población de plagas, método que incluye contactar la citada población con una cantidad pesticidamente efectiva de una toxina DIG-3.

[0018] En otra incorporación la invención provee un ácido nucleico aislado que codifica una toxina DIG-3.

[0019] En otra incorporación la invención provee un constructo de ADN que incluye una secuencia nucleotídica que codifica una toxina DIG-3, enlazada operacionalmente a un promotor que no se deriva de *Bacillus thuringiensis* y es capaz de inducir la expresión en una planta. La invención provee asimismo una planta transgénica, que incluye el constructo de ADN incorporado en forma estable en su genoma, y un método para proteger una planta

de una plaga, método que comprende introducir el constructo en la citada planta.

Breve Descripción de las Secuencias

[0020] SEQ ID NO:1 Secuencia de ADN que codifica la toxina DIG-3 de longitud completa; 3771 nt.

[0021] SEQ ID NO:2 Secuencia de la proteína DIG-3 de longitud completa; 1256 aa.

[0022] SEQ ID NO:3 Secuencia de ADN DIG-3 de longitud completa optimizada en una planta; 3771 nt.

[0023] SEQ ID NO:4 Segmento de la protoxina CryIAb; 545 aa.

[0024] SEQ ID NO:5 Toxina quimérica: segmento de la toxina central DIG-3/segmento de la protoxina CryIAb; 1188 aa.

[0025] SEQ ID NO:6 Secuencia de ADN optimizada en una dicotiledónea, que codifica el segmento de la protoxina CryIAb; 1635 nt

[0026] SEQ ID NO:7 Secuencia de ADN optimizada en maíz, que codifica el segmento de la protoxina CryIAb; 1635 nt

Descripción Detallada de la Invención

[0027] Toxinas DIG-3, y variantes insecticidamente activas. Aparte de la toxina DIG-3 de longitud completa de SEQ ID NO:2, la invención engloba variantes insecticidamente activas. Por el término "variante", los solicitantes pretenden incluir fragmentos, ciertos mutantes de delección e inserción, y ciertas proteínas de fusión. DIG-3 es una toxina Cry clásica, de tres dominios. Como un prefacio a describir variantes de la toxina DIG-3 que se incluyen en la invención, será útil reseñar brevemente la arquitectura de toxinas Cry de tres dominios en general y de la toxina proteína DIG-3 en particular.

[0028] Una mayoría de las moléculas de las proteínas de cristales delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* se componen de dos segmentos funcionales. La toxina central resistente a la proteasa es el primer segmento y corresponde a alrededor de la primera mitad de la molécula de la proteína. La molécula de la protoxina completa de ~130 kDa se

procesa rápidamente al segmento central resistente por proteasas en el intestino del insecto. El segmento que se delecciona por este procesamiento se designará en esta especificación como el "segmento de protoxina". Se cree que el segmento de protoxina participa en la formación de cristales de toxinas (Arvidson *et al.*, 1989). Por consiguiente, el segmento de protoxina puede transmitir una especificidad parcial del insecto para la toxina limitando la accesibilidad del núcleo al insecto, reduciendo el procesamiento de la proteasa de la molécula de toxina (Haider *et al.*, 1986) o reduciendo la solubilidad de la toxina (Aronson *et al.*, 1991). Las toxinas *B.t.*, incluso dentro de una cierta clase, varían en cierta medida en longitud y en la ubicación precisa de la transición del segmento de toxina central al segmento de protoxina. La transición del segmento de toxina central al segmento de protoxina ocurrirá típicamente a entre alrededor de 50% a alrededor de 60% de la toxina de longitud completa. SEQ ID NO:2 divulga la secuencia de 1256 aminoácidos del polipéptido DIG-3 de longitud total, de los cuales 643 aminoácidos N-terminales comprenden el segmento de la toxina central DIG-3. Los 1929 nucleótidos 5'-terminales de SEQ ID NO:1 incluyen la región codificante para el segmento de toxina central.

[0029] Se han determinado estructuras cristalinas tridimensionales para Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa, Cry3Bb1, Cry4Aa, Cry4Ba y Cry8Ea1. Estas estructuras para las toxinas centrales son notablemente similares y constan de tres dominios distintos con las características descritas a continuación (reseñado en de Maagd *et al.*, 2003).

[0030] El dominio I es un haz de siete alfa-hélices donde la α -hélice 5 está rodeada por seis hélices anfipáticas. Este dominio ha sido implicado en la formación de poros y comparte homología con otras proteínas formadoras de poros, incluyendo hemolisinas y colicinas. El dominio I de la proteína DIG-3 comprende los residuos de aminoácido 56 a 278 de SEQ ID NO:2.

[0031] El dominio II está formado por tres láminas β anti-paralelas, empacadas conjuntamente en un prisma β . Las asas de este dominio juegan papeles importantes en unir receptores del intestino medio del insecto. En las proteínas Cry1A, las asas expuestas de la superficie en los ápices de las láminas β del dominio II están involucradas en la unión a receptores de cadherina lepidópteros. Las asas del dominio II de Cry3Aa unen una metaloproteasa asociada a membrana de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (escarabajo de la papa de Colorado) en una manera similar (Ochoa-Campuzano *et al.*, 2007). El dominio II comparte homología con ciertas proteínas de unión a carbohidratos incluyendo vitelina y jacalina. El dominio II de la proteína DIG-3 comprende los residuos de aminoácido 283 a 493 de SEQ ID NO:2.

[0032] El dominio III es un beta sándwich de dos láminas β anti-paralelas. Estructuralmente este dominio está relacionado con dominios de unión a carbohidratos de proteínas tales como glucanasas, galactosa oxidasa, sialidasa y otros. El dominio III fija ciertas clases de proteínas de receptor y, posiblemente, participa en la inserción de un pre-poro de toxina oligomérica que interactúa con una segunda clase de receptores, ejemplos de las cuales son aminopeptidasa y alcalina fosfatasa en el caso de las proteínas CryIA (Pigott yd Ellar, 2007). Receptores de dominio III Cry análogos tienen todavía que identificarse en coleópteros. Los bloques 2 y 3 de las secuencias *B.t.* conservadas cartografían cerca del N-término y el C-término del dominio 2, respectivamente. Por lo tanto, estos bloques 2 y 3 de secuencias conservadas son regiones limítrofes cercanas entre los tres dominios funcionales. Estas regiones de ADN conservado y homología proteica se han aprovechado para manipular por técnicas de ingeniería genética toxinas *B.t.* recombinantes (Patente de los Estados Unidos No. 6090931, WO 91/01087, WO 95/06730, WO 1998022595). El dominio III de la proteína DIG-3 incluye los residuos de aminoácido 503 a 641 de SEQ ID NO:2.

[0033] Se ha referido que la α -hélice del dominio I se elimina luego de la fijación al receptor. Aronson *et al.* (1999) demostraron que CryIAc ligada a BBMV se protegió de la escisión de proteinasa K comenzando en el residuo 59, justo después de la α -hélice 1; resultados similares se citaron para CryIAb. Gomez *et al.* (2002) descubrieron que oligómeros CryIAb, formados luego de la unión al receptor BBMV, carecían de la porción de α -hélice 1 del dominio I. Además, Soberon *et al.* (2007) demostraron que mutantes de delección N-terminal de CryIAb y CryIAc, que carecen de aproximadamente 60 aminoácidos que incluyen la α -hélice 1 de la estructura Cry tridimensional, son capaces de ensamblar monómeros de peso molecular alrededor de 60 kDa en pre-poros en la ausencia de unión a cadherina. Se refirió que estos mutantes de delección N-terminal eran activos en larvas de insectos resistentes a Cry. Además, Diaz-Mendoza *et al.* (2007) describieron fragmentos CryIAb de 43 kDa y 46 kDa que conservaron actividad sobre el barrenador de maíz del Mediterráneo (*Sesamia nonagrioides*). Se demostró que estos fragmentos incluían los residuos de aminoácido 116 a 423; sin embargo, las secuencias precisas de aminoácidos no se aclararon y se desconoce el mecanismo de actividad de estos fragmentos proteolíticos. Los resultados de Gomez *et al.* (2002), Soberon *et al.* (2007), y Diaz-Mendoza *et al.* (2007) contrastan con los de Hofte *et al.* (1986), quienes comunicaron que la delección de 36 aminoácidos del N-término de CryIAb resultó en la pérdida de actividad insecticida.

[0034] Hemos deducido que los comienzos y finales de α -hélice 1, α -hélice 2A, α -

hélice 2B, y α -hélice 3, y la localización de las regiones espaciadoras entre ellas en el dominio I de la toxina DIG-3 comparando la secuencia de la proteína DIG-3 con la secuencia proteica para Cry8Eal, para la cual se conoce la estructura. Estas localizaciones se describen en Tabla 1.

Tabla 1

Coordenadas de aminoácidos de α -hélices proyectadas de la proteína DIG-3.

	α -hélice 1	espa- ciador	α -hélice 2A	espa- ciador	α -hélice 2B	espa- ciador	α -hélice 3
Residuos de SEQ ID NO:2	53-70	71-76	77-91	92-99	100-108	109-113	114-138

[0035] Variantes de delección amino terminal de DIG-3. En uno de sus aspectos la invención provee variantes DIG-3 en las cuales la totalidad o parte de la α -hélice 1, α -hélice 2A, y α -hélice 2B se delecionan para mejorar la actividad insecticida y evitar el desarrollo de resistencia por insectos. Estas modificaciones se hacen para proporcionar variantes DIG-3 con atributos mejorados, tales como un espectro plaguicida mejorado al blanco, potencia, y manejo de la resistencia del insecto. En algunas incorporaciones de la invención, las modificaciones en cuestión pueden afectar la eficiencia de activación de la protoxina y la formación de poros, llevando a la intoxicación del insecto. Más específicamente, para proporcionar variantes DIG-3 con atributos mejorados, se describen delecciones graduales que eliminan parte de la secuencia de ácido nucleico que codifica el N-término de la proteína DIG-3. Las delecciones eliminan la totalidad de la α -hélice 1 y la totalidad o parte de la α -hélice 2 en dominio I, manteniendo al mismo tiempo la integridad estructural de las α -hélices 3 a 7. En consecuencia, la presente invención se refiere en parte a mejoras en la eficacia de la proteína Cry introducidas manipulando por técnicas de ingeniería genética los componentes α -helicoidales del dominio 1 para una formación más eficiente de los poros. Más específicamente, la presente invención se refiere en parte a proteínas DIG-3 mejoradas, diseñadas para tener delecciones N-terminales en regiones con presunta homología de estructura secundaria con la α -hélice 1 y la α -hélice 2 en el dominio I de proteínas Cryl.

[0036] Las delecciones para mejorar las propiedades insecticidas de las toxinas DIG-3 pueden iniciarse antes del comienzo previsto de la α -hélice 2A, y pueden terminar después del final de la α -hélice 2B, pero preferiblemente no extenderse a la α -hélice 3.

[0037] Al diseñar secuencias codificantes para las variantes de delección N-terminal, un

codón de iniciación ATG, que codifica metionina, se inserta en el extremo 5' de la secuencia nucleotídica diseñada para codificar la variante de delección. Para secuencias diseñadas para uso en plantas transgénicas, puede ser beneficioso seguir la "regla de N-extremo" de Varshavsky (1997). Se enseña que algunos aminoácidos pueden contribuir a la inestabilidad y degradación de las proteínas en células eucariotas cuando se despliegan como el residuo N-terminal de una proteína. Por ejemplo, datos recolectados de observaciones en células de levadura y de mamífero indican que los aminoácidos desestabilizantes N-terminales son F, L, W, Y, R, K, H, I, N, Q, D, E y posiblemente P. Aunque los detalles específicos de los mecanismos de degradación proteica pueden diferir en cierta medida entre organismos, la conservación de identidad de los aminoácidos desestabilizantes N-terminales observada anteriormente sugiere que mecanismos similares pueden funcionar en células vegetales. Por ejemplo, Worley *et al.* (1998) descubrieron que en plantas, la regla del N-extremo incluye residuos básicos y aromáticos. Es una posibilidad que la escisión proteolítica por proteasas vegetales cerca del inicio de la α -hélice 3 de las proteínas insecticidas *B.t.* en cuestión pueda exponer un aminoácido N-terminal desestabilizante. Tal procesamiento puede tomar como blanco las proteínas escindidas para descomposición rápida y limitar la acumulación de las proteínas insecticidas *B.t.* a niveles insuficientes para un control efectivo de los insectos. Por consiguiente, para variantes de delección N-terminal, que comienzan con uno de los aminoácidos desestabilizantes, los solicitantes prefieren agregar un codón que especifique un aminoácido G (glicina) entre la metionina de iniciación traduccional y el aminoácido desestabilizante.

[0038] El Ejemplo 2 ejemplifica en forma específica variantes de delección amino-terminal de DIG-3 de acuerdo con la invención. Fragmentos útiles adicionales que conservan toxicidad pueden identificarse por digestión con tripsina o quimotripsina de la proteína de cristal solubilizada de longitud completa. Ejemplos adicionales de fragmentos tóxicos de proteína DIG-3 pueden codificarse por fragmentos de la región codificante DIG-3. Variantes DIG-3 activas contra insectos tienen la mayoría de las veces un truncamiento N-terminal corto y un truncamiento C-terminal largo. El extremo N-terminal del fragmento tóxico más pequeño se determina convenientemente por la determinación de la secuencia de aminoácidos N-terminal de proteína de cristal soluble, tratada con tripsina o quimotripsina, por técnicas disponibles rutinariamente en el arte.

[0039] Toxinas quiméricas. Previamente se han referido proteínas quiméricas utilizando el segmento de la toxina central de una toxina Cry, fusionado al segmento de protoxina de otra toxina Cry. Las variantes DIG-3 incluyen toxinas que comprenden un

segmento de toxina central N-terminal de una toxina DIG-3 (que puede ser de longitud total o tener deleciones N-terminales descritas más arriba) fusionado a un segmento de protoxina heteróloga en algún punto más allá del extremo del segmento de la toxina central. La transición al segmento de protoxina heteróloga puede ocurrir en aproximadamente la unión (*junction*) de la toxina central nativa/protoxina o, en forma alternativa, una porción de la protoxina nativa (que se extiende más allá del segmento de toxina central) puede conservarse con la transición a la protoxina heteróloga que ocurre corriente abajo. Como un ejemplo, una toxina quimérica de la presente invención tiene el segmento de toxina central completo de DIG-3 (aminoácidos 1-643) y un segmento de protoxina heteróloga (aminoácidos 643 al C-término). En una incorporación preferida, el segmento de protoxina heteróloga se deriva de una delta-endotoxina CryIAb, como se ilustra en SEQ ID NO:5.

[0040] SEQ ID NO:4 divulga la secuencia de 545 aminoácidos de un segmento de protoxina CryIAb útil en variantes DIG-3 de la invención. Se llama la atención a los últimos alrededor de 100 a 150 aminoácidos de este segmento de protoxina, el cual es más crítico para incluir en la toxina quimérica de la presente invención.

[0041] Variantes de sensibilidad a proteasas. Las proteasas del intestino de los insectos funcionan típicamente ayudando al insecto a obtener aminoácidos necesarios de la proteína dietética. Las proteasas digestivas de los insectos mejor entendidas son serina proteasas, que parecen ser el tipo más común (Englemann y Geraerts (1980), particularmente en especies lepidópteras. Los insectos coleópteros tienen intestinos que son más neutros a los ácidos que los intestinos lepidópteros. La mayoría de las larvas coleópteras y adultos, por ejemplo el escarabajo de la papa de Colorado, tienen intestinos medios ligeramente ácidos, y cisteína proteasas proporcionan la principal actividad proteolítica (Wolfson y Murdock, 1990). Más precisamente, Thie y Houseman (1990) identificaron y caracterizaron las cisteína proteasas, cathepsina tipo B y cathepsina tipo H, y la aspartil proteasa, cathepsina tipo D, en el escarabajo de la papa de Colorado. Gillikin *et al.* (1992) caracterizaron la actividad proteolítica en los intestinos de larvas del gusano alfilerillo (*western corn rootworm*) y descubrieron principalmente cisteína proteasas. La Patente de los Estados Unidos No. 7230167 divulgó que una actividad proteasa, atribuida a cathepsina G, existe en el gusano alfilerillo. La diversidad y diferentes niveles de actividad de las proteasas del intestino del insecto pueden influir en la sensibilidad de un insecto a una toxina *B.t.* particular.

[0042] En otra incorporación de la invención, sitios de escisión de proteasas pueden manipularse por técnicas de ingeniería genética en localizaciones deseadas para afectar el procesamiento de proteínas en el intestino medio de larvas susceptibles de ciertas plagas de

insectos. Estos sitios de escisión de proteasas pueden introducirse por métodos tales como síntesis génica química o PCR con empalme por superposición (Horton *et al.*, 1989). Secuencias de reconocimiento de serina proteasas, por ejemplo, pueden insertarse opcionalmente en sitios específicos en la estructura de la proteína Cry para afectar el procesamiento de la proteína en puntos de delección deseados en el intestino medio de larvas susceptibles. Serina proteasas que pueden explotarse en tal manera incluyen serina proteasas de intestino medio de lepidópteros, tales como tripsina o enzimas tipo tripsina, quimotripsina, elastasa, *etc.* (Christeller *et al.*, 1992). Además, sitios de delección identificados empíricamente secuenciando productos de digestión de proteínas Cry generados con preparaciones de proteasas de intestino larval no fraccionadas, o que se unen a vesículas de membrana con borde en cepillo pueden manipularse por técnicas de ingeniería genética para efectuar la activación de proteínas. Proteínas Cry modificadas, generadas por delección génica o por introducción de sitios de escisión de proteasas, tienen una actividad mejorada sobre plagas de lepidópteros incluyendo *Ostrinia nubilalis*, *Diatraea grandiosella*, *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua*, *Diatraea saccharalis*, *Loxagrotis albicosta*, y otras plagas blanco.

[0043] Serina proteasas de coleópteros tales como tripsina, quimotripsina y proteasa tipo catepsina G, cisteína proteasas de coleópteros tales como catepsinas (proteasas tipo B, tipo L, tipo O, y tipo K) (Koiwa *et al.*, (2000) y Bown *et al.*, (2004)], metaloproteasas de coleópteros tales como ADAM10 [Ochoa-Campuzano *et al.*, (2007)], y ácido aspártico proteasas de coleótero tales como catepsinas tipo D y tipo E, pepsina, plasmepsina, y quimosina pueden explotarse además manipulando por técnicas de ingeniería genética secuencias apropiadas de reconocimiento en sitios de procesamiento deseados para afectar el procesamiento de proteínas Cry en el intestino medio de larvas susceptibles de ciertas plagas de insectos.

[0044] Una localización preferida para la introducción de tales sitios de escisión de proteasas puede estar en la región "espaciadora" entre la α -hélice 2B y la α -hélice 3, por ejemplo en los aminoácidos 109 a 113 de la proteína DIG-3 de longitud completa (SEQ ID NO:2 y Tabla 1). Proteínas Cry modificadas generadas por delección génica o por introducción de sitios de escisión de proteasas tienen actividad mejorada sobre plagas de insectos, incluyendo, pero no limitados a gusano alfilerillo occidental, gusano alfilerillo del sur, gusano alfilerillo del norte, y similares.

[0045] Existen varias tecnologías para permitir la determinación de la secuencia de los aminoácidos que comprenden los residuos N-terminales o C-terminales de polipéptidos.

Por ejemplo, la metodología automatizada de degradación de Edman puede utilizarse en forma secuencial para determinar la secuencia de aminoácidos N-terminal de hasta 30 residuos de aminoácido con 98% de precisión por residuo. Además, la determinación de la secuencia de los aminoácidos que incluyen el extremo carboxi de polipéptidos es también posible [Bailey *et al.*, (1992); Patente de los Estados Unidos No. 6046053]. Por lo tanto, en ciertas incorporaciones, proteínas Cry *B.t.* que se han activado por medio de procesamiento proteolítico, por ejemplo, por proteasas preparadas del intestino de un insecto, pueden caracterizarse e identificarse los aminoácidos N-terminales o C-terminales del fragmento de toxina activada. Variantes DIG-3 producidas por la introducción o eliminación de sitios de procesamiento de proteasas en posiciones apropiadas en la secuencia codificante para permitir, o eliminar, la escisión proteolítica de una proteína variante más grande por proteasas de insectos, plantas o microorganismos están dentro del ámbito de la invención. Se entiende que el resultado final de tal manipulación es la generación de moléculas de fragmento de toxina que tienen la misma o mejor actividad que la proteína toxina intacta (longitud completa).

[0046] Dominios de la toxina DIG-3. Se espera que los dominios separados de la toxina DIG-3, (y variantes que son 90%, 95%, o 97% idénticas a tales dominios) sean útiles en formar combinaciones con dominios de otras toxinas Cry para proporcionar toxinas nuevas con un espectro incrementado de toxicidad de plagas, potencia mejorada, o creciente estabilidad de la proteína. El dominio I de la proteína DIG-3 consta de los residuos de aminoácidos 56 a 278 de SEQ ID NO:2. El dominio II de la proteína DIG-3 consta de los residuos de aminoácido 283 a 493 de SEQ ID NO:2. El dominio III de la proteína DIG-3 consta de los residuos de aminoácido 503 a 641 de SEQ ID NO:2. El intercambio o entremezclado de dominios es un mecanismo para generar proteínas delta-endotoxinas alteradas. Los dominios II y III pueden intercambiarse entre proteínas delta-endotoxinas, resultando en toxinas quiméricas o híbridas con actividad pesticida mejorada o espectro blanco. El dominio II está involucrado en la unión a receptor, y el dominio II de DIG-3 es muy divergente de otras toxinas CryIB. El dominio III fija ciertas clases de proteínas de receptor y, posiblemente, participa en la inserción de un pre-poro de toxina oligomérica. Se ha demostrado que algunas sustituciones del dominio III en otras toxinas producen una toxicidad superior contra *Spodoptera exigua* (de Maagd *et al.*, 1996), y existe orientación sobre el diseño de intercambios de dominio de la toxina Cry (Knight *et al.*, 2004).

