



No. 12-121225- -00000-0000

Fecha: 2012-07-18 16:49:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO PLATAFORMAS DE ATERRIZAJE DISEÑADAS PARA EL

PLATAFORMAS DE ATERRIZAJE DISEÑADAS PARA EL

ENVIO AL OBJETIVO DEL GEN EN LAS PLANTAS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE DOW AGROSCIENCES LLC

DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
c.c. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D. C.,**_____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

de radicación


No. 12-121225- -00000-0000

Fecha: 2012-07-18 16:49:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
		☒ Capítulo I	☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/US2011/022145	Fecha 2011/01/21
	Publicación Internacional No.	WO 2011/091317	Fecha 2011/07/28
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
	PLATAFORMAS DE ATERRIZAJE DISEÑADAS PARA EL ENVÍO AL OBJETIVO DEL GEN EN LAS PLANTAS		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	A01H 005/000, C12N 015/029, C12N 015/082		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
	DOW AGROSCIENCES LLC		
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN	9330 Zionsville Road	No. TELÉFONO 3 47 36 11
	CIUDAD	Indianapolis 46268	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
	DEPARTAMENTO/ESTADO	Indiana	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
	PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América	
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. AINLEY	William Michael	Estadounidense
	2. BLUE	Ryan C.	Estadounidense
	3. MURRAY	Michael G.	Estadounidense
	4. CORBIN	David Richard	Estadounidense
	5. MILES	Rebecca Ruth	Estadounidense
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
	1. Estados Unidos de América	Indiana	Carmel 46032 1474 Clearwater Ct,
	2. Estados Unidos de América	Indiana	Fishers 46037 10080 Glenn Abbey Lane,
	3. Estados Unidos de América	Indiana	Carmel 46033 19 Lakeshore Court,
	4. Estados Unidos de América	Indiana	Carmel 46032 2628 Towne Drive,
	5. Estados Unidos de América	Indiana	Pendleton 46064 572 Redwood Dr.,
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO				
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia		IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555	
DIRECCIÓN Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11			
CIUDAD BOGOTA		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com			
PAÍS COLOMBIA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO				
(33) PAÍS DE ORIGEN U.S.A.		CÓDIGO PAÍS US		(31) NÚMERO 61/297,641	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/01/22
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.					
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.					
13	REDUCCIÓN DE TASAS				
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.					
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐					
Universidades públicas o privadas ☐					
Entidades sin ánimo de lucro ☐					
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos					
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO				
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.					
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		No. 12-0070422 No. 12-0071432	Fecha: 2012/07/11 Fecha: 2012/07/13	
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL				
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)					
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ			Firma <i>Luz Clemencia De Páez</i> <i>TP 23555</i>		
C.C 35.456.344 de Usaquen			Tarjeta Profesional 23.555		