[0047] Métodos para generar proteínas recombinantes y analizarlas con respecto a actividad pesticida son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Naimov *et al.*, (2001),

de Maagd *et al.*, (1996), Ge *et al.*, (1991), Schnepf *et al.*, (1990), Rang *et al.*, (1999)). El dominio I de las proteínas CryIA y Cry3A se ha estudiado con respecto a la capacidad de insertar y formar poros en membranas. La α -hélice 4 y α -hélice 5 del dominio I juegan papeles claves en inserción de membrana y formación de poros [Walters *et al.*, (1993), Gazit *et al.*, (1998); Nunez-Valdez *et al.*, (2001)], con las demás α -hélices propuestas para contactar la superficie de la membrana como las varillas de una sombrilla (Bravo *et al.*, (2007); Gazit *et al.*, (1998)).

[0048] Variantes DIG-3 creadas haciendo un número limitado de delecciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos. Delecciones, sustituciones y adiciones de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 pueden hacerse fácilmente en una manera secuencial y los efectos de tales variaciones sobre la actividad insecticida pueden analizarse por bioanálisis. Siempre y cuando el número de cambios se limite, tales pruebas no implican una experimentación excesiva. La invención incluye variantes insecticidamente activas del segmento de la toxina central (aminoácidos 1-643 de SEQ ID NO:2, o aminoácidos 73-643 de SEQ ID NO:2) en las cuales se han hecho hasta 10, hasta 15, o hasta 20 adiciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos independientes.

[0049] La invención incluye variantes DIG-3 que tienen un segmento de toxina central que es 90%, 95% o 97% idéntico a los aminoácidos 1-643 de SEQ ID NO:2 o los aminoácidos 73-643 de SEQ ID NO:2.

[0050] Pueden introducirse variantes haciendo mutaciones aleatorias o pueden diseñarse las variantes. En el caso de mutantes diseñados, existe una alta probabilidad de generar variantes con actividad similar a la toxina nativa, si se mantiene la actividad aminoácido en regiones críticas de la toxina, que representan actividad biológica o se encuentran involucradas en la determinación de la configuración tridimensional la cual, en última instancia, es responsable de la actividad biológica. Ocurrirá también una alta probabilidad de conservar actividad si las sustituciones son conservadoras. Los aminoácidos pueden ponerse en las siguientes clases: no polar, polar sin carga, básica, y ácida. Sustituciones conservadoras mediante las cuales un aminoácido de una clase se reemplaza con otro aminoácido del mismo tipo tienen una probabilidad mínima de alterar materialmente la actividad biológica de la variante. La Tabla 2 proporciona un listado de ejemplos de aminoácidos pertenecientes a cada clase.

Tabla 2

Clase de Aminoácido	Ejemplos de Aminoácidos
Cadenas Laterales No Polares	Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Met (M), Phe (F), Trp (W)
Cadenas Laterales Polares No Cargadas	Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
Cadenas Laterales Ácidas	Asp (D), Glu (E)
Cadenas Laterales Básicas	Lys (K), Arg (R), His (H)
Cadenas Laterales Beta-Ramificadas	Thr, Val, Ile
Cadenas Laterales Aromáticas	Tyr, Phe, Trp, His

[0051] En algunos casos, pueden hacerse también sustituciones no conservadoras. El factor crítico es que estas sustituciones no tienen que desvirtuar significativamente la actividad biológica de la toxina. Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Proteínas variantes abarcadas por la presente invención son biológicamente activas, es decir, continúan poseyendo la actividad biológica deseada de la proteína nativa, a saber, retienen la actividad plaguicida.

[0052] Pueden diseñarse asimismo proteínas variantes que difieran en el nivel de secuencia pero que conserven la misma estructura tri-dimensional esencial general, o similar, distribución de carga superficial, y similares. Véase v.g. la Patente de los Estados Unidos No. 7058515; Larson *et al.* (2002); Stemmer (1994a, 1994b, 1995); y Crameri *et al.* (1996a, 1996b, 1997).

[0053] Ácidos nucleicos. Ácidos nucleicos aislados que codifican toxinas DIG-3 son un aspecto de la presente invención. Éste incluye ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:5, y complementos de las anteriores, así como otros ácidos nucleicos que codifican variantes insecticidas de ID NO:2. Debido a la redundancia del código genético, una variedad de diferentes secuencias de ADN pueden codificar la secuencia de aminoácidos divulgada en esta especificación. Está perfectamente dentro de la habilidad de una persona entrenada en el arte crear estas secuencias alternativas de ADN, que codifiquen las mismas, o esencialmente las mismas, toxinas.

[0054] Síntesis génica. Secuencias de ADN que codifican las proteínas Cry mejoradas descritas en esta especificación pueden construirse por una variedad de métodos bien conocidos en el arte. Por ejemplo, segmentos de genes sintéticos y genes sintéticos pueden elaborarse por química de tri-éster de fosfito y fosforamidita (Caruthers *et al.*, 1987), y

proveedores comerciales se encuentran disponibles para realizar síntesis de ADN a solicitud. Secuencias que codifican proteínas DIG-3 de longitud completa pueden ensamblarse en una variedad de modos incluyendo, por ejemplo, ligamiento de fragmentos de restricción o ensamblado por reacción en cadena de la polimerasa de oligonucleótidos traslapantes (Stewart and Burgin, 2005). Además, secuencias que codifican deleciones terminales pueden elaborarse mediante amplificación PCR utilizando oligonucleótidos terminales específicos del sitio.

[0055] Ácidos nucleicos que codifican toxinas DIG-3 pueden elaborarse por ejemplo, por construcción sintética mediante métodos actualmente practicados por cualquiera de varios proveedores comerciales. (Véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 7482119 B2). Estos ácidos nucleicos, o porciones o variantes de los mismos, pueden construirse también sintéticamente, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador génico y el diseño de métodos de la Patente de los Estados Unidos No. 5380831, por ejemplo. Alternativamente, variaciones de genes de origen sintético o natural pueden construirse fácilmente utilizando técnicas biológicas moleculares estándar para hacer mutaciones puntuales. Fragmentos de estos genes pueden hacerse igualmente usando exonucleasas o endonucleasas disponibles en el comercio, de acuerdo con procedimientos estándar. Por ejemplo, enzimas tales como *Bal31* o mutagenesis dirigida al sitio pueden utilizarse para cortar sistemáticamente nucleótidos de los extremos de estos genes. Asimismo, fragmentos de genes que codifican fragmentos de toxina activa pueden obtenerse utilizando una variedad de enzimas de restricción.

[0056] Dada la secuencia de aminoácidos para una toxina DIG-3, puede diseñarse una secuencia codificante traduciendo inversamente la secuencia codificante usando codones preferidos por el anfitrión previsto, y luego refinando la secuencia utilizando codones alternativos para eliminar secuencias, que podrían causar problemas, y proveer codones periódicos de terminación para eliminar secuencias codificantes abiertas largas en los marcos de lectura no codificantes.

[0057] Quantificación de la identidad de secuencia. Para determinar la identidad porcentual de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima. La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (*es decir*, identidad porcentual = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (v.g. posiciones traslapantes) x 100). En una incorporación, las dos secuencias son de la misma longitud. La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse

usando técnicas similares a las descritas a continuación, permitiendo o no vacíos (*gaps*). Al calcular la identidad porcentual, normalmente se cuentan coincidencias exactas.

[0058] La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias puede llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de tal algoritmo es el de Karlin y Altschul (1990), modificado como en Karlin y Altschul (1993), e incorporado en los programas BLASTN y BLASTX. Convenientemente pueden usarse búsquedas BLAST para identificar secuencias homólogas (similares) a una secuencia problema en bases de datos de ácidos nucleicos o proteínas. Pueden realizarse búsquedas BLASTN, (puntaje = 100, longitud de palabra = 12) para identificar secuencias nucleotídicas que tienen homología con moléculas de ácido nucleico reivindicadas de la invención. Búsquedas BLASTX pueden efectuarse (puntaje = 50, longitud de palabra = 3) para identificar las secuencias de aminoácidos que tienen homología con las moléculas de las proteínas insecticidas reivindicadas de la invención.

[0059] BLAST "con vacíos" (*Gapped BLAST*) (Altschul *et al.*, 1997) puede utilizarse para obtener alineamientos con vacíos para fines de comparación. Alternativamente, PSI-Blast puede utilizarse para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Altschul *et al.*, 1997). Cuando se utilizan programas BLAST, BLAST "con vacíos", y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos. Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

[0060] Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). ClustalW compara secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o ADN y, por consiguiente, puede proporcionar datos acerca de la conservación de secuencia de toda la secuencia de aminoácidos o secuencia nucleotídica. El algoritmo ClustalW se utiliza en varios paquetes de software para el análisis de ADN/aminoácidos disponibles en el comercio, tales como el módulo ALIGNX del Paquete de Programas NTI Vector (*Vector NTI Program Suite*) (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Cuando se alinean secuencias de aminoácidos con ALIGNX, se pueden usar las configuraciones predeterminadas con una penalización por vacío abierto (*a gap open penalty*) de 10, una penalización por extensión de un vacío (*a gap extend penalty*) de 0.1 y la matriz de comparación blosum63mt2 para evaluar la similitud porcentual de aminoácidos (consenso) o identidad entre las dos secuencias. Cuando se alinean secuencias de ADN con ALIGNX, se pueden emplear convenientemente las configuraciones predeterminadas con una penalización por vacío abierto de 15, una penalización por extensión de un vacío de 6.6 y la matriz de comparación

swgapdnamt para evaluar la identidad porcentual entre las dos secuencias.

[0061] Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el de Myers y Miller (1988). Tal algoritmo se incorpora en el programa wSTRETCHER, el cual es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias wEMBOSS (disponible en <http://emboss.sourceforge.net/>). wSTRETCHER calcula un alineamiento global óptimo de dos secuencias utilizando una modificación del algoritmo clásico de programación dinámica, que emplea espacio lineal. La matriz de sustitución, penalización por inserción de un vacío y penalizaciones por extensión de un vacío usadas para calcular el alineamiento pueden especificarse. Cuando se utiliza el programa wSTRETCHER para comparar secuencias nucleotídicas, pueden usarse una penalización por vacío abierto de 16 y una penalización por extensión de vacío de 4 con el archivo de matriz de puntaje EDNAFULL. Cuando se usan para comparar secuencias de aminoácidos, pueden usarse una penalización de vacío abierto de 12 y una penalización por extensión de vacío de 2 con el archivo de matriz de puntaje EBLOSUM62.

[0062] Un ejemplo adicional no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el de Needleman y Wunsch (1970), que se incorpora en los paquetes de software para el alineamiento de secuencias GAP Versión 10 y wNEEDLE (<http://emboss.sourceforge.net/>). GAP Versión 10 puede usarse para determinar identidad o similitud de secuencias usando los siguientes parámetros: para una secuencia nucleotídica, el % de identidad y el % de similitud se encuentran usando una ponderación de vacío de 50 y una ponderación de longitud de 3, y la matriz de puntaje nwsgapdna.cmp. Para la comparación de secuencias de aminoácidos, el % de identidad o el % de similitud se determinan utilizando una ponderación de vacío de 8 y una ponderación de longitud de 2, y el programa de puntaje BLOSUM62.

[0063] wNEEDLE lee dos secuencias de entrada, encuentra el alineamiento óptimo (incluyendo vacíos) a lo largo de toda su longitud, y escribe su alineamiento óptimo de secuencias globales al archivo. El algoritmo explora todos los posibles alineamientos y elige el mejor, usando una matriz de puntaje, que contiene valores para cada posible residuo o coincidencia de nucleótidos. wNEEDLE encuentra los alineamientos con el puntaje máximo posible, donde el puntaje de un alineamiento es igual a la suma de las coincidencias tomadas de la matriz de puntaje, menos las penalizaciones resultantes de abrir y extender vacíos en las secuencias alineadas. La matriz de sustitución y las penalizaciones por vacío abierto y extensión de vacío son específicas del usuario. Cuando se comparan secuencias de aminoácidos, se utilizan una penalización predeterminada por

vacío abierto de 10, una penalización por extensión de vacío de 0.5, y la matriz de comparación EBLOSUM62. Cuando se comparan secuencias de ADN usando wNEEDLE, se utilizan una penalización por vacío abierto de 10, una penalización por extensión de vacío de 0.5, y la matriz de comparación EDNAFULL.

[0064] Pueden emplearse igualmente programas equivalentes. Por "programa equivalente" se da a entender cualquier programa de comparación de secuencias que, para cualquiera de dos secuencias en cuestión, genera un alineamiento que tiene coincidencias idénticas de nucleótidos o residuos de aminoácido y una identidad de secuencias porcentual idéntica cuando se compara con el alineamiento correspondiente generado por ALIGNX, wNEEDLE, o wSTRETCHER. El % de identidad es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias sobre la región alineada reportada (incluyendo cualesquiera vacíos en la longitud) y el % de similitud es el porcentaje de coincidencias entre las dos secuencias sobre la región alineada reportada (incluyendo cualesquiera vacíos en la longitud).

[0065] El alineamiento puede efectuarse también manualmente mediante inspección.

[0066] Anfitriones recombinantes. Los genes que codifican la toxina de la presente invención pueden introducirse en una amplia variedad de anfitriones microbianos o vegetales. La expresión del gen de la toxina resulta, directa o indirectamente, en la producción intracelular y el mantenimiento de la proteína pesticida. Con anfitriones microbianos apropiados, v.g. *Pseudomonas*, los microbios pueden aplicarse al ambiente de la plaga, donde proliferarán y serán ingeridos. El resultado es un control de la plaga. Alternativamente, el microbio que alberga el gen de la toxina puede tratarse bajo condiciones que prolonguen la actividad de la toxina y estabilicen la célula. La célula tratada, que conserva la actividad tóxica, puede aplicarse entonces al ambiente de la plaga blanco.

[0067] Donde el gen de la toxina *B.t.* se introduce mediante un vector apropiado en un anfitrión microbiano, y el citado anfitrión se aplica al ambiente en un estado vivo, es esencial que puedan usarse ciertos microbios anfitriones. Se seleccionan anfitriones microorganismos que son conocidos por ocupar la "fitoesfera" (filoplano, filoesfera, rizoosfera, y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos se seleccionan de tal manera que sean capaces de competir exitosamente en el ambiente particular (cultivo y otros hábitats de insectos) con microorganismos indígenas naturales, permitan un mantenimiento y expresión estables del gen que expresa el polipéptido

plaguicida, y, deseablemente, permitan una protección mejorada del plaguicida contra la degradación e inactivación ambientales.

[0068] Se conoce un gran número de microorganismos que habitan el filoplano (la superficie de las hojas de la planta) y/o la rizoesfera (el suelo que rodea las raíces de la planta) de una amplia variedad de cultivos importantes. Estos microorganismos incluyen bacterias, algas, y hongos. De interés particular son microorganismos, tales como bacterias, v.g. géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levadura, v.g. géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, y *Aureobasidium*. De particular interés con especies bacterianas de la fitoesfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Sinorhizobium meliloti* (anteriormente *Rhizobium meliloti*), *Alcaligenes eutrophus*, y *Azotobacter vinelandii*; y especies de levaduras de la fitoesfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae*, y *Aureobasidium pollulans*. De particular interés son los microorganismos pigmentados.

Métodos de controlar plagas de insectos

[0069] Cuando un insecto entra en contacto con una cantidad efectiva de toxina liberada mediante expresión de una planta transgénica, la(s) composición (composiciones) de proteínas formuladas, la(s) composición (composiciones) de proteínas pulverizables, una matriz cebo u otro sistema de liberación, los resultados son normalmente la muerte del insecto, o los insectos no se alimentan de la fuente que pone las toxinas a disposición de los insectos.

[0070] Las toxinas proteínicas en cuestión pueden "aplicarse" o suministrarse para contactar los insectos blanco en una variedad de modos. Por ejemplo, pueden utilizarse plantas transgénicas (en donde la proteína se produce por la planta y está presente en ella) y son bien conocidas en el arte. La expresión de los genes de la toxina puede conseguirse también selectivamente en tejidos específicos de las plantas, tales como las raíces, hojas,

etc. Esto puede lograrse mediante el uso de promotores específicos de tejidos, por ejemplo. Aplicaciones asperjadas sobre la planta (*spray-on applications*) son otro ejemplo y se conocen también en el arte. Las proteínas en cuestión pueden formularse apropiadamente para el uso final deseado, y se rocían luego (o se aplican en otra forma) sobre la planta y/o alrededor de la planta/en proximidad de la planta a protegerse – antes de que se descubra una infestación, luego de descubrir insectos blanco, tanto antes como después, y similares. Gránulos cebo, por ejemplo, pueden emplearse asimismo y son conocidos en el arte.

Plantas transgénicas

[0071] Las proteínas en cuestión pueden utilizarse para proteger prácticamente cualquier tipo de planta contra el daño por un insecto lepidóptero. Ejemplos no limitantes de tales plantas incluyen maíz, girasol, soya, algodón, canola, arroz, sorgo, trigo, cebada, vegetales, ornamentales, pimientos (incluyendo ajíes), remolachas azucareras, frutas, y césped, para mencionar unas cuantas. Métodos para transformar plantas son bien conocidos en el arte, y métodos de transformación ilustrativos se describen en los Ejemplos.

[0072] Una incorporación preferida de la presente invención es la transformación de plantas con genes que codifican la proteína insecticida en cuestión o sus variantes. Las plantas transformadas son resistentes al ataque por una plaga de insecto blanco en virtud de la presencia de cantidades controladoras de la proteína insecticida en cuestión o sus variantes en las células de la planta transformada. Incorporando material genético, que codifica las propiedades insecticidas de las toxinas insecticidas *B.t.*, en el genoma de una planta devorada por una plaga de insecto particular, el adulto o larvas morirán luego de consumir la planta alimenticia. Numerosos miembros de las clasificaciones monocotiledóneas y dicotiledóneas se han transformado. Cultivos agronómicos transgénicos, así como frutas y vegetales son de interés comercial. Tales cultivos incluyen, pero no se limitan a, maíz, arroz, soya, canola, girasol, alfalfa, sorgo, trigo, algodón, cacahuets, tomates, papas, y similares. Existen varias técnicas para introducir material genético extraño en células vegetales, y para obtener plantas que mantienen y expresan establemente el gen introducido. Tales técnicas incluyen aceleración de material genético recubierto en micropartículas directamente dentro de las células (Patente de los Estados Unidos No. 4945050 y Patente de los Estados Unidos No. 5141131). Las plantas pueden transformarse usando tecnología *Agrobacterium*, véase Patente de los Estados Unidos No. 5177010, Patente de los Estados Unidos No. 5104310, Solicitud de Patente Europea No. 0131624B1, Solicitud de Patente Europea No. 120516, Solicitud de Patente Europea No. 159418B1, Solicitud de Patente Europea No. 176112, Patente de los Estados Unidos No.

5149645, Patente de los Estados Unidos No. 5469976, Patente de los Estados Unidos No. 5464763, Patente de los Estados Unidos No. 4940838, Patente de los Estados Unidos No. 4693976, Solicitud de Patente Europea No. 116718, Solicitud de Patente Europea No. 290799, Solicitud de Patente Europea No. 320500, Solicitud de Patente Europea No. 604662, Solicitud de Patente Europea No. 627752, Solicitud de Patente Europea No. 0267159, Solicitud de Patente Europea No. 0292435, Patente de los Estados Unidos No. 5231019, Patente de los Estados Unidos No. 5463174, Patente de los Estados Unidos No. 4762785, Patente de los Estados Unidos No. 5004863, y Patente de los Estados Unidos No. 5159135. Otra tecnología de transformación incluye tecnología WHISKERS™, véase Patente de los Estados Unidos No. 5302523 y Patente de los Estados Unidos No. 5464765. De igual forma se ha utilizado la tecnología de electroporación para transformar plantas, véase WO 87/06614, Patente de los Estados Unidos No. 5472869, Patente de los Estados Unidos No. 5384253, WO 9209696, y WO 9321335. Todas estas patentes de transformación y solicitudes se incorporan por referencia. Además de las numerosas tecnologías para transformar plantas, puede variar asimismo el tipo de tejido que se contacta con los genes extraños. Tal tejido incluiría, pero no se limitaría a, tejido embrionario, tejido de callo tipo I y II, hipocótilo, meristemo, y similares. Casi todos los tejidos de la planta pueden transformarse durante la desdiferenciación utilizando técnicas apropiadas dentro de las habilidades de un artesano.

[0073] Los genes que codifican las toxinas DIG-3 pueden insertarse en células vegetales empleando una variedad de técnicas que son bien conocidas en el arte, como se divulga más arriba. Por ejemplo, un gran número de vectores de clonación, que incluyen un marcador que permite la selección de las células microbianas transformadas, y un sistema de replicación funcional en *Escherichia coli* se encuentran disponibles para preparación y modificación de genes extraños para inserción en plantas superiores. Tales manipulaciones pueden incluir, por ejemplo, la inserción de mutaciones, truncamientos, adiciones, o sustituciones, como se desee para el uso previsto. Los vectores incluyen, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, etc. Por consiguiente, la secuencia que codifica la proteína Cry o variantes puede insertarse en el vector en un sitio de restricción apropiado. El plásmido resultante se usa para transformación de células de *E. coli*, cuyas células se cultivan en un medio nutriente adecuado, luego se recogen y se lisan, de manera que se recuperen cantidades utilizables del plásmido. Análisis de secuencias, análisis de fragmentos de restricción, electroforesis, y otros métodos biológicos bioquímicos-moleculares se llevan generalmente a cabo como métodos de análisis. Luego de cada manipulación, la secuencia de ADN usada puede cortarse y empalmarse a la siguiente secuencia de ADN. Cada secuencia de ADN manipulada puede clonarse en los mismos

plásmidos o en otros.

[0074] El uso de vectores que contienen ADN de transferencia (*T-DNA*) para la transformación de células vegetales se ha investigado intensivamente y se describe suficientemente en EP 120516; Lee y Gelvin (2008), Fraley *et al.* (1986), y An *et al.* (1985), y se encuentra bien establecido en el campo.

[0075] Una vez el ADN insertado se ha integrado en el genoma de la planta, es relativamente estable a lo largo de generaciones subsiguientes. El vector usado para transformar la célula vegetal contiene normalmente un gen marcador seleccionable que codifica una proteína que confiere a las células vegetales transformadas resistencia a un herbicida o un antibiótico, tal como bialafós, kanamicina, G418, bleomicina, o higromicina, *inter alia*. El gen marcador seleccionable, empleado individualmente, debe permitir en consecuencia la selección de células transformadas, mientras que el crecimiento de células que no contienen el ADN insertado se suprime por el compuesto selectivo.

[0076] Se dispone de un gran número de técnicas para insertar ADN en una célula de una planta anfitriona. Esas técnicas incluyen transformación con ADN de transferencia (*T-DNA*) producido por *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como el agente de transformación. Adicionalmente, pueden emplearse fusión de protoplastos vegetales con liposomas que contienen el ADN a producirse, inyección directa del ADN, transformación por biolística (bombardeo de micropartículas), o electroporación, así como otros posibles métodos.

[0077] En una incorporación preferida de la presente invención, se transformarán plantas con genes, en donde la utilización de codones de la región codificante de la proteína se ha optimizado para plantas. Véase, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5380831, la cual se incorpora por el presente por referencia. Además, ventajosamente, se usarán plantas que codifican una toxina trunca. La toxina trunca codificará normalmente alrededor de 55% a alrededor de 80% de la toxina de longitud completa. Métodos para crear genes *B.t.* sintéticos para uso en plantas son conocidos en el arte (Stewart, 2007).

[0078] Independientemente de la técnica de transformación, el gen se incorpora preferiblemente en un vector de transferencia de genes adaptado para expresar los genes de la toxina insecticida *B.t.* y variantes en la célula vegetal incluyendo en el vector un promotor vegetal. Además de promotores vegetales, pueden utilizarse eficientemente

promotores de una variedad de fuentes en células vegetales para expresar genes extraños. Por ejemplo, se pueden usar promotores de origen bacteriano, tales como el promotor de la octopina sintasa, el promotor de la nopalina sintasa, y el promotor de la mannopina sintasa. Pueden emplearse promotores de origen vírico vegetal, por ejemplo, los promotores 35S y 19S del Virus del Mosaico del Coliflor, un promotor del Virus del Mosaico de las Venas de la Yuca, y similares. Promotores vegetales incluyen, pero no se limitan a, subunidad pequeña (ssu - *small subunit*) de la ribulosa-1,6-bisfosfato (RUBP) carboxilasa, el promotor de la beta-conglicinina, el promotor de la faseolina, el promotor de la ADH (alcohol deshidrogenasa), los promotores de choque térmico, el promotor del ADF (*actin depolymerization factor* - factor de despolimerización de la actina), el promotor de la ubiquitina, el promotor de la actina, y promotores específicos de tejidos. Los promotores pueden contener asimismo ciertos elementos de secuencia potenciadora que pueden mejorar la eficiencia de transcripción. Potenciadores típicos incluyen, pero no se limitan a, ADHI-intrón 1 y ADHI-intrón 6. Pueden usarse promotores constitutivos. Promotores constitutivos dirigen la expresión continua de genes en casi todos los tipos de células y en casi todos los tiempos (v.g., actina, ubiquitina, CaMV 35S). Los promotores específicos de tejidos son responsables de la expresión de genes en tipos específicos de células o tejidos, tales como las hojas o semillas (v.g., promotores de zeína, oleosina, napina, ACP (Proteína Portadora de Acilo - *Acyl Carrier Protein*)), y estos promotores pueden usarse igualmente. Pueden utilizarse asimismo promotores que son activos durante una cierta fase del desarrollo de las plantas, así como activos en tejidos y órganos específicos de las plantas. Ejemplos de tales promotores incluyen, pero no se limitan a, promotores que son específicos de la raíz, específicos del polen, específicos del embrión, específicos del maíz (*corn silk specific*), específicos de la fibra de algodón, específicos del endosperma de la semilla, específicos del floema, y similares.

[0079] Bajo ciertas circunstancias puede ser deseable usar un promotor inducible. Un promotor inducible es responsable de la expresión de genes en respuesta a una señal específica, tal como: estímulo físico (v.g., genes de choque térmico); luz (v.g. RUBP carboxilasa); hormona (v.g., glucocorticoide); antibiótico (v.g., tetraciclina); metabolitos; y estrés (v.g., sequía). Pueden emplearse otros elementos deseables de transcripción y traducción que funcionan en plantas, tales como secuencias líderes 5' no traducidas, secuencias de terminación de transcripción de ARN y secuencias de señales con adición de poli-adenilato. Numerosos vectores de transferencia de genes específicos de plantas son conocidos en el arte.

[0080] Cultivos transgénicos que contienen rasgos de resistencia a insectos (IR - *insect*

resistance) son prevalecientes en plantas de maíz y algodón a lo largo y ancho de América del Norte, y la utilización de estos rasgos se está expandiendo globalmente. Cultivos transgénicos comerciales que combinan rasgos IR y de tolerancia a herbicidas (HT - *herbicide tolerance*) se han desarrollado por múltiples empresas de semillas. Éstos incluyen combinaciones de rasgos IR conferidos por proteínas insecticidas *B.t.* y rasgos HT tales como tolerancia a inhibidores de la Acetolactato Sintasa (ALS), tales como sulfonilureas, imidazolinonas, triazolopirimidina, sulfonanilidas, y similares, inhibidores de Glutamina Sintetasa (GS) tales como bialafós, glufosinato, y similares, inhibidores de 4-Hidroxi Fenil Piruvato Dioxigenasa (HPPD) tales como mesotriona, isoxaflutol, y similares, inhibidores de 5-Enol Piruvil Shikimate-3-Fosfato Sintasa (EPSPS) tales como glifosato y similares, e inhibidores de Acetil-Coenzima A Carboxilasa (ACCase) tales como haloxifop, quizalofop, diclofop, y similares. Son conocidos otros ejemplos en los cuales proteínas provistas transgénicamente aportan tolerancia de las plantas a clases químicas herbicidas tales como herbicidas de fenoxi ácidos y herbicidas de auxina piridiloxiacetatos (véase WO 2007/053482 A2), o herbicidas de fenoxi ácidos y herbicidas ariloxifenoxipropionatos (véase WO 2005107437 A2, A3). La capacidad de controlar problemas de plagas múltiples mediante rasgos IR es un concepto valioso de producto comercial, y la conveniencia de este concepto de producto se refuerza si se combinan rasgos de control de insectos y rasgos de control de malezas en la misma planta. Además, puede obtenerse un valor mejorado mediante combinaciones vegetales únicas de rasgos IR conferidos por una proteína insecticida *B.t.*, tal como la de la presente invención, con uno o más rasgos HT adicionales tales como los ya mencionados, más uno o más rasgos de entrada adicionales (v.g., resistencia a otros insectos conferida por proteínas insecticidas derivadas de *B.t.* u otras proteínas insecticidas, resistencia a insectos conferida por mecanismos tales como ARNi y similares, resistencia a nemátodos, resistencia a enfermedades, tolerancia al estrés, utilización mejorada de nitrógeno, y similares), o rasgos de volumen de producción (v.g., alto contenido de aceites, composición de aceite sano, mejoramiento nutricional, y similares). Tales combinaciones pueden obtenerse por propagación convencional (apilamiento de mejora genética - *breeding stack*) o conjuntamente como un episodio novedoso de transformación, que implica la introducción simultánea de múltiples genes (apilamiento molecular - *molecular stack*). Los beneficios incluyen la capacidad de manejar plagas de insectos y un control mejorado de malezas en una planta de cultivo que aporta beneficios secundarios al productor y/o el consumidor. Por consiguiente, la presente invención puede usarse en combinación con otros rasgos para proporcionar un paquete agronómico completo de calidad de del cultivo, mejorada con la capacidad de controlar en forma flexible y rentable cualquier número de problemas agronómicos.

Plagas blanco

[0081] Las toxinas DIG-3 de la invención son particularmente apropiadas para uso en el control de insectos lepidópteros. Los lepidópteros son un grupo importante de plagas agrícolas, hortícolas, y domésticas que causan una gran cantidad de daños cada año. Este orden de insectos abarca larvas y adultos que se alimentan de las hojas y las raíces. Las plagas de insectos lepidópteros incluyen, pero no se limitan a: *Achoria grisella*, *Acleris gloverana*, *Acleris variana*, *Adoxophyes orana*, *Agrotis ipsilon* (black cutworm), *Alabama argillacea*, *Alsophila pometaria*, *Amyelois transitella*, *Anagasta kuehniella*, *Anarsia lineatella*, *Anisota senatoria*, *Antheraea pernyi*, *Anticarsia gemmatilis*, *Archips* sp., *Argyrotaenia* sp., *Athetis mindara*, *Bombyx mori*, *Bucculatrix thurberiella*, *Cadra cautella*, *Choristoneura* sp., *Cochylis hospes*, *Colias eurytheme*, *Coreya cephalonica*, *Cydia latiferreanus*, *Cydia pomonella*, *Datana integerrima*, *Dendrolimus sibericus*, *Desmia fernalis*, *Diaphania hyalinata*, *Diaphania nitidalis*, *Diatraea grandiosella* (southwestern corn borer), *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer), *Ennomos subsignaria*, *Eoreuma loftini*, *Esphestia elutella*, *Erannis tilaria*, *Estigmene acrea*, *Eulia salubricola*, *Eupocoellia ambiguella*, *Eupoecilia ambiguella*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Euxoa messoria*, *Galleria mellonella*, *Grapholita molesta*, *Harrisina americana*, *Helicoverpa subflexa*, *Helicoverpa zea* (corn earworm), *Heliothis virescens* (tobacco budworm), *Hemileuca oliviae*, *Homoeosoma electellum* (sunflower head moth), *Hyphantia cunea*, *Keiferia lycopersicella*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*, *Lambdina fiscellaria lugubrosa*, *Leucoma salicis*, *Lobesia botrana*, *Loxagrotis albicosta* (western bean cutworm), *Loxostege sticticalis*, *Lymantria dispar*, *Macalla thyrissalis*, *Malacosoma* sp., *Mamestra brassicae*, *Mamestra configurata* (bertha army worm), *Manduca quinquemaculata*, *Manduca sexta* (tobacco horn worm), *Maruca testulalis*, *Melanchra picta*, *Operophtera brumata*, *Orgyia* sp., *Ostrinia nubilalis* (European corn borer), *Paleacrita vernata*, *Papiapema nebris* (common stalk borer), *Papilio cresphontes*, *Pectinophora gossypiella*, *Phryganidia californica*, *Phyllonorycter blancardella*, *Pieris napi*, *Pieris rapae*, *Plathypena scabra*, *Platynota flouendana*, *Platynota stultana*, *Platyptilia carduidactyla*, *Plodia interpunctella*, *Plutella xylostella* (diamondback moth), *Pontia protodice*, *Pseudaletia unipuncta* (armyworm), *Pseudoplasia includens*, *Rachiplusia nu* (Argentine looper), *Sabulodes aegrotata*, *Schizura concinna*, *Sitotroga cerealella*, *Spilonta ocellana*, *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm), *Spodoptera exigua* (beet armyworm), *Thaurnstopoea pityocampa*, *Ensola bisselliella*, *Trichoplusia hi*, *Udea rubigalis*, *Xylomyges curtails*, and *Yponomeuta padella*.

[0082] Se contempla asimismo el uso de toxinas DIG-3 para controlar plagas de coleópteros de plantas de cultivo. En algunas incorporaciones, pueden desplegarse

económicamente proteínas Cry para control de plagas de insectos que incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, gusanos de la raíz tales como *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm), *Diabrotica longicornis barberi* (northern corn rootworm), y *Diabrotica virgifera* (western corn rootworm), y gusanos tales como las larvas de *Cyclocephala borealis* (northern masked chafer), *Cyclocephala immaculate* (southern masked chafer), y *Popillia japonica* (Japanese beetle).

[0083] Se contempla asimismo el uso de las toxinas DIG-3 para controlar nemátodos parásitos incluyendo, pero no limitados a, nematodo del nudo de la raíz (*Meloidogyne icognita*) y nematodo del quiste de soya (*Heterodera glycines*).

Detección con anticuerpos de toxinas DIG-3

[0084] Anticuerpos anti-toxina. Anticuerpos contra las toxinas divulgadas en esta especificación, o contra toxinas equivalentes, o fragmentos de estas toxinas, pueden prepararse fácilmente usando procedimientos estándar en este arte. Tales anticuerpos son útiles para detectar la presencia de las toxinas DIG-3.

[0085] Una vez se ha aislado la toxina insecticida *B.t.*, pueden desarrollarse anticuerpos específicos para la toxina por métodos convencionales que son bien conocidos en el arte. Inyecciones repetidas en un anfitrión de elección durante un período de semanas o meses provocarán una respuesta inmunitaria y resultarán en títulos séricos significativos anti-toxina *B.t.* Anfitriones preferidos son especies mamíferas y especies sumamente preferidas son conejos, cabras, ovejas y ratones. Sangre extraída de tales animales inmunizados puede procesarse por métodos establecidos para obtener antisuero (anticuerpos policlonales) reactivos con la toxina insecticida *B.t.* El antisuero puede purificarse entonces por afinidad mediante adsorción a la toxina, de acuerdo con técnicas conocidas en el arte. Antisuero purificado por afinidad puede purificarse posteriormente aislando la fracción inmunoglobulina en el antisuero, utilizando procedimientos conocidos en el arte. El material resultante será una población heterogénea de inmunoglobulinas reactivas con la toxina insecticida *B.t.*

[0086] Anticuerpos anti-toxina *B.t.* pueden generarse asimismo preparando un inmunógeno semi-sintético conformado por un fragmento de péptido sintético de la toxina insecticida *B.t.*, conjugado con un portador inmunógeno. Numerosos esquemas e instrumentos útiles para elaborar fragmentos de péptidos son bien conocidos en el arte. Muchos portadores inmunógenos apropiados tales como albúmina sérica bovina o

hemocianina de lapa son igualmente bien conocidos en el arte, como lo son las técnicas para acoplar el inmunógeno y proteínas portadoras. Una vez se ha construido el inmunógeno semi-sintético, el procedimiento para elaborar anticuerpos específicos para el fragmento de toxina insecticida *B.t.* es idéntico a los utilizados para elaborar anticuerpos reactivos con la toxina *B.t.* natural.

[0087] Anticuerpos monoclonales (MAbs - *monoclonal antibodies*) anti-toxina *B.t.* se preparan fácilmente usando toxina insecticida *B.t.* purificada. Métodos para producir MAbs se han practicado durante más de 20 años y son bien conocidos por las personas de habilidad ordinaria en el arte. Inyecciones subcutáneas o intraperitoneales repetidas de la toxina insecticida *B.t.* purificada en coadyuvante provocarán una respuesta inmunitaria en la mayoría de los animales. Linfocitos B hiperinmunizados se extraen del animal y se fusionan con una línea de células compañera de fusión apropiada, capaz de cultivarse indefinidamente. Animales preferidos, cuyos linfocitos B pueden hiperinmunizarse y utilizarse en la producción de MAbs, son mamíferos. Animales más preferidos son ratas y ratones y la más preferida es la cepa de ratón BALB/c.

[0088] Numerosas líneas de células de mamífero son parejas de fusión apropiadas para la producción de hibridomas. Muchas de tales líneas se encuentran disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y proveedores comerciales. Líneas de células parejas de fusión preferidas se derivan de mielomas de ratón, y la línea de células de mieloma-656 HL-1® Friendly (Ventrex, Portland, ME) es la más preferida. Una vez fusionadas, los hibridomas resultantes se cultivan en un medio de crecimiento selectivo durante una o dos semanas. Dos sistemas de selección bien conocidos se encuentran disponibles para eliminar células de mieloma no fusionadas, o fusiones entre células de mieloma, del cultivo de hibridoma mixto. La elección del sistema de selección depende de la cepa de ratón inmunizado y la compañera de fusión de mieloma utilizada. Puede usarse el sistema de selección AAT, descrito por Taggart y Samloff, (1983); no obstante, se prefiere el sistema de selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina), descrito por Littlefield, (1964), debido a su compatibilidad con la cepa de ratón preferida y la compañera de fusión mencionada anteriormente. El medio de crecimiento agotado se tamiza con respecto a la secreción de MAbs inmuno-específicos. Procedimientos de enzimo-inmunoanálisis de adsorción (ELISA) son los mejor apropiados para este propósito; aunque son igualmente aceptables radioinmunoanálisis adaptados para tamizaje en grandes volúmenes. Pueden realizarse múltiples tamizajes, diseñados para reducir consecutivamente el número considerable de cultivos irrelevantes o menos deseados. Cultivos que secretan MAbs reactivos con la toxina insecticida *B.t.* pueden tamizarse con

respecto a reactividad cruzada con toxinas insecticidas *B.t.* conocidas. MAbs que se fijan preferencialmente a la toxina insecticida *B.t.* preferida pueden isotiparse utilizando análisis disponibles en el comercio. MAbs preferidos son de la clase IgG, y MAbs más altamente preferidos son de los subisotipos IgG₁ y IgG_{2a}.

[0089] Cultivos de hibridoma que secretan los MAbs preferidos pueden subclonarse varias veces para establecer la monoclonalidad y la estabilidad. Métodos bien conocidos para subclonar cultivos de células eucariotas, no adherentes, incluyen técnicas de citofluorimetría de flujo, agarosa blanda y dilución limitante. Después de cada subclonación, los cultivos resultantes se re-analizan preferiblemente con respecto a la secreción de anticuerpos e isotipo para garantizar que se ha establecido un cultivo secretor de MAbs preferido.

[0090] Los anticuerpos anti-toxina *B.t.* son útiles en varios métodos de detectar la toxina insecticida *B.t.* reivindicada de la presente invención, y variantes o fragmentos de la misma. Es bien sabido que los anticuerpos etiquetados con un grupo reportero pueden utilizarse para identificar la presencia de antígenos en una variedad de ambientes. Anticuerpos etiquetados con radioisótopos se han usado durante décadas en radioinmunoanálisis para identificar, con gran precisión y sensibilidad, la presencia de antígenos en una variedad de fluidos biológicos. Más recientemente, anticuerpos etiquetados con enzimas se han empleado como un sustituto de los anticuerpos radiomarcados en el análisis ELISA. Además, anticuerpos inmunorreactivos a la toxina insecticida *B.t.* de la presente invención pueden fijarse a una sustancia inmovilizadora, tal como un pocillo de poliestireno o partícula, y usarse en inmunoanálisis para determinar si la toxina insecticida *B.t.* está presente en una muestra de prueba.

Detección utilizando sondas de ácido nucleico

[0091] Un método adicional para identificar las toxinas y genes de la invención en cuestión es mediante el uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias nucleotídicas detectables. Estas secuencias pueden hacerse detectables en virtud de una etiqueta radioactiva apropiada, o pueden elaborarse inherentemente fluorescentes como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6268132. Como es bien conocido en el arte, si la molécula de la sonda y la secuencia de ácido nucleico hibridan formando fuertes enlaces de apareamiento de bases entre las dos moléculas, puede asumirse razonablemente que la sonda y la muestra tienen una homología de secuencia sustancial. Preferiblemente, la hibridación se conduce bajo condiciones rigurosas por técnicas bien

conocidas en el arte, como se describe, por ejemplo, en Keller y Manak (1993). La detección de la sonda ofrece un medio para determinar en una manera conocida si ha ocurrido hibridación. Tal análisis de sonda ofrece un método rápido para identificar genes codificantes de toxinas de la invención en cuestión. Los segmentos de nucleótidos que se usan como sondas de acuerdo con la invención pueden sintetizarse empleando un sintetizador de ADN y procedimientos estándar. Estas secuencias nucleotídicas pueden utilizarse asimismo como cebadores de PCR para amplificar genes de la invención en cuestión.

Hibridación de ácido nucleico

[0092] Como es bien sabido por las personas expertas en biología molecular, la similitud de dos ácidos nucleicos puede caracterizarse por su tendencia a hibridar. Tal como se emplea en esta especificación los términos "condiciones rigurosas" o "condiciones de hibridación rigurosas" tienen como finalidad referirse a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará (se apareará) a su secuencia blanco en un grado detectablemente mayor que a otras secuencias (v.g., por lo menos 2 veces sobre el fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Controlando la rigurosidad de la hibridación y/o las condiciones de lavado, pueden identificarse secuencias blanco que son 100% complementarias a la sonda (sondeo homólogo - *homologous probing*). Alternativamente, las condiciones de rigurosidad pueden ajustarse para permitir cierto apareamiento incorrecto en secuencias, de manera que se detecten grados menores de similitud (sondeo heterólogo - *heterologous probing*). Generalmente, una sonda tiene menos de alrededor de 1000 nucleótidos de longitud, preferiblemente menos de 500 nucleótidos de longitud.