 SCT\SDC\ID-AF221829\WPC10975

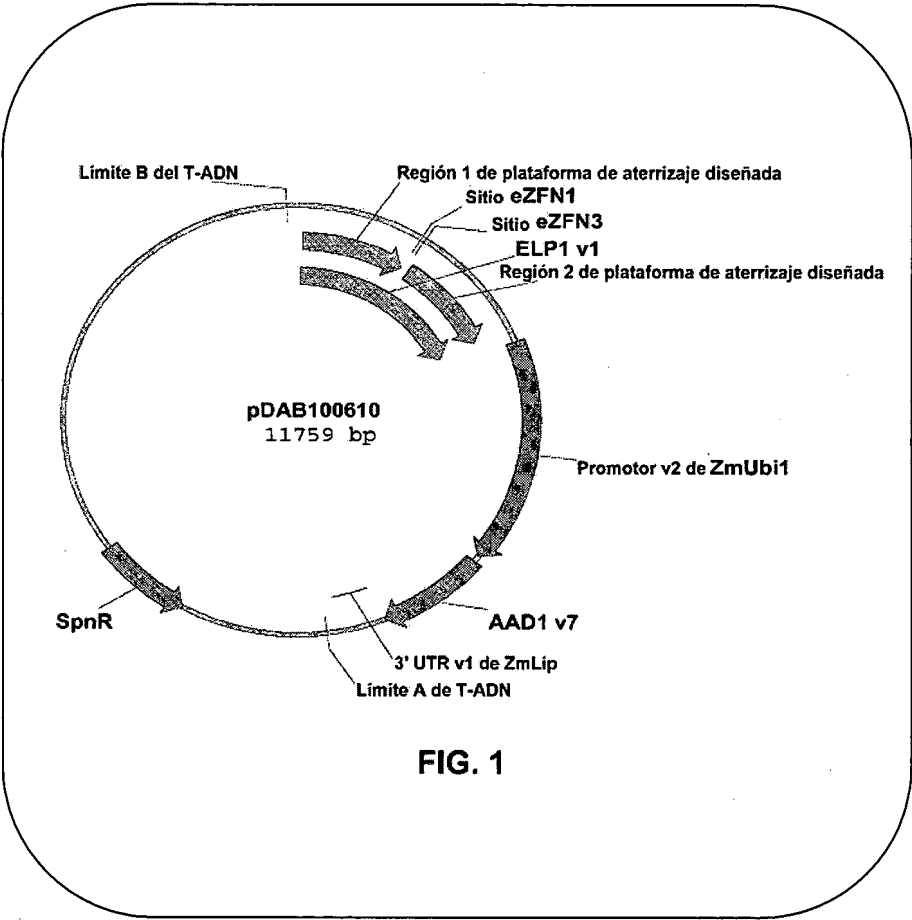
17	ANEXOS
----	--------

Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>85</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>21</u> 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: <u>23</u> 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poder de DOW AGROSCIENCES LLC 10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medinas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☒ Comprobante de pago por 11 reivindicaciones adicionales a 10, por valor de \$330.000.
--	--

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención			FECHA DE PRESENTACIÓN	
☐ Patente de Modelo de Utilidad				
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2.				
3.				
4.				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2.				
3.				
4.				
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
2.				
3.				
4.				
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. WEBB		Steven R.	Estadounidense	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. 15416 Bloomfield Court,		Westfield 46074	Indiana	Estados Unidos de América
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				
9.				
10.				

FIGURA CARACTERISTICA



(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)
(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
28 July 2011 (28.07.2011)



(10) International Publication Number
WO 2011/091317 A2

(51) International Patent Classification:
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

Pendleton, Indiana 46064 (US). **WEBB, Steven, R.** [CA/US]; 15416 Bloomfield Court, Westfield, Indiana 46074 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2011/022145

(74) Agent: **CATAXINOS, Edgar, R.**; Traskbritt, PO Box 2550, Salt Lake City, Utah 84110 (US).

(22) International Filing Date:
21 January 2011 (21.01.2011)

(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.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/297,641 22 January 2010 (22.01.2010) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **AINLEY, William, Michael** [US/US]; 1474 Clearwater Ct, Carmel, Indiana 46032 (US). **BLUE, Ryan, C.** [US/US]; 10080 Glenn Abbey Lane, Fishers, Indiana 46037 (US). **MURRAY, Michael, G.** [US/US]; 19 Lakeshore Court, Carmel, Indiana 46033 (US). **CORBIN, David, Richard** [US/US]; 2628 Towne Drive, Carmel, Indiana 46032 (US). **MILES, Rebecca, Ruth** [US/US]; 572 Redwood Dr.,

(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 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: ENGINEERED LANDING PADS FOR GENE TARGETING IN PLANTS