[0093] Normalmente, condiciones rigurosas serán aquellas en las cuales la concentración salina es menos de alrededor de 1.5 M de iones de Na de concentración, por lo general alrededor de 0.01 a 1.0 M de iones de Na de concentración (u otras sales) con un pH 7.0 a pH 8.3 y la temperatura es por lo menos alrededor de 30°C para sondas cortas (v.g., 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos alrededor de 60°C para sondas largas (v.g., mayores que 50 nucleótidos). Condiciones rigurosas pueden lograrse asimismo con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Condiciones ejemplares de baja rigurosidad incluyen hibridación con una solución amortiguadora de 30% a 35% formamida, 1 M NaCl, 1% SDS (dodecil sulfato sódico) a 37°C y un lavado en 1X a 2X SSC (20X SSC = 3.0 M NaCl/0.3 M citrato trisódico) a 50°C a 55°C. Condiciones ejemplares de rigurosidad moderada incluyen hibridación en 40% a 45% formamida, 1.0 M

NaCl, 1% SDS a 37°C y un lavado en 0.5X a 1X SSC a 55°C a 60°C. Condiciones ejemplares de alta rigurosidad incluyen hibridación en 50% formamida, 1 M NaCl, 1% SDS a 37°C y un lavado en 0.1X SSC a 60°C a 65°C. Opcionalmente, amortiguadores de lavado pueden contener alrededor de 0.1% a alrededor de 1% SDS. La duración de la hibridación es generalmente menos de alrededor de 24 horas, usualmente alrededor de 4 a alrededor de 12 horas.

[0094] La especificidad es normalmente la función de lavados pos-hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para ADN/híbridos de ADN, el punto de fusión térmica (T_m) es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la cual 50% de una secuencia blanco complementaria se hibrida a una sonda perfectamente apareada. T_m se reduce en alrededor de 1°C por cada 1% de apareamiento incorrecto; por consiguiente, la T_m , las condiciones de hibridación, y/o las condiciones de lavado pueden ajustarse para facilitar el emparejamiento de secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con > 90% de identidad, la T_m puede disminuirse 10°C. Generalmente, se seleccionan condiciones rigurosas para que sean alrededor de 5°C menores que la T_m para la secuencia específica y su complemento, con una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, condiciones altamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1°C, 2°C, 3°C, o 4°C menos que la T_m ; condiciones moderadamente rigurosas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, o 10°C menos que la T_m , y condiciones de baja rigurosidad pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, o 20°C menos que la T_m .

[0095] La T_m (en °C) puede determinarse experimentalmente o puede aproximarse mediante cálculo. Para ADN – híbridos de ADN, la T_m puede aproximarse de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984):

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6(\log M) + 0.41(\%GC) - 0.61(\% \text{ formamida}) - 500/L;$$

donde M es la molaridad de cationes monovalentes, %GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % formamida es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbridos en pares de bases.

[0096] Alternativamente, la T_m se describe por la siguiente fórmula (Beltz *et al.*, 1983).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%GC) - 0.61(\% \text{ formamida}) - 600/L$$

donde $[\text{Na}^+]$ es la molaridad de iones de sodio, %GC es el porcentaje de los nucleótidos guanosina y citosina en el ADN, % formamida es el porcentaje de formamida en la solución

de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases.

[0097] Usando las ecuaciones, composiciones de hibridación y lavado, y T_m deseada, las personas expertas en el arte entenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado están inherentemente descritas. Si el grado deseado de apareamiento incorrecto (*mismatching*) resulta en una T_m de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), se prefiere aumentar la concentración de SSC, de manera que pueda usarse una temperatura más elevada. Una guía extensiva a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) y Ausubel *et al.*, (1995). Véase asimismo Sambrook *et al.*, (1989).

[0098] La hibridación de ADN inmovilizado en Southern blots con sondas específicas de genes, marcadas radioactivamente, puede realizarse por métodos estándar (Sambrook *et al.*, *supra*). Isótopos radioactivos usados para marcar sondas de polinucleótidos pueden incluir ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C , o ^3H . La incorporación de isótopos radioactivos en moléculas de sondas de polinucleótidos puede hacerse por cualquiera de varios métodos bien conocidos por las personas expertas en el campo de la biología molecular. (Véase, v.g. Sambrook *et al.*, *supra*.) En general, la hibridación y los lavados subsiguientes pueden llevarse a cabo bajo condiciones rigurosas que permitan la detección de secuencias blanco con homología con los genes, que codifican la toxina reivindicada. Para sondas génicas de ADN bicatenario, la hibridación puede llevarse a cabo de un día para otro a 20°-25°C por debajo de la T_m del híbrido de ADN en 6X SSPE, 5X Solución de Denhardt, 0.1% SDS, 0.1 mg/mL ADN desnaturalizado [20X SSPE es 3M NaCl, 0.2 M NaHPO_4 , y 0.02M EDTA (sal de sodio de ácido etilendiaminotetraacético); 100X Solución de Denhardt es 20 gm/L Polivinilpirrolidona, 20 gm/L Ficoll tipo 400 y 20 gm/L Albúmina Sérica Bovina (fracción V)].

[0100] Los lavados pueden llevarse típicamente en la siguiente forma:

Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos en 1X SSPE, 0.1% SDS (lavado de baja rigurosidad).

Una vez a $T_m - 20^\circ\text{C}$ durante 15 minutos en 0.2X SSPE, 0.1% SDS (lavado de rigurosidad moderada).

[0101] Para sondas de oligonucleótidos, la hibridación puede llevarse a cabo de un día para otro a 10°-20°C por debajo la T_m del híbrido en 6X SSPE, 5X Solución de Denhardt, 0.1% SDS, 0.1 mg/mL de ADN desnaturalizado. La T_m para sondas de oligonucleótidos

puede determinarse por la siguiente fórmula (Suggs *et al.*, 1981).

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(\text{número de pares de bases T/A}) + 4(\text{número de pares de bases G/C})$$

[0102] Los lavados pueden llevarse normalmente a cabo en la siguiente forma:

Dos veces a temperatura ambiente durante 15 minutos IX SSPE, 0.1% SDS (lavado de baja rigurosidad).

Una vez a la temperatura de hibridación durante 15 minutos en IX SSPE, 0.1% SDS (lavado de rigurosidad moderada).

[0103] Las moléculas de sondas para hibridación y moléculas híbridas formadas entre moléculas sonda y blanco pueden hacerse detectables por medios distintos al etiquetado radioactivo. Tales métodos alternos pretenden estar dentro del ámbito de esta invención.

[0104] Todas, las patentes, solicitudes de patente, solicitudes provisionales, y publicaciones referidas o citadas en esta especificación se incorporan por referencia en su totalidad, en la medida en que no sean inconsistentes con las enseñanzas explícitas de esta especificación. A menos que se indique o implique específicamente lo contrario, los términos "un/una", "uno/una", y "el/la" significan "por lo menos uno/una", tal como se emplea en esta especificación. Mediante el uso del término "material genético" en esta especificación, se quiere incluir todos los genes, ácidos nucleicos, ADN y ARN.

[0105] Para designaciones de residuos nucleotídicos de polinucleótidos, ADN, ARN, oligonucleótidos, y cebadores, y para las designaciones de residuos de aminoácidos de proteínas, se emplean abreviaturas IUPAC estándar a todo lo largo de este documento. Las secuencias de ácido nucleico se presentan en la dirección estándar 5' a 3', y las secuencias de proteínas se presentan en la dirección estándar amino (N) terminal a carboxi (C) terminal.

[0106] A continuación se incluyen ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Debe entenderse que los ejemplos e incorporaciones descritos en esta especificación son para fines ilustrativos únicamente y que varias modificaciones o cambios, a la luz de los mismos, serán sugeridos a las personas expertas en el arte y tienen que incluirse en el espíritu y alcance de esta solicitud y en el ámbito de las reivindicaciones anexas. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son en volumen, a menos que se anote lo contrario. Todas las temperaturas son en grados Celsius.

EJEMPLO 1

Aislamiento de un gen que codifica una toxina DIG-3

[0107] Ácido nucleico que codifica la proteína Cry insecticida, designada en esta especificación como DIG-3, se aisló de ADN genómico de la cepa *B.t.* PS46L por PCR, utilizando un cebador primario redundante (*a degenerate forward primer*) que hibridó a las bases 1286 a 1311 de SEQ ID NO:1, y un cebador inverso incorrectamente emparejado (*a mismatched reverse primer*), que hibridó al complemento de las bases 2480 a 2499 de SEQ ID NO: 1. Este par de cebadores se utilizó para amplificar un fragmento de 1214 bp, correspondiente a los nucleótidos 1286 a 2499 de SEQ ID NO:1. Esta secuencia se usó como el punto de anclaje para iniciar el desplazamiento por el genoma (*genome walking*) usando métodos adaptados del GenomeWalker™ Universal Kit (Clontech, Palo Alto, CA). Se determinó la secuencia de ácido nucleico de un fragmento que cubría la región codificante DIG-3. SEQ ID NO:1 es la secuencia nucleotídica de 3771 bp que codifica la proteína DIG-3 de longitud completa. SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos de la proteína DIG-3 de longitud completa, deducida de la SEQ ID NO:1. Se anota que en la especie *Bacillus*, regiones codificantes de la proteína, tales como la de SEQ ID NO:1, pueden iniciarse con el codón TTG, el cual representa translacionalmente el aminoácido metionina.

EJEMPLO 2

Delección de las α -hélices del dominio I de DIG-3

[0108] Para mejorar las propiedades insecticidas de la toxina DIG-3, se realizan delecciones graduales, en serie, cada una de las cuales elimina parte del N-término de la proteína DIG-3. Las delecciones eliminan parte o la totalidad de la α -hélice 1 y parte o la totalidad de la α -hélice 2 en el dominio I, manteniendo al mismo tiempo la integridad estructural de la α -hélice 3 a la α -hélice 7.

[0109] Las delecciones se diseñaron en la siguiente forma. Este ejemplo utiliza la secuencia de ADN quimérico de longitud completa que codifica la proteína DIG-3 de longitud completa, v.g. SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, respectivamente para ilustrar los principios de diseño con 67 variantes específicas. Utiliza la secuencia quimérica de SEQ ID NO:5 (ADN que codifica el segmento de la toxina central DIG-3 fusionada al segmento de la protoxina CryIAb) para proporcionar 67 variantes específicas adicionales. Una persona experta en el arte entenderá que otras secuencias de ADN, que codifican toda o una porción N-terminal de la proteína DIG-3, pueden manipularse de manera semejante para obtener el

resultado deseado. Para diseñar la secuencia codificante de la primera variante eliminada, se eliminan todas las bases que codifican la α -hélice 1 hasta el codón para el residuo de prolina cerca del comienzo de la α -hélice 2A (*es decir*, P73 para la proteína DIG-3 de longitud completa de SEQ ID NO:2). Por consiguiente, la eliminación de las bases 1 a 216 de SEQ ID NO:1 elimina la secuencia codificante para los aminoácidos 1 a 72 de SEQ ID NO:2. La reintroducción de un codón ATG (metionina) indicador de la traducción al comienzo (*es decir*, frente al codón correspondiente al aminoácido 73 de la proteína de longitud completa) permite la secuencia codificante de la variante eliminada, que incluye el marco de lectura abierto de 3555 bases, que codifica una proteína DIG-3 de variante eliminada que incluye 1185 aminoácidos (*es decir*, metionina más los aminoácidos 73 a 1256 de la proteína DIG-3 de longitud completa). Deleciones graduales, en serie, que eliminan codones adicionales para un solo aminoácido correspondiente a los residuos 73 a 112 de la proteína DIG-3 de longitud completa de SEQ ID NO:2, proporcionan variantes que carecen de parte o la totalidad de la α -hélice 2A y la α -hélice 2B. Por consiguiente, una secuencia codificante de una segunda variante eliminada, diseñada, requiere la eliminación de las bases 1 a 219 de SEQ ID NO:1, eliminando así la secuencia codificante para los aminoácidos 1-73. La restauración de un marco de lectura abierto funcional se consigue nuevamente mediante la reintroducción de un codón de metionina de iniciación de traducción en el comienzo de la secuencia codificante restante, permitiendo así una segunda secuencia codificante de variante eliminada que tiene un marco de lectura abierto de 3552 bases, que codifican una proteína DIG-3 de variante eliminada, que incluye 1184 aminoácidos (*es decir*, metionina más los aminoácidos 74 a 1256 de la proteína DIG-3 de longitud completa). La última secuencia codificante de la variante eliminada diseñada requiere la eliminación de las bases 1 a 336 de SEQ ID NO:1, suprimiendo así la secuencia codificante para los aminoácidos 1 a 112, y, después de la reintroducción de un codón de metionina de iniciación de traducción, proveyendo una secuencia codificante de una variante de deleción, que tiene un marco de lectura abierto de 3435 bases, que codifica una proteína DIG-3 de variante de deleción de 1145 aminoácidos (*es decir*, metionina más los aminoácidos 113 a 1256 de la proteína DIG-3 de longitud completa). Como se ejemplifica, luego de la eliminación de la secuencia de deleción, se agrega un codón de metionina iniciador al comienzo de la secuencia codificante restante, para restablecer un marco de lectura abierto funcional. Además, como se describe, tiene que añadirse un codón de glicina adicional entre el codón de metionina y el codón para el aminoácido determinante de inestabilidad, en el caso de que la eliminación de la secuencia removida deje expuesto en el N-término de la porción restante de la proteína de longitud completa uno de los aminoácidos determinantes de inestabilidad, como se contempla anteriormente.

[0110] Tabla 3 describe variantes específicas diseñadas de acuerdo con la estrategia ya descrita.

Tabla 3

Secuencias proteínicas de variante de delección de la proteína DIG-3 de longitud completa de SEQ ID NO:2 y la secuencia proteínica de fusión de SEQ ID NO:5.

Variante de Delección de DIG-3	Residuos agregados al término NH2	Residuos de SEQ ID NO:2	Variante de Delección DIG-3	Residuos agregados al término NH2	Residuos de SEQ ID NO:5
1	M	73-1256	68	M	73-1188
2	MG	73-1256	69	MG	73-1188
3	M	74-1256	70	M	74-1188
4	MG	74-1256	71	MG	74-1188
5	M	75-1256	72	M	75-1188
6	M	76-1256	73	M	76-1188
7	M	77-1256	74	M	77-1188
8	M	78-1256	75	M	78-1188
9	MG	78-1256	76	MG	78-1188
10	M	79-1256	77	M	79-1188
11	M	80-1256	78	M	80-1188
12	M	81-1256	79	M	81-1188
13	MG	81-1256	80	MG	81-1188
14	M	82-1256	81	M	82-1188
15	MG	82-1256	82	MG	82-1188
16	M	83-1256	83	M	83-1188
17	M	84-1256	84	M	84-1188
18	MG	84-1256	85	MG	84-1188
19	M	85-1256	86	M	85-1188
20	MG	85-1256	87	MG	85-1188
21	M	86-1256	88	M	86-1188
22	M	87-1256	89	M	87-1188
23	M	88-1256	90	M	88-1188
24	M	89-1256	91	M	89-1188
25	MG	89-1256	92	MG	89-1188
26	M	90-1256	93	M	90-1188
27	MG	90-1256	94	MG	90-1188
28	M	91-1256	95	M	91-1188
29	MG	91-1256	96	MG	91-1188
30	M	92-1256	97	M	92-1188
31	M	93-1256	98	M	93-1188
32	M	94-1256	99	M	94-1188
33	M	95-1256	100	M	95-1188
34	MG	95-1256	101	MG	95-1188
35	M	96-1256	102	M	96-1188
36	MG	96-1256	103	MG	96-1188
37	M	97-1256	104	M	97-1188
38	MG	97-1256	105	MG	97-1188

39	M	98-1256	106	M	98-1188
40	MG	98-1256	107	MG	98-1188
41	M	99-1256	108	M	99-1188
42	MG	99-1256	109	MG	99-1188
43	M	100-1256	110	M	100-1188
44	MG	100-1256	111	MG	100-1188
45	M	101-1256	112	M	101-1188
46	MG	101-1256	113	MG	101-1188
47	M	102-1256	114	M	102-1188
48	MG	102-1256	115	MG	102-1188
49	M	103-1256	116	M	103-1188
50	MG	103-1256	117	MG	103-1188
51	M	104-1256	118	M	104-1188
52	M	105-1256	119	M	105-1188
53	MG	105-1256	120	MG	105-1188
54	M	106-1256	121	M	106-1188
55	MG	106-1256	122	MG	106-1188
56	M	107-1256	123	M	107-1188
57	MG	107-1256	124	MG	107-1188
58	M	108-1256	125	M	108-1188
59	MG	108-1256	126	MG	108-1188
60	M	109-1256	127	M	109-1188
61	MG	109-1256	128	MG	109-1188
62	M	110-1256	129	M	110-1188
63	MG	110-1256	130	MG	110-1188
64	M	111-1256	131	M	111-1188
65	MG	111-1256	132	MG	111-1188
66	M	112-1356	133	M	112-1356
67	M	113-1256	134	M	113-1188

[0111] Ácidos nucleicos que codifican las toxinas descritas en Tabla 3 se diseñan de acuerdo con los principios generales para genes sintéticos previstos para expresión en plantas, como se discutió anteriormente.

EJEMPLO 3

Diseño de una versión optimizada en una planta de la secuencia codificante para la proteína DIG-3 insecticida *B.t.*

[0112] Se diseñó y sintetizó una secuencia de ADN que tenía una preferencia codónica vegetal (*a plant codon bias*) para producir la proteína DIG-3 en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas transgénicas. Se calculó una tabla de utilización de codones para maíz (*Zea mays* L.) de 706 secuencias codificantes de proteína (CDs – *coding sequences*) obtenidas de secuencias depositadas en GenBank. Tablas de utilización de codones para tabaco (*Nicotiana tabacum*, 1268 CDs), canola (*Brassica napus*, 530 CDs), algodón (*Gossypium hirsutum*, 197 CDs), y soya (*Glycine max*; *ca.* 1000 CDs) se descargaron de los datos en el

sitio de Internet <http://www.kazusa.or.jp/codon/>. Un conjunto de codones con preferencia codónica (*a biased codon set*) que incluye codones altamente utilizados, comunes a conjuntos de datos tanto de maíz como de dicotiledóneas, en cantidades relativas promedio ponderadas apropiadamente, se calculó luego de omitir cualquier codón redundante usado menos de alrededor de 10% de los usos de codones totales para ese aminoácido en cualquiera de los dos tipos de plantas. Para derivar una secuencia optimizada de planta que codifica la proteína DIG-3, se hicieron sustituciones de codones a la secuencia de ADN DIG-3 determinada experimentalmente, de modo que la secuencia de ADN resultante tuviera la composición de codones general de la tabla de desviación de codones optimizada en la planta. Se realizaron otros refinamientos de la secuencia para eliminar sitios indeseados de enzimas de restricción, sitios potenciales de corte y empalme de intrones de la planta, largos tramos de residuos A/T o C/G, y otros motivos que podrían interferir la estabilidad, transcripción, o traducción del ARN de la región codificante en células vegetales. Se hicieron otros cambios para introducir sitios deseados de reconocimiento de enzimas de restricción, y para eliminar largos marcos de lectura abiertos internos (marcos distintos de +1). Estos cambios se hicieron todos dentro de las limitaciones de conservar la composición de codones con preferencia codónica vegetal. La síntesis de la secuencia diseñada se realizó por un proveedor comercial (DNA2.0, Menlo Park, CA).

[0113] Orientación adicional con respecto a la producción de genes sintéticos puede encontrarse en, por ejemplo, WO 97/13402 y la Patente de los Estados Unidos No. 5380831.

[0114] Una secuencia de ADN optimizada en una planta que codifica la toxina DIG-3 de longitud completa se da en SEQ ID NO:3. Una secuencia de ADN optimizada en una dicotiledónea, que codifica el segmento de la protoxina CryIAb, se divulga como SEQ ID NO:6. Una secuencia de ADN optimizada en maíz, que codifica el segmento de la protoxina CryIAb, se divulga como SEQ ID NO:7.

EJEMPLO 4

Construcción de plásmidos de expresión que codifican la toxina insecticida DIG-3 y expresión en anfitriones bacterianos

[0115] Se utilizaron métodos de clonación estándar en la construcción de plásmidos de expresión de *Pseudomonas fluorescens* (Pf), modificados por técnicas de ingeniería genética para producir proteínas DIG-3 de longitud completa, mediante regiones codificantes optimizadas en una planta. Se obtuvieron endonucleasas de restricción de New

England BioLabs (NEB; Ipswich, MA) y se utilizó T4 ADN Ligasa (Invitrogen) para el ligamiento del ADN. Se realizaron preparaciones de plásmidos utilizando el Kit NucleoBond® Xtra (Macherey-Nagel Inc, Bethlehem, PA) o el Kit® Plasmid Midi (Qiagen), siguiendo las instrucciones de los proveedores. Se purificaron fragmentos de ADN usando el cartucho Millipore Ultrafree®-DA (Billerica, MA), luego de electroforesis en gel de Tris-acetato de agarosa.

[0116] La estrategia básica de clonación incluía subclonar la secuencia codificante (CDS) de la toxina DIG-3 en pDOW1169 en los sitios de restricción *SpeI* y *XhoI*, con lo cual se pone bajo el control de expresión del promotor *Ptac* y el terminador *rrnBT1T2* del plásmido pKK223-3 (PL Pharmacia, Milwaukee, WI). pDOW1169 es un plásmido de copia media con el origen de replicación RSF1010, el gen *apyrF*, y un sitio de unión a ribosoma precedente a los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, en los cuales pueden introducirse fragmentos de ADN que contienen regiones codificantes de proteínas, (Solicitud de los Estados Unidos 20080193974). El plásmido de expresión, designado pDAB4171, se transforma por electroporación en DC454 (una cepa natural próxima de *P. fluorescens* que tiene mutaciones $\Delta pyrF$ y $lsc::lacI^{Q1}$), o sus derivados, recuperados en medio hidrolisato SOC-Soy, y se plantó en medio selectivo (agar de glucosa M9 carente de uracilo, Sambrook *et al.*, *supra*). Los detalles de las manipulaciones microbiológicas se encuentran disponibles en Squires *et al.*, (2004), Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20060008877, Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20080193974, y Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20080058262, incorporadas en esta especificación por referencia. En primer lugar se tamizaron las colonias mediante PCR y los clones positivos se analizaron entonces mediante digestión de restricción de ADN plasmídico miniprep. Se secuenció ADN plasmídico de los clones seleccionados que contenían insertos, usando Big Dye® Terminator versión 3.1, como se recomienda por el proveedor (Applied Biosystems/Invitrogen), o por contrato con un proveedor de secuenciamiento comercial (MWG Biotech, Huntsville, AL). Se ensamblaron y analizaron los datos de la secuencia utilizando el software Sequencher™ (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI).

[0117] Análisis de crecimiento y expresión en frascos de agitación. La producción de la toxina DIG-3 para caracterización y bioanálisis de insectos se llevó a cabo mediante cepas de *P. fluorescens* desarrolladas en frascos de agitación que albergaban los constructos de expresión (v.g. clon DP2826). Se utilizaron cultivos de semillas cultivadas en medio M9 suplementado con 1% glucosa y elementos trazadores para inocular 50 mL de medio mínimo definido con 5% glicerol (Teknova Catálogo No. 3D7426, Hollister, CA). Se indujo la expresión del gen de la toxina DIG-3 por el promotor *Ptac* mediante la adición de

isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), luego de una incubación inicial de 24 horas a 30° con agitación. Se tomaron muestras de los cultivos al momento de la inducción y en varios tiempos pos-inducción. Se cuantificó la densidad de las células mediante densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀). Puede utilizarse igualmente otro medio de cultivo apropiado para crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, como se describe en Huang *et al.*, (2007) y Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20060008877.

[0118] Fraccionamiento de células y análisis SDS-PAGE de muestras en frascos de agitación. En cada momento de muestreo, se ajustó la densidad de las células a OD₆₀₀ = 20 y alícuotas de 1 mL se centrifugaron a 14000 x g durante cinco minutos. Los sedimentos celulares se congelaron a -80°. Se generaron fracciones solubles e insolubles de las muestras de los sedimentos celulares congelados de los frascos de agitación usando Solución de Extracción de Proteína Bacteriana EasyLyse™ (EPICENTRE® Biotechnologies, Madison, WI). Cada sedimento celular se resuspendió en 1 mL de solución EasyLyse™ y se diluyó posteriormente 1:4 en amortiguador de lisis y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. El lisado se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4° y el sobrenadante se recuperó como la fracción soluble. El sedimento celular (fracción insoluble) se resuspendió entonces en un volumen igual de solución salina amortiguada con fosfato (PBS; 11.9 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH7.4).

[0119] Se mezclaron las muestras 1:1 con 2X amortiguador de muestreo Laemmli que contenía P-mercaptoetanol (Sambrook *et al.*, *supra.*) y se hirvieron durante 5 minutos antes de cargarlas en geles Criterion XT® Bis-Tris 12% (Bio-Rad Inc., Hercules, CA.) Se realizó electroforesis en el amortiguador recomendado XT MOPS. Los geles se tiñeron con colorante Bio-Safe Coomassie, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Bio-Rad) y se radiografiaron, utilizando el sistema de generación de imágenes Alpha Innotech (San Leandro, CA).

[0120] Preparación del cuerpos de inclusión. Las preparaciones de los cuerpos de inclusión (IB – *inclusion body*) de la proteína Cry se realizaron en células de fermentaciones de *P. fluorescens* que produjeron la proteína insecticida *B.t.* insoluble, como se demostró por SDS-PAGE y MALDI-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry). Sedimentos celulares de *P. fluorescens* se descongelaron en un baño maría a 37°. Las células se resuspendieron a 25% p/v en amortiguador de lisis (50 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 20 mM sal disódica de EDTA (ácido etilendiamonotetraacético), 1% Triton X-100, y 5 mM Ditiotreitól (DTT); 5 mL/L de

cóctel de inhibidor de proteasa bacteriana (P8465 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) se agregaron justo antes del uso). Las células se suspendieron usando un homogenizador portátil con la graduación mínima (*at lowest setting*) (Tissue Tearor, BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK). Se agregó lisozima (25 mg de Sigma L7651, de clara de huevo de gallina) a la suspensión de células mezclando con una espátula de metal, y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La suspensión se enfrió sobre hielo durante 15 minutos, luego se sonicó utilizando un sonicador Branson 250 (dos sesiones de 1 minuto, a un ciclo de servicio de 50%, 30% de volumen de producción). La lisis de las células se verificó por microscopia. Se agregaron 25 mg más de lisozima si era necesario, y se repitieron la incubación y la sonicación. Cuando se confirmó la lisis de las células mediante microscopia, el lisado se centrifugó a 11.500 x g durante 25 minutos (4°) para formar el sedimento celular IB, y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular IB se resuspendió con 100 mL de amortiguador de lisis, se homogenizó con el mezclador portátil y se centrifugó como ya se indicó. El sedimento celular IB se lavó repetidamente por resuspensión (en 50 mL de amortiguador de lisis), homogenización, sonicación, y centrifugación hasta que el sobrenadante se volvió incoloro y el sedimento celular IB se solidificó y adquirió un color blancuzco. Para el lavado final, el sedimento celular IB se resuspendió en agua destilada, estérilmente filtrada (0.22 µm), que contenía 2 mM EDTA, y se centrifugó. El sedimento celular final se resuspendió en agua destilada, estérilmente filtrada, que contenía 2 mM EDTA, y se almacenó en alícuotas de 1 mL a -80°.

[0121] Se efectuaron análisis SDS-PAGE y cuantificación de la proteína en preparaciones IB descongelando una alícuota de 1 mL del sedimento celular IB y diluyendo 1:20 con agua destilada, estérilmente filtrada. La muestra diluida se hirvió entonces con 4X de amortiguador de muestra reductor [250 mM Tris, pH6.8, 40% glicerol (v/v), 0.4% Azul Bromofenol (p/v), 8% SDS (p/v) y 8% β-Mercapto-etanol (v/v)] y se cargó entonces en una Novex® 4-20% Tris-Glicina, gel de 12+2 pocillos (Invitrogen) corrido con 1X Tris/Glicina/amortiguador SDS (BioRad). El gel se corrió durante 60 min a 200 voltios, luego se tinturó con Azul Coomassie (50% G-250/50% R-250 en 45% metanol, 10% ácido acético), y se descoloró con 7% ácido acético, 5% metanol en agua destilada. La cuantificación de las bandas blanco se hizo comparando los valores densitométricos para las bandas contra muestras de Albúmina Sérica Bovina (BSA - *Bovine Serum Albumin*), corridas en el mismo gel para generar una curva estándar.

[0122] Solubilización de cuerpos de inclusión. Seis mL de suspensión de cuerpos de inclusión del clon Pf DP2826 (que contenía 32 mg/mL de proteína DIG-3) se centrifugaron en la graduación máxima de una microcentrífuga modelo Eppendorf 5415C

(aproximadamente 14.000 x g) para sedimentar (*to pellet*) las inclusiones. Se retiró el sobrenadante del amortiguador de almacenamiento y se reemplazó con 25 mL de 100 mM amortiguador de carbonato sódico, pH 11, en un tubo cónico de 50 mL. Las inclusiones se resuspendieron usando una pipeta y se sometieron a vorticidad para mezclar concienzudamente. El tubo se puso en una plataforma suavemente oscilante a 4° de un día para otro para extraer la proteína blanco. El extracto se centrifugó a 30.000 x g durante 30 min a 4°, y el sobrenadante resultante se concentró 5 veces utilizando un aparato filtrante centrífugo con celulosa regenerada Amicon Ultra-15 (corte de peso molecular 30.000; Millipore). El amortiguador de mezcla se cambió entonces a 10 mM CAPS [ácido 3-(ciclohexamino)-l-propanosulfónico] pH 10, usando columnas PD-10 desechables (GE Healthcare, Piscataway, NJ).

[0123] Electroforesis en gel. El extracto concentrado se preparó para electroforesis diluyendo 1:50 en amortiguador de muestra NuPAGE® LDS (Invitrogen) que contenía 5 mM ditiotritol como agente reductor y se calentó a 95° durante 4 minutos. La muestra se cargó en calles duplicadas de un gel 4-12% NuPAGE® gel junto con cinco estándares BSA que variaban de 0.2 a 2 µg/calle (para generación de una curva estándar). Se aplicó voltaje a 200V usando amortiguador de electroforesis (*running buffer*) MOPS SDS (Invitrogen) hasta que el colorante de rastreo llegó al fondo del gel. El gel se tinturó con 0.2% Azul Coomassie G-250 en 45% metanol, 10% ácido acético, y se retiró el colorante, primero brevemente con 45% metanol, 10% ácido acético, y luego en forma prolongada con 7% ácido acético, 5% metanol hasta que se aclaró el fondo. Luego del retiro del colorante, el gel se escaneó con un Biorad Fluor-S Multimager. Se utilizó el Software Quantity One v.4.5.2 del instrumento para obtener volúmenes, de los que se había restado el fondo, de las bandas de proteína coloreada y para generar la curva estándar BSA, que se usó para calcular la concentración de proteína DIG-3 en la solución patrón concentrada.

EJEMPLO 5

Actividad insecticida de la proteína DIG-3 modificada, producida en *Pseudomonas fluorescens*

[0124] Se demostró que la toxina insecticida *B.t.* DIG-3 era activa en las especies lepidópteras incluyendo el barrenador europeo del maíz (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)), ECB resistente a cryIF (rECB), la palomilla dorso de diamante (DBM - *diamondback moth*; *Plutella xylostella* (Linnaeus)), DBM resistente a cryIA (rDBM), gusano de la mazorca del maíz (CEW - *corn earworm*; *Helicoverpa zea* (Boddie)), gusano cortador negro (BCW - *black cutworm*; *Agrotis ipsilon* (Hufnagel)), gusano cogollero del

tabaco (TBW - *tobacco budworm*; *Heliothis virescens* (Fabricius)), y gusano falso medidor (CL - *cabbage looper*; *Trichoplusia ni* (Hübner)). Se analizó también la proteína DIG-3 con respecto a la actividad de gusano cogollero del maíz (FAW - *fall armyworm*, *Spodoptera frugiperda*), FAW resistente a CryIF (rFAW) y gusano de la raíz del maíz (WCR - *western corn rootworm*, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte).

[0125] Preparación de las muestras y bioanálisis. Preparaciones de cuerpos de inclusión se diluyeron apropiadamente en 10 mM CAPS pH 10, y todos los bioanálisis contenían un tratamiento de control que constaba de este amortiguador, el cual sirvió como verificación de fondo con respecto a la mortalidad o inhibición del crecimiento.

[0126] Se calcularon las concentraciones de proteína en el amortiguador de bioanálisis mediante electroforesis en gel utilizando BSA para crear una curva estándar para densitometría en gel, la cual se midió usando un sistema de creación de imágenes BioRad (Fluor-S Multimager con software Quantity One versión 4.5.2). Las proteínas en la matriz del gel se tiñeron con un colorante a base de Azul Coomassie y se retiró el colorante antes de la lectura.

[0127] Las proteínas purificadas se analizaron con respecto a actividad insecticida en bioanálisis conducidos con larvas lepidópteras recién nacidas con dieta artificial de insectos. Larvas de BCW, CEW, CL, DBM, rDBM, ECB, FAW y TBW se hicieron eclosionar de huevos obtenidos de una colonia mantenida por un insectario comercial (Benzon Research Inc., Carlisle, PA). Huevos de WCR se obtuvieron de Crop Characteristics, Inc. (Farmington, MN). Larvas de rECB y rFAW se hicieron eclosionar de huevos recogidos de colonias de propietarias (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, IN).

[0128] Los bioanálisis se condujeron en bandejas plásticas de 128 pocillos específicamente diseñadas para bioanálisis con insectos (C-D International, Pitman, NJ). Cada pocillo contenía 1.0 mL de dieta para lepidópteros multi-especies (Southland Products, Lake Village, AR). Una alícuota de 40 μL de la muestra de proteína se aplicó con pipeta sobre la superficie de dieta de 1.5 cm^2 de cada pocillo (26.7 $(\mu\text{L}/\text{cm}^2)$). Las concentraciones de la dieta se calcularon como la cantidad (ng) de proteína DIG-3 por centímetro cuadrado (cm^2) de área de superficie en el pocillo. Las bandejas tratadas se mantuvieron en una campana de extracción hasta que el líquido en la superficie de la dieta se hubiera evaporado o se hubiera absorbido dentro de la dieta.

[0129] En pocas horas luego de la eclosión, larvas individuales se recogieron con un

cepillo humedecido de pelo de camello y se depositaron sobre la dieta tratada, una larva por pocillo. Los pocillos infestados se sellaron entonces con hojas adhesivas de plástico transparente, con ventilación para permitir el intercambio de gas (C-D International, Pitman, NJ). Las bandejas de bioanálisis se mantuvieron bajo condiciones ambientales controladas (28°C, ~40% humedad relativa, 16:8 [luz:oscuridad]) durante 5 días, luego de los cuales se registraron el número total de insectos expuestos a cada muestra de proteína, el número de insectos muertos, y el peso de los insectos supervivientes. Se calcularon la mortalidad porcentual y la inhibición porcentual del crecimiento para cada tratamiento. La inhibición del crecimiento (GI - *Growth Inhibition*) se calculó en la siguiente forma:

$$GI = [1 - (TWIT/TNIT)/(TWIBC/TNIBC)]$$

donde TWIT es el Peso Total de Insectos en el Tratamiento,
TNIT es el Número Total de Insectos en el Tratamiento
TWTBC Es el Peso Total de Insectos en la Verificación de Fondo (control de amortiguador), y TNIBC es el Número Total de Insectos en la Verificación de Fondo (control de amortiguador).

[0130] Se determinó que la GI₅₀ era la concentración de proteína DIG-3 en la dieta en la cual el valor GI era 50%. La LC₅₀ (50% de concentración letal - *Lethal Concentration*) se registró como la concentración de proteína DIG-3 en la dieta con la cual 50% de los insectos de prueba fueron eliminados. Análisis estadístico (ANOVA de una vía) se realizó utilizando software JMP (SAS, Cary, NC)

[0131] Tabla 6 presenta los resultados de las pruebas de bioanálisis de la proteína DIG-3 sobre el barrenador europeo del maíz y el barrenador europeo del maíz resistente a cryIF (rECB). Un hallazgo inesperado y sorprendente es que los insectos de prueba rECB fueron tan susceptibles a la acción de la proteína DIG-3 como lo fueron los insectos ECB naturales.

Tabla 6

Valores LC₅₀ y GI₅₀ calculados para ECB y rECB, con Intervalos de Confianza (CI - *Confidence Intervals*) de 95%

Insecto	LC ₅₀ (ng/cm ²)	95% CI	GI ₅₀ (ng/cm ²)	95% CI
ECB	591.9	308.1-1315.3	122.6	45.6-328.4
rECB	953.6	534.1-1953.6	270.9	53.0-1382.2

[0132] Tabla 7 presenta los resultados de bioanálisis sobre un amplio espectro de una plaga lepidóptera y coleóptera (WCR). La proteína DIG-3 tiene una actividad inesperada y sorprendente sobre la palomilla dorso de diamante así como rDBM. Además la proteína Cry DIG-3 es efectiva en controlar el crecimiento de varios otros insectos lepidópteros.

Tabla 7

Efectos Insecticidas e Inhibitorios del Crecimiento de la Proteína DIG-3 Ingerida por Insectos de Prueba

Insecto de Prueba	Respuesta a 9000 ng/cm ²	Análisis Estadístico *
DBM	100% mortalidad	
rDBM	100% mortalidad	
CL	75% mortalidad, GI significativo	(GI) P < 0.001, df = 1, α = 0.05
CEW	GI significativo	(GI)P = 0.02, df = 1, α = 0.05
TBW	GI visible, alguna mortalidad	No disponible
BCW	GI visible	No disponible
FAW	No se observó actividad	
rFAW	No se observó actividad	
WCR	No se observó actividad	

*GI = Inhibición del Crecimiento. Valor P = estadística de prueba. df = grados de libertad (*Degrees of Freedom*), nivel α (alfa) 0.05 = el nivel de significación de la prueba.

EJEMPLO 6

Trasformación de *Agrobacterium*

[0133] Métodos de clonación estándar se utilizan en la construcción de plásmidos binarios de transformación y expresión en plantas. Las endonucleasas de restricción y la T4 DNA Ligasa se obtienen de NEB. Las preparaciones de plásmidos se llevan a cabo utilizando el kit de Preparación de Plásmidos NucleoSpin® o el kit NucleoBond® AX Xtra Midi (ambos de Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los fragmentos de ADN se purifican usando el kit de Purificación PCR QIAquick® o el kit de Extracción en Gel QIAEX II® (los dos de Qiagen) después del aislamiento del gel.

[0134] Los fragmentos de ADN que contienen las secuencias nucleotídicas que codifican la proteína DIG-3 en formas nativas o modificadas, o sus fragmentos, pueden sintetizarse por un proveedor comercial (v.g. DNA2.0, Menlo Park, CA) y suministrarse como fragmentos clonados en vectores plasmídicos, o pueden obtenerse mediante

manipulación estándar de biología molecular de otros constructos que contienen secuencias nucleotídicas apropiadas. Sitios de restricción única internos a una región codificante DIG-3 pueden identificarse, y fragmentos de ADN que incluyen las secuencias entre los sitios de restricción de la región codificante DIG-3 pueden sintetizarse, codificando cada fragmento similar una delección específica, inserción u otra variación DIG-3. Los fragmentos de ADN que codifican los fragmentos DIG-3 modificados pueden unirse a otros fragmentos de la región codificante DIG-3 u otros fragmentos de la región codificante Cry en sitios de restricción apropiados para obtener una región codificante que codifica la proteína DIG-3 deseada de longitud completa, proteína DIG-3 eliminada o variante, o proteína fusionada. Por ejemplo, se puede identificar un sitio de reconocimiento de restricción apropiado al inicio de una primera región codificante DIG-3, y un segundo sitio de restricción interno a la región codificante DIG-3. La escisión de esta primera región codificante DIG-3 en estos sitios de restricción generaría un fragmento de ADN que contiene parte de la primera región codificante DIG-3. Un segundo fragmento de ADN flanqueado por sitios de restricción compatibles, situados análogamente, específicos para otra región codificante DIG-3 u otra región codificante Cry pueden usarse en combinación con el primer fragmento de restricción de ADN para construir un clon variante o fusionado.

[0135] En un ejemplo no limitante, una estrategia de clonación básica puede ser subclonar secuencias codificantes (CDs) de DIG-3 modificada o de longitud completa en un plásmido de expresión en plantas en los sitios de restricción *NcoI* y *SacI*. Los casetes de expresión en plantas resultantes, que contienen la región codificante DIG-3 apropiada bajo el control de elementos de expresión en plantas, (v.g., promotores expresables en plantas, determinantes de la terminación de transcripción 3' terminal y adición de poliadenilato, y similares) se subclonan en un plásmido vector binario, utilizando, por ejemplo, tecnología Gateway® o procedimientos de clonación de fragmentos con enzimas de restricción estándar. LR Clonase™ (Invitrogen), por ejemplo, puede usarse para recombinar los casetes de expresión en plantas de genes modificados y de longitud completa en un plásmido binario de transformación en plantas, si se utiliza la tecnología Gateway®. Es conveniente emplear un vector binario de transformación en plantas que albergue un gen bacteriano, que confiera resistencia al antibiótico espectinomicina cuando el plásmido está presente en células de *E. coli* y *Agrobacterium*. Es también conveniente emplear un plásmido vector binario que contenga un gen marcador seleccionable expresable en una planta, que sea funcional en las plantas anfitrionas deseadas. Ejemplos de genes marcadores seleccionables expresables en plantas incluyen, pero no se limitan a, aquellos que codifican el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa (*aphII*) del transposón Tn5, que confiere resistencia al antibiótico kanamicina, neomicina y G418, así como aquellos genes que

codifican para resistencia o tolerancia de glifosato; higromicina; metotrexato; fosfotricina (bialafós), imidazolinonas, sulfonilureas y herbicidas de triazolopirimidina, tales como clorosulfurón, bromoxinil, dalapón y similares.

[0136] Células electro-competentes de la cepa *Agrobacterium tumefaciens* Z707S (un derivado resistente a la estreptomicina de Z707; Hepburn *et al.*, 1985) se preparan y transforman utilizando electroporación (Weigel y Glazebrook, 2002). Luego de la electroporación, se agregan 1 mL de caldo YEP (gm/L: extracto de levadura, 10; peptona, 10; NaCl, 5) a la cubeta y la suspensión células-YEP se transfiere a un tubo de cultivo de 15 mL para incubación a 28°C en un baño maría con agitación constante durante 4 horas. Las células se esparcen en placas de YEP más agar (25 gm/L) con espectinomicina (200 µg/mL) y estreptomicina (250 µg/mL) y las placas se incuban durante 2-4 días a 28°. Se seleccionan colonias individuales bien separadas y se siembran en estrías (*are streaked*) sobre placas nuevas de YEP + agar con espectinomicina y estreptomicina como ya se indicó, y se incuban a 28° durante 1-3 días.

[0137] La presencia del inserto del gen DIG-3 en el vector binario de transformación de la planta se realiza mediante análisis PCR usando cebadores específicos con ADN plasmídico molde preparado de colonias seleccionadas de *Agrobacterium*. El sedimento celular de una alícuota de 4 mL de un cultivo de un día para otro de 15 mL, desarrollado en YEP con espectinomicina y estreptomicina, como ya se indicó, se extrae utilizando Qiagen Spin® Mini Preps, realizado según instrucciones del fabricante. ADN plasmídico del vector binario utilizado en la transformación por electroporación de *Agrobacterium* se incluye como control. Se completa la reacción PCR usando Taq ADN polimerasa de Invitrogen según instrucciones del fabricante en concentraciones 0.5X. Las reacciones PCR se llevan a cabo en un MJ Research Peltier Thermal Cycler programado con las siguientes condiciones: Paso 1) 94° durante 3 minutos; Paso 2) 94° durante 45 segundos; Paso 3) 55° durante 30 segundos; Paso 4) 72° durante 1 minuto por kb de longitud de producto esperado; Paso 5) 29 veces al Paso 2; Paso 6) 72° durante 10 minutos. La reacción se mantiene a 4° después de ciclar. Los productos de amplificación se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa (v.g. 0.7 % a 1% agarosa, p/v) y se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio. Se selecciona una colonia cuyo producto PCR es igual al control plasmídico.