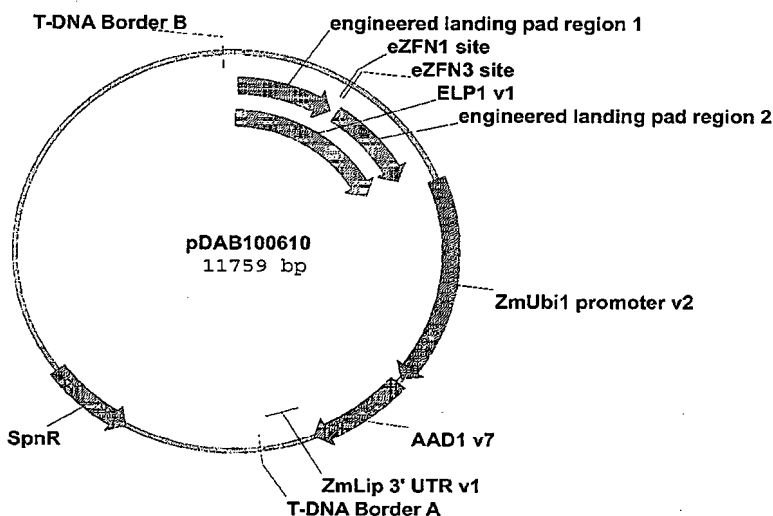


Fig. 1

(57) Abstract: A method for producing a transgenic plant includes providing a nucleic acid molecule comprising at least two regions of nucleic acid sequence that lack sequence homology with genomic DNA of the plant cell, and at least two zinc finger nuclease recognition sites, wherein the at least two regions of nucleic acid sequence that lack sequence homology with genomic DNA of the plant cell flank the at least two zinc finger nuclease recognition sites. A plant cell or tissue having the nucleic acid molecule stably integrated into the genome of the plant cell is transformed. A plant is regenerated from the plant cell. Transgenic plants are produced by the method. Seeds are produced by the transgenic plants.

WO 2011/091317 A2

PLATAFORMAS DE ATERRIZAJE DISEÑADAS PARA EL ENVÍO
AL OBJETIVO DEL GEN EN LAS PLANTAS

Referencia Cruzada con Solicitudes Relacionadas

5 La presente solicitud reclama el beneficio de la fecha de
presentación de la Solicitud de Patente Provisional
Norteamericana Serie Número 61/297,641, presentada el 22 de
enero de 2010, para "PLATAFORMAS DE ATERRIZAJE
DISEÑADAS PARA EL ENVÍO AL OBJETIVO DEL GEN EN LAS
10 PLANTAS."

Campo de la Invención

La presente invención se refiere generalmente a
composiciones y métodos para la generación de organismos
transgénicos, por ejemplo, plantas. En ciertas modalidades, los
15 métodos de la presente invención permiten la incorporación de
plataformas de aterrizaje diseñadas (ELPs) (POR SUS SIGLAS
EN INGLÉS) en un sitio genómico, facilitando de esta manera la
introducción de moléculas de interés adicionales de ácido
nucleico dentro del sitio genómico definido que contiene uno o
20 más ELPs. En algunas modalidades, los ELPs puede
comprender regiones de secuencias de nucleótido que
comprenden secuencias esencialmente aleatorias que flanquean
en los sitios de enlace de la nucleasa del dedo de zinc (ZFN)
(POR SUS SIGLAS EN INGLÉS).

WO 2011/091317 A2



Published:

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

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

Antecedente de la Invención

Muchas plantas son transformadas genéticamente con genes de otras especies para introducir características deseadas, tales como para mejorar su valor agrícola a través de, por ejemplo, la mejora de la calidad de valor nutricional, aumento de rendimiento, conferir resistencia a las plagas o enfermedades, aumentar la tolerancia a la sequía y el estrés, mejorar las calidades de horticultura tales como pigmentación y crecimiento, y/o impartir resistencia a los herbicidas; haciendo posible la producción de compuestos industrialmente útiles y/o materiales de la planta; y/o haciendo posible la producción de productos farmacéuticos. La introducción de los genes clonados en las células de las plantas y la recuperación de plantas transgénicas fértiles estables puede ser utilizada para hacer dichas modificaciones de una planta, y ha permitido la ingeniería genética de las plantas para (por ejemplo, mejora de la cosecha). En estos métodos, el ADN extraño generalmente es introducido de manera aleatoria dentro de un ADN nuclear o plástido de la célula eucariótica de la planta, seguido por el aislamiento de células que contienen el ADN extraño integrado en el ADN de las células para producir células de plantas transformadas de manera estable.

La primera generación de plantas transgénicas fueron generalmente generadas por la tecnología de transformación portada por el *Agrobacterium*. Los éxitos con estas técnicas

apresuraron el desarrollo de otros métodos para introducir una molécula de ácido nucleico de interés dentro del genoma de una planta, tales como la asimilación de ADN transportada por PEG en los protoplastos, bombardeo de microproyectiles, y
5 transformación portada por whiskers de silicón.