[0138] Alternativamente, se efectúa la estructura del plásmido del vector binario de transformación de la planta que contiene el inserto del gen DIG-3 mediante cartografiado de huella genética con digestión de restricción del ADN plasmídico preparado de

candidatos *Agrobacterium* por métodos estándar de biología molecular, bien conocidos por los expertos en el arte de la manipulación de *Agrobacterium*.

[0139] Las personas expertas en el arte de obtener plantas transformadas mediante métodos de transformación mediada por *Agrobacterium* entenderán que pueden usarse ventajosamente otras cepas de *Agrobacterium* además de Z707S, y la elección de la cepa puede depender de la identidad de la especie de la planta anfitriona que se va a transformar.

EJEMPLO 7

Producción de proteínas insecticidas *B.t.* DIG-3 y variantes en plantas dicotiledóneas

[0140] Transformación por *Arabidopsis*. *Arabidopsis thaliana* Col-01 se transforma utilizando el método de inmersión floral (Weigel y Glazebrook, 2002). La colonia de *Agrobacterium* seleccionada se utiliza para inocular 1 mL de cultivos de 15 mL de caldo YEP, que contienen antibióticos apropiados para selección. El cultivo se incuba de un día para otro a 28° con agitación constante a 220 rpm. Cada cultivo se utiliza para inocular dos cultivos de 500 mL de caldo YEP, que contienen antibióticos apropiados para selección y los nuevos cultivos se incuban de un día para otro a 28° con agitación constante. Las células se sedimentan a aproximadamente 8700 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se descarta el sobrenadante resultante. El sedimento celular se resuspende suavemente en 500 mL de medio de infiltración que contiene: 1/2x de sales de Murashige y Skoog (Sigma-Aldrich)/vitaminas B5 de Gamborg (Gold BioTechnology, St. Louis, MO), 10% (p/v) sacarosa, 0.044 µM bencilaminopurina (10 µL/litro de 1 mg/mL solución patrón concentrada en DMSO) y 300 µL/litro Silwet L-77. Plantas de aproximadamente 1 mes de edad se sumergen en el medio durante 15 segundos, poniendo cuidado en asegurar la submersión de la inflorescencia más reciente. Las plantas se ponen entonces de lado y se cubren con una tapa (transparente u opaca) durante 24 horas, se lavan con agua, y se ponen en posición vertical. Las plantas se cultivan a 22°, con un fotoperíodo de 16 horas de luz/8 horas de oscuridad. Aproximadamente 4 semanas después de la inmersión, se recolectan las semillas.

[0141] Crecimiento y selección de *Arabidopsis*. Semillas T1 recién cosechadas se ponen a secar durante por lo menos 7 días a temperatura ambiente en la presencia de un desecante. Las semillas se suspenden en una solución de 0.1% agar/agua (Sigma-Aldrich) y luego se estratifican a 4° durante 2 días. Para prepararlas para plantación, Sunshine Mix LP5 (Sun Gro Horticulture Inc., Bellevue, WA) en bandejas de germinación de 10.5 pulgadas x 21 pulgadas (T.O. Plastics Inc., Clearwater, MN) se cubre con vermiculita fina,

se sub-irriga con solución de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) hasta humedecer, luego se deja drenar durante 24 horas. Las semillas estratificadas se siembran sobre la vermiculita y se cubren con cúpulas de humedad (KORD Products, Bramalea, Ontario, Canadá) durante 7 días. Se germinan las semillas y las plantas se cultivan en un Conviron (Models CMP4030 o CMP3244; Controlled Environments Limited, Winnipeg, Manitoba, Canadá) bajo condiciones de días prolongados (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) con una intensidad de luz de 120-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ bajo temperatura constante (22°) y humedad (40-50%). Las plantas se hidratan inicialmente con solución de Hoaglandy posteriormente con agua desionizada para mantener el suelo humedecido, pero no mojado.

[0142] Se retiran las cúpulas 5-6 días después de la siembra y las plantas se asperjan con un agente de selección química para eliminar plantas germinadas de semillas no transformadas. Por ejemplo, si el gen marcador seleccionable expresable de la planta, proporcionado por el vector de transformación binario de la planta, es un gen *pat* o *bar* (Wehrmann *et al.*, 1996), las plantas transformadas pueden seleccionarse rociándolas con una solución 1000X de Finale (5.78% glufosinato de amonio, Farnam Companies Inc., Phoenix, AZ.). Se realizan dos aspersiones posteriores, en intervalos de 5-7 días. Las sobrevivientes (plantas que crecen activamente) se identifican 7-10 días después de la aspersión final y se transplantan en macetas preparadas con Sunshine Mix LP5. Las plantas transplantadas se cubren con un domo de humedad durante 3-4 días y se ponen en un Conviron bajo las condiciones de crecimiento ya mencionadas.

[0143] Las personas expertas en el arte de la transformación de plantas dicotiledóneas entenderán que están disponibles otros métodos de selección de plantas transformadas, cuando se utilizan otros genes marcadores seleccionables expresables en plantas (v.g., genes de tolerancia a herbicidas).

[0144] Bioanálisis con insectos de *Arabidopsis* transgénica. Se demostró que líneas de *Arabidopsis* transgénica, que expresan proteínas Cry modificadas, son activas contra especies de insectos sensibles en estudios de superposición de dieta artificial. Proteína extraída de líneas de *Arabidopsis* transgénicas y no transgénicas se cuantifica mediante métodos apropiados y se ajustan volúmenes de muestra para normalizar la concentración de proteína. Se conducen bioanálisis en dieta artificial, como de describe anteriormente. *Arabidopsis* no transgénica y/o amortiguador se incluyen en estudios como tratamientos de verificación de fondo.

EJEMPLO 8

Transformación de *Agrobacterium* para generación de factores superbinarios

[0145] El sistema superbinario *Agrobacterium* se utiliza convenientemente para la transformación de anfitriones de plantas monocotiledóneas. Metodologías para construir y validar vectores superbinarios están bien divulgadas y se incorporan en esta especificación por referencia (Manual de Operaciones para el Plásmido pSBI, Versión 3.1, disponible de Japan Tobacco, Inc., Tokio, Japón). Métodos biológicos y microbiológicos moleculares estándar se usan para generar plásmidos superbinarios. La verificación/validación de la estructura del plásmido superbinario se hace empleando metodologías como se describe anteriormente para vectores binarios, y puede modificarse como se sugiere en el Manual de Operaciones para el Plásmido pSBI.

EJEMPLO 9

Producción de proteínas insecticidas *B.t.* DIG-3 y variantes en plantas monocotiledóneas

[0146] Transformación de maíz mediada por *Agrobacterium*. Semillas de un cruzamiento High II F₁ (Armstrong *et al.*, 1991) se plantan en macetas de 5 galones que contienen una mezcla de 95% de un medio de crecimiento en ausencia de suelo % Metro-Mix 360 (Sun Gro Horticulture, Bellevue, WA) y 5% de suelo de arcilla/marga. Las plantas se cultivan en un invernadero utilizando una combinación de lámparas de halogenuro de metal y sodio de alta presión con un fotoperíodo de 16:8 horas de luz:oscuridad. Para obtener embriones F₂ inmaduros para transformación, se realizan polinizaciones sib. Los embriones inmaduros se aíslan a 8-10 días pos-polinización cuando los embriones tienen un tamaño de aproximadamente 1.0 a 2.0 mm.

[0147] Infección y co-cultivo. Las mazorcas del maíz se esterilizan en su superficie frotándolas con jabón líquido, sumergiéndolas en 70% etanol durante 2 minutos, y luego sumergiéndolas en 20% de blanqueador comercial (0.1% hipoclorito de sodio) durante 30 minutos antes de enjuagarlas con agua esterilizada. Se prepara una suspensión de células de *Agrobacterium* que contienen un vector superbinario transfiriendo 1-2 asas de bacterias cultivadas en medio sólido YEP que contenía 100 mg/L de espectinomicina, 10 mg/L tetraciclina, y 250 mg/L estreptomycin a 28° durante 2-3 días en 5 mL de medio de infección líquido (medio basal LS (Linsmaier y Skoog, 1965), vitaminas N6 (Chu *et al.*, 1975), 1.5 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 68.5 gm/L sacarosa, 36.0 gm/L glucosa, 6 mM L-prolina, pH 5.2), que contenía 100 µM acetosiringona. La solución se sometió a vorticidad hasta que se obtuvo una suspensión uniforme, y se ajustó la

concentración a una densidad final de alrededor de 200 unidades Klett, utilizando un colorímetro Klett-Summerson con un filtro púrpura, o una densidad óptica de aproximadamente 0.4 a 550 nm. Los embriones inmaduros se aíslan directamente en un tubo de microcentrífuga que contiene 2 mL del medio de infección. Se retira el medio y se reemplaza con 1 mL de la solución de *Agrobacterium* con una densidad de 200 unidades Klett, y el *Agrobacterium* y la solución de embriones se incuban durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se transfieren a un medio de co-cultivo (medio basal LS, vitaminas N6, 1.5 mg/L 2,4-D, 30.0 g/L sacarosa, 6 mM L-prolina, 0.85 mg/L AgNO₃, 100 µM acetosiringona, 3.0 g/L goma gelana (*PhytoTechnology Laboratories*, Lenexa, KS), pH 5.8) durante 5 días a 25° bajo condiciones de oscuridad.

[0148] Después del co-cultivo, los embriones se transfieren a medio selectivo, tras lo cual se obtienen aislados transformados en el curso de aproximadamente 8 semanas. Para la selección de tejidos de maíz transformado con un plásmido superbinario, que contiene un gen marcador seleccionable *pat* o *bar* expresable en una planta, se utiliza un medio a base de LS (medio basal LS, vitaminas N6, 1.5 mg/L 2,4-D, 0.5 g/L MES (monohidrato de ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico; *PhytoTechnologies Labr.*), 30.0 g/L sacarosa, 6 mM L-prolina, 1.0 mg/L AgNO₃, 250 mg/L cefotaxima, 2.5 g/L goma gelana, pH 5.7) con bialafós (*Gold BioTechnology*). Los embriones se transfirieron a un medio de selección que contenía 3 mg/L bialafós, hasta que se obtuvieron aislados embrionarios. Los aislados recuperados se concentran (*are bulked up*) transfiriéndolos a medio de selección fresco en intervalos de 2 semanas para regeneración y análisis posterior.

[0149] Las personas expertas en el arte de la transformación del maíz entenderán que se encuentran disponibles otros métodos de selección de plantas transformadas, cuando se utilizan otros genes marcadores seleccionables expresables en plantas (v.g., genes de tolerancia a herbicidas).

[0150] Regeneración y producción de semillas. Para regeneración, los cultivos se transfieren a medio de inducción "28" (sales MS y vitaminas, 30 g/L sacarosa, 5 mg/L bencilaminopurina, 0.25 mg/L 2, 4-D, 3 mg/L bialafós, 250 mg/L cefotaxima, 2.5 g/L goma gelana, pH 5.7) durante 1 semana bajo condiciones de luz baja (14 µEm⁻²s⁻¹) luego 1 semana bajo condiciones de luz alta (aproximadamente 89 µEm⁻²s⁻¹). Posteriormente, los tejidos se transfieren a medio de regeneración "36" (el mismo medio de inducción, excepto que carece de reguladores de crecimiento vegetal). Cuando las plántulas crecen a una longitud de 3-5 cm, se transfieren a tubos de cultivo de vidrio que contienen medio SHGA (sales de Schenk y Hildebrandt y vitaminas (1972); *PhytoTechnologies Labr.*), 1.0 g/L *myo*-inositol, 10 g/L sacarosa y 2.0 g/L goma gelana, pH 5.8) para permitir el posterior

crecimiento y desarrollo del brote y las raíces. Las plantas se transplantan a la misma mezcla de suelo, como se describió anteriormente en esta especificación, y se cultivan hasta florecer en el invernadero. Se conducen polinizaciones controladas para la producción de semillas.

EJEMPLO 10

Bioanálisis de maíz transgénico

[0151] La bioactividad de la proteína DIG-3 y variantes producidas en células vegetales se demuestra por métodos de bionálisis convencionales (véase, por ejemplo Huang *et al.*, 2006). Se está en capacidad de demostrar eficacia, por ejemplo, alimentando varios tejidos vegetales o trozos de tejido derivados de una planta que produce una toxina DIG-3 para tomar como blanco insectos en un ambiente de alimentación controlado. Alternativamente, pueden prepararse extractos de proteína de varios tejidos vegetales derivados de una planta que produce la toxina DIG-3 e incorporar las proteínas extraídas en un bionálisis de dieta artificial, como se describe previamente en esta especificación. Hay que entender que los resultados de tales análisis de alimentación tienen que compararse con bioanálisis conducidos en forma semejante, que emplean tejidos de control apropiados de plantas anfitrionas que no producen la proteína DIG-3 o variantes, o con otras muestras de control.

Referencias

An, G., Watson, B. D., Stachel, S., Gordon, M. P., Nester, E. W. (1985) New cloning vehicles for transformation of higher plants. EMBO J. 4:277-284.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acids Res. 25:3389-3402.

Armstrong, C. L., Green, C. E., Phillips, R. L. (1991) Development and availability of germplasm with high TypeII culture formation response. Maize Genet. Coop. Newslett. 65:92-93.

Aronson, A.I., Han, E.-S., McGaughey, W., Johnson, D. (1991) The solubility of inclusion proteins from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxina composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:981-986.

Aronson, A. I., Geng, C, Wu. L. (1999) Aggregation of *Bacillus thuringiensis* CryIA toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2503-2507.

Arvidson, H., Dunn, P. E., Strand, S., Aronson, A. I. (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved *in vivo* and in the structure of a purified toxin. *Molec. Microbiol.* 3:1533-1543.

Ausubel *et al.*, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 2 (Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York).

Bailey, J. M., Shenov, N. R., Ronk, M., and Shively, J. E., (1992) Automated carboxy-terminal sequence analysis of peptides. *Protein Sci.* 1:68-80.

Beltz, G.A., Jacobs, K. A., Eickbush, T. H., Cherbas, P. T., Kafatos, F. C. (1983) Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods. In Wu, R., Grossman, L., Moldave, K. (eds.) *Methods of Enzymology*, Vol. 100 Academic Press, New York pp.266-285.

Bown, D. P., Wilkinson, H. S., Jongsma, M. A., Gatehouse, J. A. (2004) Characterisation of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 34,:305-320.

Bravo, A., Gill, S. S., Soberon, M. (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49:423-435.

Caruthers, M. H., Kierzek, R., Tang, J. Y. (1987) Synthesis of oligonucleotides using the phosphoramidite método. *Bioactive Molecules (Biophosphates Their Analogues)* 3:3-21.

Christeller, J. T., Laing, W. A., Markwick, N. P., Burgess, E. P. J. (1992) Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor

interactions. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22:735-746.

Chu, C. C., Wand, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., Chu, C. Y., Bi, F. Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18:659-668.

Cramer, A., Cwirla, S., Stemmer, W. P. C. (1996a) Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling. *Nat. Med.* 2:100-103.

Cramer, A., Dawes, G., Rodriguez, E., Silver, S., Stemmer, W.P.C. (1997) Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling. *Nat. Biotech.* 15:436-438.

Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., Stemmer, W. P. C. (1996b) Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotech.* 14:315-319.

de Maagd, R. A., Kwa, M. S., van der Klei, H., Yamamoto, T., Schipper, B., Vlak, J. M., Stiekema, W. J., Bosch, D. (1996) Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1537-1543.

de Maagd, R. A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, E. (2003) Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37:409-433.

Diaz-Mendoza, M., Farinos, G. P., Castanera, P., Hernandez-Crespo, P., Ortego, F. (2007) Proteolytic processing of native CryI Ab toxin by midgut extracts and purified tripsins from the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides*. *J. Insect Physiol.* 53:428-435.

Englemann, F., Geraerts, W. P. M., (1980) The proteases and the protease inhibitor in the midgut of *Leucophaea maderae*. *J. Insect Physiol.* 26:703-710.

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B. (1986) Genetic transformation in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 4:1-46.

Gazit, E., La Rocca, P., Sansom, M. S. P., Shai, Y. (1998) The structure and

organization within the membrane of the helices composing the pore-forming domain of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin are consistent with an "umbrella-like" structure of the pore. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:12289-12294.

Ge, A., Rivers, D., Milne, R., Dean, D. H. (1991) Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on CryIA(c). J. Biol. Chem. 266:17954-17958.

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.

Gomez, I., Sanchez, J., Miranda, R., Bravo, A., Soberon, M. (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* CryIAb toxin. FEBS Lett. 513:242-246.

Haider, M. Z., Knowles, B. H., Ellar, D. J. (1986) Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal δ -endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. Eur. J. Biochem. 156:531-540.

Heckel, D. G., Gahan, L. J., Baxter, S. W., Zhao, J-Z., Shelton, A. M., Gould, F., Tabashnik, B. E. (2007) The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. J. Invert. Pathol. 95:192-197.

Hepburn, A. G., White, J., Pearson, L., Maunders, M. J., Clarke, L. E., Prescott, A. G. Blundy, K. S. (1985) The use of pNJ5000 as an intermediate vector for the genetic manipulation of *Agrobacterium* Ti-plasmids. J. Gen. Microbiol. 131:2961-2969.

Hoagland, D. R., Arnon, D. I. (1950) The water-culture method of growing plants without soil. Calif. Agr. Expt. Sta. Circ. 347.

Hofte, H., de Greve, H., Seurinck, J., Jansens, S., Mahillon, J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., Vanderbruggen, H., van Montagu, M., Zabeau, M., Vaeck, M. (1986) "Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* berliner 1715." Eur. J. Biochem. 161:273-280.

Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989) Engineering

hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene 77:61-68.

Huang, F., Rogers, L. B., Rhett, G. H. (2006) Comparative susceptibility of European corn borer, southwestern corn borer, and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) to CryAb protein in a commercial *Bacillus thuringiensis* corn hybrid. J. Econ. Entomol. 99:194-202.

Huang, K-X., Badger, M., Haney, K., Evans, S. L. (2007) Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Abl and Cry35Abl from *Pseudomonas fluorescens*. Prot. Express. Purific. 53:325-330.

Janmaat, A. F., Myers, A. H. (2003) Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. Proc. Royal Soc. London. Ser. B, Biolog. Sci. 270:2263-2270.

Janmaat, A. F., Myers, A. H. (2005) The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. Proc. Royal Soc. London. Ser. B, Biolog. Sci. 272:1031-1038.

Karlin, S., Altschul, S. F. (1990) Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268.

Karlin, S., Altschul, S. F. (1993) Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877.

Keller, G.H., Manak, M. M. (1993) DNA Probes, Background, Applications, Procedures. Stockton Press, New York, NY.

Knight, J. S., Broadwell, A. H., Grant, W. N., Shoemaker, C. B. (2004) A Strategy for Shuffling Numerous *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Domains. J. Econ. Entomol. 97:1805-1813.

Koiwa, 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 cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn

rootworm *Diabrotica virgifera virgifera*. FEBS Letters 471:67-70.

Larson, S. M., England, J. L., Desjarlais, J. R., Pande, V. S. (2002) Thoroughly sampling sequence space: Large-scale protein design of structural ensembles. Protein Sci. 11:2804-2813.

Lee, L.-Y., Gelvin, S. B. (2008) T-DNA binary vectors and systems. Plant Physiol. 146:325-332.

Linsmaier, E.M., Skoog, F. (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue. Physiologia Plantarum 18:100-127.

Littlefield, J. W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. Science 145:709-710.

Meinkoth, J., Wahl, G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. Anal. Biochem. 138:267-284.

Myers, E., Miller, W. (1988) Optimal alignments in linear space. CABIOS 4:11-17.

Naimov, S., Weemen-Hendriks, M., Dukiandjiev, S., de Maagd, R.A. (2001) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryI hybrid proteins with increased activity against the Colorado Potato Beetle. Appl. Environ. Microbiol. 11:5328-5330.

Needleman, S. B., Wunsch, C. D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. J. Mol. Biol. 48:443-453.

Nunez-Valdez, M.-E., Sanchez, J., Lina, L., Guereca, L., Bravo, A. (2001) Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin. Biochim. Biophys. Acta, Prot. Struc. Molec. Enzymol. 1546:122-131.

Ochoa-Campuzano, C, Real, M. D., Martinez-Ramirez, A. C, Bravo, A., Rausell, C. (2007) An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 362:437-442.

Pigott, C. R., Ellar, D. J. (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 71:255-281.

Rang, C, Vachon, V., de Maagd, R. A., Villalon, M., Schwartz, J.-L., Bosch, D., Frutos, R., Laprade R. (1999) Interaction between functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2918-2925.

Sambröok, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)

Schenk, R. U., Hildebrandt, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.

Schnepf, H. E., Tomczak, K., Ortega, J. P., Whiteley, H. R. (1990) Specificity-determining regions of a *Lepidopteran-specific* insecticidal protein produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 265:20923-20930.

Soberón, M., Pardo-Lopez, L., Lopez, I., Gomez, I., Tabashnik, B. E., Bravo, A. (2007) Engineering modified Bt toxins to counter insect resistance. *Science* 318:1640-1642.

Squires, C. H., Retallack, D. M., Chew, L. C., Ramseier, T. M., Schneider, J. C., Talbot, H. W. (2004) Heterologous protein production in *P. fluorescens*. *Bioprocess Intern.* 2:54-59.