En todos estos métodos de transformación de la planta, no obstante, los transgenes incorporados en el genoma de la planta son integrados de una manera aleatoria y en un número de copias impredecible. Frecuentemente, los transgenes pueden
10 ser integrados en la forma de repetición, ya sea el transgén completo o partes del mismo. Dicho patrón de integración del complejo puede influir en el nivel de expresión de los transgenes (por ejemplo, mediante la destrucción del ARN transcrito a través de los mecanismos de silenciamiento del gen
15 posterior a la transcripción o por inducir metilación del ADN introducido), desactivando de esta manera la transcripción del transgén. También, el sitio de integración por sí mismo puede influir en el nivel de expresión del transgén. La combinación de estos factores resulta en una variación amplia en el nivel de
20 expresión de los transgenes o el ADN de interés extraño entre diferentes células de plantas transgénicas y líneas de plantas. Además, la integración del ADN de interés extraño puede tener un efecto perjudicial en la región del genoma en donde ocurre la integración y puede influir o perturbar la función normal de
25 esa región objetivo, conduciendo de esta manera a efectos

secundarios generalmente no deseables.

Lo anterior necesita que, siempre que el efecto de introducción de un ADN extraño y particular en una planta sea investigado, que se ha generado un número grande de líneas de plantas transgénicas y analizadas con el objeto de obtener resultados importantes. De un modo similar, en la generación de plantas de cosecha transgénica, en donde un ADN de interés particular es introducido en las plantas para proporcionar una planta transgénica con un fenotipo deseado, una población grande de líneas de plantas transgénicas creadas independientemente para permitir la selección de aquellas líneas de plantas con una expresión óptima de los transgenes, y con efectos secundarios mínimos y sin ellos en el fenotipo general de la planta transgénica. Particularmente, en este campo, se desean métodos transgénicos más directos, por ejemplo, en vista de requerimientos regulatorios bastante costosos y los altos costos asociados con las características archivadas repetidas requeridas para la eliminación de eventos transgénicos no deseados. Además, deberá quedar claro que la posibilidad de la inserción del ADN enviado al objetivo sería benéfico en el proceso del apilado del transgén.

Varios métodos han sido desarrollados en un esfuerzo para controlar la inserción del transgén en las plantas. Consultar por ejemplo, Kumar y Fladung (2001) Trends Plant Sci. 6: páginas 155 a 159. Estos métodos dependen de la

integración del transgén basada en la recombinación homóloga. Esta estrategia ha sido aplicada exitosamente en procariotes y eucariotes inferiores. Paszkowski y asociados (1988) EMBO J. 7: páginas 4021 a 4026. Sin embargo, para las plantas, en los
5 mecanismos predominantes hasta recientemente para la integración del transgén están basados en la recombinación ilegítima la cual comprende poca homología entre los hilos de ADN recombinante. Un reto importante en esta área es por lo tanto, la detención de eventos de recombinación homóloga
10 raros, los cuales son ocultados por una integración bastante más eficiente del ADN extraño introducido por medio de una recombinación ilegítima.

Las nucleasas del dedo de zinc diseñadas a la medida (ZFNs) son proteínas diseñadas para administrar una rotura del
15 hilo doble específica del sitio enviado al objetivo en el ADN, con una recombinación posterior de los extremos lavados. El ZFNs combina el dominio de disociación no específico de la endonucleasa de restricción, tales como por ejemplo, *FokI*, con proteínas de enlace de ADN del dedo de zinc. Consultar las
20 publicaciones de, Huang y asociados (1996) en J. Protein Chem. 15: páginas 481 a 489; Kim y asociados (1997) en Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 94: páginas 3616 a 3620; Kim y asociados (1996) en Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 93: páginas 1156 a 1160; Kim y asociados (1994) en Proc Natl. Acad. Sci. EUA 91:
25 páginas 883 a 887; Kim y asociados (1997b) en Proc. Natl.

Acad. Sci. EUA 94: páginas 12875 a 12879; Kim y asociados (1997c) en Gene 203: páginas 43 a 49; Kim y asociados (1998) en Biol. Chem. 379: páginas 489 a 495; Nahon y Raveh (1998) en Nucleic Acids Res. 26: páginas 1233 a 1239; Smith y asociados (1999) en Nucleic Acids Res. 27: páginas 674 a 681. Las porciones individuales del dedo de zinc pueden ser diseñadas para enviar al objetivo y enlazar un amplio rango de sitios de ADN. Los Cys₂His₂ canónicos así como las proteínas del dedo de zinc Cys₃His no canónicas enlazan el ADN insertando una α -hélice en la ranura mayor de la hélice doble. El reconocimiento del ADN por los dedos de zinc es modular: cada dedo hace contacto principalmente con tres pares básicos consecutivos en el objetivo, y unos cuantos residuos clave en el reconocimiento portado por la proteína. Se ha mostrado que la endonucleasa de restricción *FokI* debe dimerizarse por medio de un dominio de nucleasa con el objeto de disociar el ADN, induciendo una rotura del hilo doble. De un modo similar, los ZFNs también requieren dimerización del dominio de nucleasa con el objeto de cortar el ADN. Mani y asociados (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun. 334: páginas 1191 a 1197; Smith y asociados (2000) Nucleic Acids Res. 28: páginas 3361 a 3369. La dimerización del ZFN es facilitada por dos sitios de enlace adyacentes orientados de manera opuesta. Id.