Stemmer, W. P. C. (1994a) DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *in vitro* recombination for molecular evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Stemmer, W. P. C. (1994b) Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-391.

Stemmer, W. P. C. (1995) Searching sequence space. *Bio/Technology* 13:549-553.

Stewart, L. (2007) Gene synthesis for protein production. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley and Sons, Ltd.

Stewart, L., Burgin, A. B., (2005) Whole gene synthesis: a gene-o-matic future.

Frontiers in Drug Design and Discovery 1:297-341.

Suggs, S.V., Miyake, T., Kawashime, E. H., Johnson, M. J., Itakura, K., R.B. Wallace, R. B. (1981) ICN-UCLA Symposium. Dev. Biol. Using Purified Genes, D. D. Brown [ed.], Academic Press, New York, 23:683-69.

Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Luo, K., Adang, M. J. (1994) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:4120-4124.

Tabashnik, B. E., Gassmann, A. J., Crowder, D. W., Carriere, T. (2008) Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. Nat. Biotech. 26:199-202.

Taggart, R. T., Samloff, I. M. (1983) Stable antibody-producing murine hybridomas. Science 219:1228-1230.

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.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22:4673-4680.

Tijssen, P. (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2. P. C. van der Vliet [ed.], (Elsevier, N.Y.)

Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. Genes to Cells 2:13-28.

Walters, F. S.; Slatin, S. L., Kulesza, C. A., English, L. H. (1993) Ion channel activity of N-terminal fragments from CryIA(c) delta-endotoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 196:921-926.

Walters, F. S., Stacy, C. M., Lee, M. K., Palekar, N., Chen, J. S. (2008) An engineered chymotripsina/cathepsin G site in domain I renders *Bacillus thuringiensis*

Cry3A active against western corn rootworm larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:367-374.

Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A. (1996) The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat. Biotechnol.* 14:1274-1278.

Weigel, D., Glazebrook, J. [eds.] (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 354 pages.

Witkowski, J. F., Wedberg, J. L., Steffey, K. L., Sloderbeck, P. E., Siegfried, B. D., Rice, M. E., Pilcher, C. D., Onstad, D. W., Mason, C. E., Lewis, L. C., Landis, D. A., Keaster, A.J., Huang, F., Higgins, R. A., Haas, M. J., Gray, M. E., Giles, K. L., Foster, J. E., Davis, P. M., Calvin, D. D., Buschman, L. L., Bolin, P. C, Barry, B. D., Andow, D. A., Alstad, D. N. (2002) Bt corn and European Corn Borer (Ostlie, K. R., Hutchison, W. D., Hellmich, R. L. (eds)). University of Minnesota Extension Service. Publ. WW-07055.

Wolf son, J. L., Murdock, L. L. (1990) Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 16:1089-1102.

Worley, C. K., Ling, R., Callis, J. (1998) Engineering *in vivo* instability of firefly luciferase and *Escherichia coli* (3-glucuronidase in higher plants using recognition elements from the ubiquitin pathway. *Plant Molec. Biol.* 37:337-347.

WO 2010/120452

PCT/US2010/028381

Reivindicaciones

1. Un polipéptido aislado que incluye un segmento de toxina central seleccionado del grupo conformado por

- (a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 113 a 643 de SEQ ID NO: 2;
- (b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de residuos 113 a 643 de SEQ ID NO: 2;
- (c) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de residuos 113 a 643 de SEQ ID NO: 2 con hasta 20 sustituciones, deleciones, o modificaciones de aminoácidos que no afectan negativamente la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO: 2;

o un fragmento insecticidamente activo del mismo.

2. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que incluye un segmento de toxina central seleccionado del grupo conformado por

- (a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 73 a 643 de SEQ ID NO: 2;
- (b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de residuos 73 a 643 de SEQ ID NO: 2;
- (c) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de residuos 73 a 643 de SEQ ID NO: 2 con hasta 20 sustituciones, deleciones, o modificaciones de aminoácidos que no afectan negativamente la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO: 2;

o un fragmento insecticidamente activo del mismo.

3. El polipéptido aislado de la reivindicación 1 que incluye un segmento de toxina central seleccionado del grupo conformado por

- (a) un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 643 de SEQ ID NO: 2;
- (b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 643 de SEQ ID NO:2;
- (c) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de residuos 1 a 643 de SEQ ID NO: 2 con hasta 20 sustituciones, deleciones, o modificaciones de aminoácidos que no afectan negativamente la expresión o actividad de la toxina codificada por SEQ ID NO: 2;

o un fragmento insecticidamente activo del mismo.

4. Una planta que incluye el polipéptido de la reivindicación 1.

5. Un método para controlar una población de plagas, método que incluye contactar la citada población con una cantidad pesticidamente efectiva del polipéptido de la reivindicación 1.

7. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de la reivindicación 1.

8. El ácido nucleico aislado de la reivindicación 7 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:3.

9. Un polipéptido de la reivindicación 1 de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:5.

10. Un constructo de ADN que incluye la secuencia nucleotídica de la reivindicación 1 enlazada operacionalmente a un promotor que no se deriva de *Bacillus thuringiensis* y es

WO 2010/120452

PCT/US2010/028381

capaz de inducir expresión en una planta.

- 11. Una planta transgénica que incluye el constructo de ADN de la reivindicación 10 incorporado establemente en su geoma.
- 12. Un método para proteger una planta de una plaga, método que incluye introducir en la citada planta el constructo de la reivindicación 10.
- 13. El polipéptido de la reivindicación 1 que tiene actividad contra el barrenador europeo del maíz.

WO 2010/120452

PCT/US2010/028381

RESUMEN

Toxinas Cry DIG-3, polinucleótidos que codifican tales toxinas, y plantas transgénicas que producen tales toxinas son útiles para controlar plagas de insectos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lira, Justin
 Butler, Holly
 Smith, Doug
 Narva, Ken
 Meade, Thomas

<120> Proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*

<130> 67321

<160> 7

<170> Patent In version 3.5

<210> 1
 <211> 3771
 <212> DNA
 <213> *Bacillus thuringiensis*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Codón de iniciación de traducción que especifica Met

<400> 1
 ttgacttcaa ataggaaaa tgagaatgaa attataaatg ctttatogat tccaacggta 60
 tcgaatcctt ccacgcaa at gaatctatca ccagatgctc gtattgaaga tagcttggt 120
 gtagccgagg tgaacaatat tgatccattt gttagcgc at caacagtcca aacgggtata 180
 aacatagctg gtagaatatt gggcgtatta ggtgtgcgt ttgctggaca actagctagt 240
 ttttatagtt ttcttggtgg tgaattatgg cctagtggca gagatccatg ggaaattttc 300
 ctggaacatg tagaacaact tataagacaa caagtaacag aaaatactag gaatacggct 360
 attgctcgat tagaaggtct aggaagaggc tatagatctt accagcaggc tcttgaaact 420
 tggttagata accgaaatga tgcaagatca agaagcatta ttcttgagcg ctatgttgct 480
 ttagaacttg acattactac tgctataccg cttttcagaa tacgaaatca agaggttcca 540
 ttattaatgg tatatgctca agctgcaaat ttacacctat tattattgag ggacgcaccc 600
 ctttttggtg gtgaatgggg gacggcatct tccgatgtta accaatatta ccaagaacaa 660
 atcagatata cagaggaata ttctaaccat tgcgtacaat ggtataatac ggggctaaat 720
 aacttaagag ggacaaatgc tgaaagttgg gtacggtata atcaattccg cagagaccta 780
 acattagggg tattagatct agtggcccta ttccaagtt atgacactcg cacttatcca 840
 atcaatacga gtgctcagtt aacaagagaa gtttatacag acgcaattgg gaccgtacat 900
 ccgagtcaag cttttgcaag tacgacttgg ttttaataata atgcaccatc gttttctgcc 960
 atagaagctg ccgttatcag gcctccgc at ctacttgatt ttccagaaca acttacaatt 1020
 tacagcacat taagtcatg gagtaacact cagtttatga atatatgggc aggtcataga 1080
 cttgaatccc gcccaatagc agggtcatta aatacctcta cacaaggatc taccaatact 1140
 tctattaatc ctgtaacatt acagtttacg tctcgagaca tttataggac tgaatcattg 1200
 gcagggctaa atatatttat aactcaacct gttaatgggg ttcttggggt tagatttaatt 1260

tggagaaatc ccctgaattc tcttagaggt agccttctct atacgatagg gtatactgga	1320
gttgggacgc aattacaaga ttcagaaact gaattacccc cagaaacaac agaacgacca	1380
aattatgaat catatagtca tagattatct catataggac tcatttcac c atctcatgtg	1440
agagcattgg tatattcttg gacgcaccgt agtgcagatc gtacgaatac gattggacca	1500
aatagaatta ctcaaattcc tgcagtgaag ggaagatttc tttttaatgg ctctgtaatt	1560
tcaggaccag gatttactgg tggagacgta gttagattga ataggaataa tggtaatat	1620
caaaatagag ggtatatatga agttccaatt caattcacgt cgacatctac cagatatcga	1680
gttcgagtac gttatgcttc tgtaacctcg attgagctca atgttaattg gggcaattca	1740
tcaattttta cgaacacatt accagcaaca gctgcatcat tagataatct acaatcaggg	1800
gattttgggt atgttgaaat caacaatgct ttacatccg caacaggtaa tatagtaggt	1860
gttagaaatt ttagtgcaaa tgcagaggta ataatagaca gatttgaatt tatcccagtt	1920
actgcaacct tcgaggcaaa atatgattta gaaagagcac aaaaggcggg gaatgctctg	1980
tttacttcta caaatccaag aagattgaag acagatgtga cagattatca tattgaccaa	2040
gtgtccaatc tgggtggtatg tttatcagat gaattttgct tggatgagaa gcgagaatta	2100
tttgagaaag tgaaatatgc gaagcgactc agtgatgaaa gaaacttact ccaagatcca	2160
aacttcacat tcatcaatgg gcaaccaagt tttgcatcca tcgatggaca atcaaacttc	2220
acctctatta atgagctatc taatcatgga tgggtggggca gtgcgaatgt taccattcag	2280
gaagggaatg acgtatttaa agagaattac gtcacactac cgggtacttt taatgagtgt	2340
tatccaaatt atttatatca aaaaatagga gagtcagaat taaaggctta tacgcgctat	2400
caattaagag ggtatatatga agatagtcaa gatctagaga tttatttaat tcgttacaat	2460
gcaaagcatg aaacattaaa tgttccaggt accgagtcct tatggccgct ttcagttgaa	2520
agcccaatcg gaagggtgcgg agaaccaaat cgatgcgcac cacattttgg atggaatcct	2580
gatctagatt gttcctgcag agatagagaa aaatgtgctc atcattccca tcatttcact	2640
ttggatattg atgttggtatg cacagacttg caagaggatc taggcgtgtg ggttgtattc	2700
aagattaaga cgcaggaagg ttatgcaaga ttaggaaatc tggaatttat cgaagagaaa	2760
ccattaattg gagaagcact gtctcgtgtg aagagagcgg aaaaaaatg gagagacaaa	2820
agggaaaaac tacaagtgga aacaaaacga gtatatatag acgcaaaaaga agctgtggat	2880
gctttattcg tagattctca atatgataga ttacaagcag atacaaacat cggtatgatt	2940
catgcggcag atagacttgt tcatcggatc cacgaggctt atcttccaga actaccttc	3000
attccaggaa taaatgtggg gatttttgaa gaattagaaa accgtatttc tactgcattt	3060
tccttatatg atgcgagaaa tgtcattaaa aatggcgatt tcaataatgg attgacatgc	3120
tggaacgtga aagggcattg agaggtagag cagctgaaca atcatcgttc ggtcctgtc	3180
atcccggaat gggaagcaga agtttcacaa aagggtgcgcg tctgtccagg tcgtggctat	3240
attcttcgtg tcacagcgta caaagaggga tatggggaag gctgcgtaac tattcatgaa	3300

gtcgataata atacagacca attgaagttt agcaactgtg agaaaggaca agtatatcca 3360
ggtaatacga tagcatgtaa tgattataat aagaatcatg gtgcgaatgc atgtagttct 3420
cgtaatcgtg gatatgacga attctatgga aacaccccag ctgattattc tgcaaatcaa 3480
aaagaatacg ggggtgcgta cacttcccac aatcatgcat atggcgaatc ttatgaaagt 3540
aattcgtcca taccagctga ttatgcgccg gtttatgaag aagaagcgta tacacatgga 3600
cgaagaggta attcttgtga atataacaga gggatacac cattaccagc tggttatgtg 3660
acagcagagt tagaatactt cccagaaaacg gatacagtat gggttgagat tggagaaaacg 3720
gaaggaacat ttatcgtgga caatgtggaa ttactcctta tggaggaata g 3771

<210> 2
<211> 1256
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis
<400> 2

Met Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser
1 5 10 15
Ile Pro Thr Val Ser Asn Pro Ser Thr Gln Met Asn Leu Ser Pro Asp
20 25 30
Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Val Ala Glu Val Asn Asn Ile Asp
35 40 45
Pro Phe Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala Gly
50 55 60
Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Leu Ala Ser
65 70 75 80
Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Ser Gly Arg Asp Pro
85 90 95
Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Ile Arg Gln Gln Val
100 105 110
Thr Glu Asn Thr Arg Asn Thr Ala Ile Ala Arg Leu Glu Gly Leu Gly
115 120 125
Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Gln Gln Ala Leu Glu Thr Trp Leu Asp Asn
130 135 140
Arg Asn Asp Ala Arg Ser Arg Ser Ile Ile Leu Glu Arg Tyr Val Ala
145 150 155 160
Leu Glu Leu Asp Ile Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Arg Ile Arg Asn
165 170 175
Gln Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His
180 185 190
Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Trp Gly Thr
195 200 205
Ala Ser Ser Asp Val Asn Gln Tyr Tyr Gln Glu Gln Ile Arg Tyr Thr
210 215 220
Glu Glu Tyr Ser Asn His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn
225 230 235 240

Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe
 245 250 255
 Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro
 260 265 270
 Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr
 275 280 285
 Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly Thr Val His Pro Ser Gln Ala
 290 295 300
 Phe Ala Ser Thr Thr Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala
 305 310 315 320
 Ile Glu Ala Ala Val Ile Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro Glu
 325 330 335
 Gln Leu Thr Ile Tyr Ser Thr Leu Ser Arg Trp Ser Asn Thr Gln Phe
 340 345 350
 Met Asn Ile Trp Ala Gly His Arg Leu Glu Ser Arg Pro Ile Ala Gly
 355 360 365
 Ser Leu Asn Thr Ser Thr Gln Gly Ser Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro
 370 375 380
 Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Ile Tyr Arg Thr Glu Ser Leu
 385 390 395 400
 Ala Gly Leu Asn Ile Phe Ile Thr Gln Pro Val Asn Gly Val Pro Trp
 405 410 415
 Val Arg Phe Asn Trp Arg Asn Pro Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Leu
 420 425 430
 Leu Tyr Thr Ile Gly Tyr Thr Gly Val Gly Thr Gln Leu Gln Asp Ser
 435 440 445
 Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser
 450 455 460
 Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ser Ser Ser His Val
 465 470 475 480
 Arg Ala Leu Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn
 485 490 495
 Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly Arg
 500 505 510
 Phe Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly
 515 520 525
 Asp Val Val Arg Leu Asn Arg Asn Asn Gly Asn Ile Gln Asn Arg Gly
 530 535 540
 Tyr Ile Glu Val Pro Ile Gln Phe Thr Ser Thr Ser Thr Arg Tyr Arg
 545 550 555 560
 Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val Thr Ser Ile Glu Leu Asn Val Asn
 565 570 575
 Trp Gly Asn Ser Ser Ile Phe Thr Asn Thr Leu Pro Ala Thr Ala Ala
 580 585 590
 Ser Leu Asp Asn Leu Gln Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Val Glu Ile Asn
 595 600 605

Asn Ala Phe Thr Ser Ala Thr Gly Asn Ile Val Gly Val Arg Asn Phe
 610 615 620
 Ser Ala Asn Ala Glu Val Ile Ile Asp Arg Phe Glu Phe Ile Pro Val
 625 630 635 640
 Thr Ala Thr Phe Glu Ala Lys Tyr Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala
 645 650 655
 Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Thr Asn Pro Arg Arg Leu Lys Thr Asp
 660 665 670
 Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Gln Val Ser Asn Leu Val Val Cys Leu
 675 680 685
 Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Arg Glu Leu Phe Glu Lys Val
 690 695 700
 Lys Tyr Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro
 705 710 715 720
 Asn Phe Thr Phe Ile Asn Gly Gln Pro Ser Phe Ala Ser Ile Asp Gly
 725 730 735
 Gln Ser Asn Phe Thr Ser Ile Asn Glu Leu Ser Asn His Gly Trp Trp
 740 745 750
 Gly Ser Ala Asn Val Thr Ile Gln Glu Gly Asn Asp Val Phe Lys Glu
 755 760 765
 Asn Tyr Val Thr Leu Pro Gly Thr Phe Asn Glu Cys Tyr Pro Asn Tyr
 770 775 780
 Leu Tyr Gln Lys Ile Gly Glu Ser Glu Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr
 785 790 795 800
 Gln Leu Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu
 805 810 815
 Ile Arg Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Leu Asn Val Pro Gly Thr Glu
 820 825 830
 Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Glu Ser Pro Ile Gly Arg Cys Gly Glu
 835 840 845
 Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Phe Gly Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys
 850 855 860
 Ser Cys Arg Asp Arg Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Thr
 865 870 875 880
 Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Gln Glu Asp Leu Gly Val
 885 890 895
 Trp Val Val Phe Lys Ile Lys Thr Gln Glu Gly Tyr Ala Arg Leu Gly
 900 905 910
 Asn Leu Glu Phe Ile Glu Glu Lys Pro Leu Ile Gly Glu Ala Leu Ser
 915 920 925
 Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu
 930 935 940
 Gln Val Glu Thr Lys Arg Val Tyr Ile Asp Ala Lys Glu Ala Val Asp
 945 950 955 960
 Ala Leu Phe Val Asp Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn
 965 970 975

Ile Gly Met Ile His Ala Ala Asp Arg Leu Val His Arg Ile His Glu
980 985 990

Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Pro Phe Ile Pro Gly Ile Asn Val Val Ile
995 1000 1005

Phe Glu Glu Leu Glu Asn Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ser Leu Tyr
1010 1015 1020

Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu
1025 1030 1035

Thr Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Glu Val Gln Gln Leu Asn
1040 1045 1050

Asn His Arg Ser Val Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val
1055 1060 1065

Ser Gln Lys Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg
1070 1075 1080

Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile
1085 1090 1095

His Glu Val Asp Asn Asn Thr Asp Gln Leu Lys Phe Ser Asn Cys
1100 1105 1110

Glu Lys Gly Gln Val Tyr Pro Gly Asn Thr Ile Ala Cys Asn Asp
1115 1120 1125

Tyr Asn Lys Asn His Gly Ala Asn Ala Cys Ser Ser Arg Asn Arg
1130 1135 1140

Gly Tyr Asp Glu Phe Tyr Gly Asn Thr Pro Ala Asp Tyr Ser Ala
1145 1150 1155

Asn Gln Lys Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser His Asn His Ala
1160 1165 1170

Tyr Gly Glu Ser Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Ile Pro Ala Asp Tyr
1175 1180 1185

Ala Pro Val Tyr Glu Glu Glu Ala Tyr Thr His Gly Arg Arg Gly
1190 1195 1200

Asn Ser Cys Glu Tyr Asn Arg Gly Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly
1205 1210 1215

Tyr Val Thr Ala Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Thr Val
1220 1225 1230

Trp Val Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Asn
1235 1240 1245

Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
1250 1255

<210> 3
<211> 3771
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Molécula sintética
<400> 3
atgacctcca accgtaagaa cgaaaacgaa atcatcaatg ccttcagcat acccaccgtt

aacagct gattaggcag caagttactg aaaacacacg taacacagcc	360
agggtct cggcagagga tategcagct atcagcaagc actggaaacg	420
gaaatga tgcaaggtea cgtccatca ttctcgaacg ctacgtggca	480
taacaac agccatacct ctgttcagaa tcagaaacca agaagtcctt	540
atgctca agcagccaac ttgcacttgc ttcttttgag ggatgcctct	600
aatgggg aaccgcttcc agcgacgtga atcagtacta tcaagagcag	660
aagagta ctcaaatac tgcgttcagt ggtacaatac tggcttgaac	720
ccaatgc cgaatcttgg gtgcgttaca atcagttcag aagagacctc	780
tcgacct cgttgctctc ttccaagct atgacacaag gacttatccc	840
cacagct gacgaggga gtgtacacag acgcaatagg cacagttcac	900
ttgcctc cagcagatgg ttcaacaaca atgcacctc attctcagcc	960
tgattcg tccaccccat ttgctggact ttccagagca gttgacgac	1020
caagggtg gtcaaacacg caattcatga acatttgggc tggatcataga	1080
caatcgc tggttctctt aacacatcaa cccaaggctc caccaacacc	1140
tcacctt ccagttcacc agcagagaca tctatcgac agaatacctt	1200
tcttcat tacacagcca gtcaatggag tcccgtaggt gaggttcaac	1260
tgaactc acttagggga agccttcttt acaccatagg ttacacgggt	1320
tgcaaga ttacagagact gaactgcctc ccgagaccac cgaacgtccc	1380
actccca ccgtctgtcc cacattgggtc ttatcagctc cagccacgtg	1440
actcttg gacgcacgc tccgctgata ggaccaatac cataggtccg	1500
agatccc agcagtgaag ggcagattct tgttcaatgg ctctgtcatt	1560
tacttgg tggtagctc gttcgttga acagaaacaa tgggaacatt	1620
acatega ggtgcccac cagtttactt ctacatcaac acgttacaga	1680
acgcctc tgtgacttct attgaattga acgtgaactg gggaaacagc	1740
acacact tccagccacc gcagcttcac tggacaatct tcagtctggg	1800
tggagat caacaatgct ttcacgtctg ccactgggaa cattgttgg	1860
ctgccaa tgccgaggtg atcatagata gatttgagtt cattccagtt	1920
aggcaaa gtacgatctt gagagagcac agaaggctgt caacgtctctg	1980
acccaag acgtctgaaa actgatgtga cagactatca catcgatcaa	2040
tggtttg cctctcagat gagttctgct tggatgagaa gagggaactc	2100

tttgagaagg ttaagtatgc aaaacgcctt tcagacgaaa gaaacttgct gcaagacccc 2160
aactttacgt tcatcaatgg acaacctagc ttcgcttcca ttgatggcca aagcaacttt 2220
actttetatca atgagttgtc taatcacggc tggtagggaa gcgcaaattg cacaattcaa 2280
gaaggcaacg atgtgttcaa agagaactac gtgacgctgc ctggaacatt caatgagtg 2340
tatccgaact acttgatatca gaagattggg gaatcagagc tgaaggctta cactcgctat 2400
cagctgcgtg gttacatcga ggactcccaa gaccttgaaa tctatctcat ccgctacaac 2460
gctaaacacg agacattgaa tgttcctgga acagagtcct tttggcctct gtcagttgag 2520
tctcctatag ggaggtgtgg cgaacctaac agatgtgctc ctcactttgg gtggaatccc 2580
gatttggtt gctctttagg ggatcgcgag aagtgcgctc accattcaca ccactttacg 2640
ctggacatag atgttggtg cacggacctt caagaggatc tcggtgtgtg ggtcgtgttc 2700
aagatcaaaa ctcaagaggg ctacgcaaga ctcggaatc ttgagttcat tgaggagaag 2760
cctctcattg gcgaggtct ctctagggtg aagagagccg agaagaagtg gcgtgacaag 2820
agggagaaac ttcaagttga gacgaagagg gtgtacattg atgctaaaga ggctgttgat 2880
gcactgtttg tggattcaca gtatgatagg ctccaagctg acacaaacat tggaatgatt 2940
catgcagcag atcgctcgt gcacgcacat catgaggctt atcttcgga actcccgctc 3000
atccctggga tcaatgttgt catctttgag gagcttgaga accgcatatc cacagccttt 3060
tccctctacg atgctagaaa tgttatcaag aatggcgatt tcaacaatgg cttgacgtgt 3120
tggaatgtca aagggcatgt tgagggtcaa cagttgaaca accataggtc agtcctcgctc 3180
attccggagt gggaggcaga ggttagccaa aaggtgagag tttgcctgg acgtggctac 3240
attctgagag tcaactgcct caaggagggc tacggagaag ggtgcgtcac catccatgaa 3300
gttgataaca atactgacca gttgaagttt tccaactgcg agaaaggga agtgtatcct 3360
gggaatacca ttgcatgtaa cgattacaac aagaatcacg gtgctaacgc ttgctcatct 3420
cgcaataggg gatgatgta gttctatggc aatactccag ctgactactc tgcaaaccag 3480
aaagagtatg gaggagctta caccagccac aaccatgcct atggggaatc ttacgaatcc 3540
aacagcagca tcccagcaga ctatgctccg gtctacgagg aggaagccta cacacatgga 3600
aggaggggaa actcatgtga gtacaataga ggctacactc cgttgccagc tggctacgtc 3660
actgccgaat tggagtactt tccggaaacc gacactgtct gggttgagat aggcgaaact 3720
gagggcacct tcacgttga caacgtggaa cttctgctta tggaagaata g 3771

<210> 4
<211> 545
<212> PRT
<213> Bacillus thuringiensis

<400> 4

Leu Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala Val Asn Ala
1 5 10 15

Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp Val Thr Asp
20 25 30

Tyr His Ile Asp Arg Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu Ser Asp Glu
 35 40 45
 Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val Lys His Ala
 50 55 60
 Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro Asn Phe Arg
 65 70 75 80
 Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser Thr Asp Ile
 85 90 95
 Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr Val Thr Leu
 100 105 110
 Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr Gln Lys Ile
 115 120 125
 Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Arg Gly Tyr
 130 135 140
 Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg Tyr Asn Ala
 145 150 155 160
 Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu Trp Pro Leu
 165 170 175
 Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser His His Phe
 180 185 190
 Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu Asp Leu Gly
 195 200 205
 Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala Arg Leu
 210 215 220
 Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu Ala Leu
 225 230 235 240
 Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys
 245 250 255
 Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu Ser Val
 260 265 270
 Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr
 275 280 285
 Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser Ile Arg
 290 295 300
 Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn Ala Ala
 305 310 315 320
 Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser Leu Tyr
 325 330 335
 Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu Ser
 340 345 350
 Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn Asn His
 355 360 365
 Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser Gln Glu
 370 375 380
 Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr Ala Tyr
 385 390 395 400

Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu Ile Glu Asn
 405 410 415
 Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr
 420 425 430
 Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu
 435 440 445
 Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr
 450 455 460
 Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu
 465 470 475 480
 Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg
 485 490 495
 Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu
 500 505 510
 Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu
 515 520 525
 Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu
 530 535 540
 Glu
 545

<210> 5
 <211> 1188
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220> Proteína quimérica, toxina central DIG3 con protoxina Cry1Ab
 <223>

<400> 5

Met Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser
 1 5 10 15
 Ile Pro Thr Val Ser Asn Pro Ser Thr Gln Met Asn Leu Ser Pro Asp
 20 25 30
 Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Val Ala Glu Val Asn Asn Ile Asp
 35 40 45
 Pro Phe Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala Gly
 50 55 60
 Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Leu Ala Ser
 65 70 75 80
 Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Ser Gly Arg Asp Pro
 85 90 95
 Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Ile Arg Gln Gln Val
 100 105 110
 Thr Glu Asn Thr Arg Asn Thr Ala Ile Ala Arg Leu Glu Gly Leu Gly
 115 120 125
 Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Gln Gln Ala Leu Glu Thr Trp Leu Asp Asn
 130 135 140

67321

Arg Asn Asp Ala Arg Ser Arg Ser Ile Ile Leu Glu Arg Tyr Val Ala
 145 150 155 160
 Leu Glu Leu Asp Ile Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Arg Ile Arg Asn
 165 170 175
 Gln Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His
 180 185 190
 Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Trp Gly Thr
 195 200 205
 Ala Ser Ser Asp Val Asn Gln Tyr Tyr Gln Glu Gln Ile Arg Tyr Thr
 210 215 220
 Glu Glu Tyr Ser Asn His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn
 225 230 235 240
 Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe
 245 250 255
 Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro
 260 265 270
 Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr
 275 280 285
 Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly Thr Val His Pro Ser Gln Ala
 290 295 300
 Phe Ala Ser Thr Thr Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala
 305 310 315 320
 Ile Glu Ala Ala Val Ile Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro Glu
 325 330 335
 Gln Leu Thr Ile Tyr Ser Thr Leu Ser Arg Trp Ser Asn Thr Gln Phe
 340 345 350
 Met Asn Ile Trp Ala Gly His Arg Leu Glu Ser Arg Pro Ile Ala Gly
 355 360 365
 Ser Leu Asn Thr Ser Thr Gln Gly Ser Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro
 370 375 380
 Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Ile Tyr Arg Thr Glu Ser Leu
 385 390 395 400
 Ala Gly Leu Asn Ile Phe Ile Thr Gln Pro Val Asn Gly Val Pro Trp
 405 410 415
 Val Arg Phe Asn Trp Arg Asn Pro Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Leu
 420 425 430
 Leu Tyr Thr Ile Gly Tyr Thr Gly Val Gly Thr Gln Leu Gln Asp Ser
 435 440 445
 Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser
 450 455 460
 Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ser Ser Ser His Val
 465 470 475 480
 Arg Ala Leu Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn
 485 490 495
 Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly Arg
 500 505 510

Phe Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly
 515 520 525
 Asp Val Val Arg Leu Asn Arg Asn Asn Gly Asn Ile Gln Asn Arg Gly
 530 535 540
 Tyr Ile Glu Val Pro Ile Gln Phe Thr Ser Thr Ser Thr Arg Tyr Arg
 545 550 555 560
 Val Arg Val Arg Tyr Ala Ser Val Thr Ser Ile Glu Leu Asn Val Asn
 565 570 575
 Trp Gly Asn Ser Ser Ile Phe Thr Asn Thr Leu Pro Ala Thr Ala Ala
 580 585 590
 Ser Leu Asp Asn Leu Gln Ser Gly Asp Phe Gly Tyr Val Glu Ile Asn
 595 600 605
 Asn Ala Phe Thr Ser Ala Thr Gly Asn Ile Val Gly Val Arg Asn Phe
 610 615 620
 Ser Ala Asn Ala Glu Val Ile Ile Asp Arg Phe Glu Phe Ile Pro Val
 625 630 635 640
 Thr Ala Thr Leu Glu Ala Glu Ser Asp Leu Glu Arg Ala Gln Lys Ala
 645 650 655
 Val Asn Ala Leu Phe Thr Ser Ser Asn Gln Ile Gly Leu Lys Thr Asp
 660 665 670
 Val Thr Asp Tyr His Ile Asp Arg Val Ser Asn Leu Val Glu Cys Leu
 675 680 685
 Ser Asp Glu Phe Cys Leu Asp Glu Lys Lys Glu Leu Ser Glu Lys Val
 690 695 700
 Lys His Ala Lys Arg Leu Ser Asp Glu Arg Asn Leu Leu Gln Asp Pro
 705 710 715 720
 Asn Phe Arg Gly Ile Asn Arg Gln Leu Asp Arg Gly Trp Arg Gly Ser
 725 730 735
 Thr Asp Ile Thr Ile Gln Gly Gly Asp Asp Val Phe Lys Glu Asn Tyr
 740 745 750
 Val Thr Leu Leu Gly Thr Phe Asp Glu Cys Tyr Pro Thr Tyr Leu Tyr
 755 760 765
 Gln Lys Ile Asp Glu Ser Lys Leu Lys Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu
 770 775 780
 Arg Gly Tyr Ile Glu Asp Ser Gln Asp Leu Glu Ile Tyr Leu Ile Arg
 785 790 795 800
 Tyr Asn Ala Lys His Glu Thr Val Asn Val Pro Gly Thr Gly Ser Leu
 805 810 815
 Trp Pro Leu Ser Ala Pro Ser Pro Ile Gly Lys Cys Ala His His Ser
 820 825 830
 His His Phe Ser Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Asn Glu
 835 840 845
 Asp Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His
 850 855 860
 Ala Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly
 865 870 875 880

Glu Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys
 885 890 895
 Arg Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys
 900 905 910
 Glu Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln
 915 920 925
 Ala Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His
 930 935 940
 Ser Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val
 945 950 955 960
 Asn Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe
 965 970 975
 Ser Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn
 980 985 990
 Gly Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln
 995 1000 1005
 Asn Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu
 1010 1015 1020
 Val Ser Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu
 1025 1030 1035
 Arg Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr
 1040 1045 1050
 Ile His Glu Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn
 1055 1060 1065
 Cys Val Glu Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn
 1070 1075 1080
 Asp Tyr Thr Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser
 1085 1090 1095
 Arg Asn Arg Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val
 1100 1105 1110
 Pro Ala Asp Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp
 1115 1120 1125
 Gly Arg Arg Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp
 1130 1135 1140
 Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr
 1145 1150 1155
 Phe Pro Glu Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu
 1160 1165 1170
 Gly Thr Phe Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1175 1180 1185

<210> 6
 <211> 1635
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Molécula sintética

<400> 6
ctcgaggctg aatctgatct cgaaagggca cagaaagctg taaacgcatt gtttacaagt 60
tctaatacaaa tcggactcaa aaccgatgtt acggactatc acatagatag ggtttctaata 120
cttgtggaat gtctttcaga tgagttttgt ttagatgaga agaaagaact ttcagaaaag 180
gtcaagcacg ccaaaagact gtccgatgaa aggaatctcc ttcaagaccc aaactttcgt 240
ggaatcaata ggcagctcga cagaggttgg agagggagca cagatatcac cattcaagga 300
ggagatgacg ttttcaaaga gaactatgtc accttgtag gcacctttga tgagtgtat 360
ccaacttacc tgtatcagaa gattgatgaa tccaagctga aggttacac aagatatcag 420
ctcagaggat acatcgagga ctccaagat ttggagatat acttgattcg ttacaatgca 480
aaacatgaga cagtgaatgt tcctgttact ggaagtctct ggccactgtc tgctcogtca 540
cctattggga aatgtgccca tcactccac catttctcat tggacataga cgttggtgc 600
acagatttga atgaagattt ggggtgttgg gtcacttca agatcaaac tcaagacgga 660
cacgctcgtt taggaaactt agagtttctt gaagagaagc ccttggttgg ggaggcactt 720
gccagagtaa agagagctga aaagaagtgg agagataaga gggagaaact tgagtggag 780
actaacattg tgtacaagga agccaaaga agcgtggatg ctcttttcgt gaactctcag 840
tatgataggt tacaagcaga caccaacata gcaatgatac atgcagctga caaaagagtc 900
cattctattc gtgaggctta cttgccagaa cttagtgtga ttcccggtgt caacgctgcc 960
attttcgagg aattggaagg aagaatcttt acggctttca gcctctatga cgttaggaat 1020
gttatcaaga atggtgattt caacaatggc ctctcatgtt ggaatgtgaa aggtcatgtt 1080
gatgtagagg agcaaaacaa tcaccgtagc gtgctggttg tcccagaatg ggaagccgaa 1140
gtaagccaag aagttagagt ttgcctgga agaggctaca ttctgcgtgt caccgcttac 1200
aaagaaggat atggcgaagg gtgcgtgact attcatgaga ttgagaacaa tactgacgaa 1260
cttaagtttt caaactgcgt cgaggaggaa gtgtatccta acaacacagt gacttgaat 1320
gactatacag caacgcaaga ggaatacgag gggacataca ccagtcgtaa tcgtggttat 1380
gatggtgctt atgaaagcaa ttcatccgtt ccagctgact atgccagtgc ctacgaagag 1440
aaggcttaca cggatggcag aagagataac ccatgtgagt ccaacagagg ttatggtgat 1500
tacactcttc ttccagctgg ttacgtgact aaagagttag agtactttcc ggagactgat 1560
aaggtttggg ttgaaatcgg agagacagaa gggacattca tagtagattc agttgagctt 1620
cttctcatgg aagaa 1635

<210> 7
<211> 1635
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Molécula sintética

<400> 7
ctcgaggctg aatcgatct tgaaagggca cagaaggcag tcaacgctct cttcaccagc 60

tcaaatecaga ttggccttaa gaccgatgtt actgactatc atatcgacag agttttctaac	120
cttgteagagt gcctctccga cgagttctgt ctcgacgaaa agaaggaact ctccgagaaa	180
gtgaagcacg cgaaacgcct ctcggatgaa cggaacttgc tgcaagatcc gaacttcaga	240
ggcatcaatc gccagttgga tagaggctgg aggggatcaa ccgacataac cattcaaggt	300
ggggatgatg tgttcaagga aaactacgtg acattgctgg gcaccttcga cgagtgtat	360
cccacgtatc tctatcagaa gattgacgag tccaagctca aagcctacac acgctatcag	420
ctcagaggct acattgagga ctctcaagac ctcgaaatct acttgatcag atacaacgcc	480
aagcacgaga cgggtgaacgt ccctgggact gggtcactgt ggccactgtc ggcaccctcg	540
ccaatcggaa agtgcgctca ccacagccac cacttctccc ttgacataga tgttgggtgt	600
acggacttga atgaggatct ggggtgtgtg gtgatcttta agatcaagac ccaagatggt	660
catgcgaggc ttggcaacct tgagttcctt gaagagaagc ctttggtcgg agaggcactg	720
gctcgcgtga agagggctga gaagaaatgg agggacaaga gggagaaaact ggagtgggag	780
accaacatag tgtacaagga ggccaaggag tcagtggacg cactgtttgt caattcccag	840
tatgataggc tccaagcgga cacgaacatc gccatgatcc atgcagcgga caagagggtt	900
cactccataa gggaggccta tcttcggag ctgtcagtga ttcctggggt caacgcagcc	960
atctttgagg aattggaagg gaggatcttc accgctttct ctctgtacga cgctcggaac	1020
gtcatcaaga atggtgattt caacaatgga ctcagctgct ggaacgtgaa agggcatgtc	1080
gatgttgaag aacagaacaa tcaccgcagc gtgctggtgg ttccggagtg ggaagccgag	1140
gtctcacaag aagtcagagt gtgccctggg aggggttaca tcttgcggtt cacagcctac	1200
aaggaagggt atggcgaagg ctgtgtcacg atccatgaga tcgaaaacaa cacagacgag	1260
ctgaagtttt ccaactgtgt tgaggaggag gtctatccta acaatactgt tacgtgcaac	1320
gactacacag ccaactcaaga ggagtacgag ggcacttaca cctctcgcaa cagaggctac	1380
gacggtgcct acgagtcaaa cagctccgtg ccagcggact acgcctcggc ttacgaagag	1440
aaggcgtaca ccgacggtcg gagggataac ccgtgcgaga gcaatagagg ctatggcgac	1500
tacactcttc tcccagctgg ctacgtgacc aaggagttgg agtactttcc ggagacagac	1560
aaagtctgga ttgagattgg agagacagaa ggcacgttca tcgtggactc tgttgaactc	1620
ttgctgatgg aggag	1635

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/028381

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/325 C12N15/82
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KUO WHITE-SHANG ET AL: "Cloning of two new cry genes from <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>wuhanensis</i> strain" CURRENT MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 227-232, XP002589373 ISSN: 0343-8651 approx. 90% identity to aa 113-643, 73-643 and 1-643 of SEQ ID NO:2; the whole document ----- -/--	1-13

☒

Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

E earlier document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 July 2010

Date of mailing of the international search report

22/07/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kania, Thomas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/028381

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 1 October 2002 (2002-10-01), "SubName: Full=CryIBII;" XP002590686 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8KNY2 Database accession no. Q8KNY2 compound	1-13
A	WO 99/24581 A2 (MYCOGEN CORP [US]) 20 May 1999 (1999-05-20) 85.5% sequence identity to SEQ ID NO:5	1-13
A	WO 2004/020636 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; BOGDANOVA NATALIA N [US]; ROMANO CHARLES) 11 March 2004 (2004-03-11) 85% sequence identity to SEQ ID NO:1 and 71% identity to SEQ ID NO:3	1-13
A	WO 2008/145406 A1 (BAYER BIOSCIENCE NV [BE]; GOSSELE VERONIQUE [BE]; SAEY BERNADETTE [BE]) 4 December 2008 (2008-12-04)	1-13
A	US 2009/023653 A1 (MALVAR THOMAS [US] ET AL) 22 January 2009 (2009-01-22)	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2010/028381

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UniProt [Online] 1 October 2002 (2002-10-01), "SubName: Full=CryIBII;" XP002590686 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q8KNY2 Database accession no. Q8KNY2 compound	1-13
A	WO 99/24581 A2 (MYCOGEN CORP [US]) 20 May 1999 (1999-05-20) 85.5% sequence identity to SEQ ID NO:5	1-13
A	WO 2004/020636 A1 (MONSANTO TECHNOLOGY LLC [US]; BOGDANOVA NATALIA N [US]; ROMANO CHARLES) 11 March 2004 (2004-03-11) 85% sequence identity to SEQ ID NO:1 and 71% identity to SEQ ID NO:3	1-13
A	WO 2008/145406 A1 (BAYER BIOSCIENCE NV [BE]; GOSSELE VERONIQUE [BE]; SAEY BERNADETTE [BE]) 4 December 2008 (2008-12-04)	1-13
A	US 2009/023653 A1 (MALVAR THOMAS [US] ET AL) 22 January 2009 (2009-01-22)	1-13

89

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: PCT/US2010/028381 22) Fecha de solicitud: 24/03/2010 (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/170,189 17/04/2009 US		(51) Int Cl: C07 K014/325 (71) Solicitante(s) DOW AGROSCIENCES LLC (72) Inventor(es) JUSTIN LIRA Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 17/11/2011 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT/ Fecha de presentación de la solicitud: 24/03/2010 No. de solicitud PCT/US2010/028381		(87) Publicación internacional Fecha: 21/10/2010 N° publicación: WO 2010/120452 A1	
(54) Título: TOXINAS CRY INSECTICIDAS DIG-3			

Resumen:

Toxinas Cry DIG-3, poli nucleótidos que codifican tales toxinas, y plantas transgénicas que producen tales toxinas son útiles para controlar plagas de insectos.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 108557

Bogotá D.C., Noviembre 08 de 2011 - 07:35:41

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430559172	04/11/2011	43.527.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	VR. UNITARIO	VR. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
			\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156684-00000-0000

Fecha: 2011-11-17 12:32:10

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTE/II

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 93

COLO: 50975-841-066-5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Noviembre 8 de 2011 - 07:35:53

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 108499

Bogotá D.C., Noviembre 08 de 2011 - 07:35:41

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430559172	04/11/2011	43.527.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156684-00000-0000

Fecha: 2011-11-17 12:32:10 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

COLO: 10975-841-066-5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Noviembre 8 de 2011 - 07:35:52

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 108500

Bogotá D.C., Noviembre 08 de 2011 - 07:35:41

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	430559172	04/11/2011	43.527.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00
=====				

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156684-00000-0000

Fecha: 2011-11-17 12:32:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

0010:50975 - 841-066-5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 8 de 2011 - 07:35:52

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2
-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 103492

Bogotá D.C., Octubre 21 de 2011 - 17:08:03

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431629962	21/10/2011	39.126.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de-Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-156684- -00000-0000

Fecha: 2011-11-17 12:32:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

COLO: 10975-841-066-5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Octubre 21 de 2011 - 17:08:10



No. 11-156684- -00000-0000

Fecha: 2011-11-17 12:32:10 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 93

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