Breve Descripción de la Invención

25 Aquí se describieron métodos de introducción de la

molécula de ácido nucleico en el genoma de un organismo huésped que exhibe una cantidad pequeña de recombinación homóloga, por ejemplo, una planta o especie de animal. En ejemplos particulares, se utilizaron "plataformas de aterrizaje
5 diseñadas" (ELPs), en donde las ELPs pueden comprender regiones de secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que carecen substancialmente de homología con el genoma del organismo huésped (por ejemplo, secuencias generadas de manera aleatoria) el flanqueo de los
10 sitios de enlace para los dominios de enlace de ADN (por ejemplo, proteínas del dedo de zinc (ZFPs), meganucleasas, o zippers de leucina). Los dominios de enlace del ADN que tienen como objetivo los sitios de enlace de los ELPs pueden incluir de manera natural dominios funcionales de disociación de ADN o
15 pueden ser parte de proteínas de fusión que comprenden además un dominio funcional, por ejemplo, un dominio de disociación de endonucleasa o medio dominio de disociación (por ejemplo, un ZFN, una recombinasa, una transposasa, o una endonucleasa de alojamiento, incluyendo endonucleasa de
20 alojamiento con un dominio de enlace de ADN modificado). Esta clase de enlace de ADN y proteínas de disociación será a las que nos referimos colectivamente en esta descripción como "endonucleasas de envío al objetivo." En ejemplos particulares, las secuencias de nucleótidos no aleatorizadas de fuentes
25 biológicas otras que los organismos huésped pueden ser usados

también, sin homología al genoma, es adecuado al organismo
enviado al objetivo. Por lo tanto, en algunos ejemplos, las
secuencias de nucleótidos pueden ser diseñadas para asegurar
que substancialmente no haya homología a las regiones de
5 cualquier genoma de planta formulada en una secuencia
objetivo.

En algunos ejemplos, los ELPs pueden proporcionar
regiones de homología y sitios de enlace para alta actividad
para el envío al objetivo de endonucleasas (por ejemplo, ZFNs)
10 para el envío al objetivo del gen dirigido por la homología. Por
consiguiente, los ELPs pueden reducir o eliminar la necesidad
de utilizar otras secuencias de nucleótidos, externas o internas,
en un inserto de ácido nucleico. Los ELPs pueden ser
diseñados para carecer de cualesquiera marcos de lectura
15 abierta espurios, y contener o carecer de sitios de enzimas de
restricción, según se prefiera, para la construcción de vectores
o el análisis de plantas transformadas con una molécula de
interés de ácido nucleico. En algunos ejemplos, los ELPs
pueden ser flanqueados por sitios de restricción no idénticos
20 los cuales generan extremos compatibles en la digestión de la
enzima de restricción, pero los sitios ligados al híbrido no se
pueden disociar por cualquiera de las enzimas de restricción.
En estos y otros ejemplos, esto permite la concatenación de los
ELPs dentro de adaptaciones más grandes, cada una con
25 regiones únicas de homología y sitios de enlace de

endonucleasa al objetivo (por ejemplo, sitios de enlace al ZFN).

En algunos ejemplos, los ELPs pueden ser incorporados de manera aleatoria en un genoma objetivo, o enviados al objetivo a sitios genómicos que han mostrado que acomodan
5 insertos transgénicos sin impacto dañino alguno, o con un impacto perjudicial aceptable para las plantas transgénicas resultantes. Las regiones de homología en el sitio del objetivo genómico pueden ser idénticas a las regiones de homología en la molécula de ácido nucleico donante al objetivo, facilitando de
10 este modo la recombinación dirigida a la homología después de la disociación de los hilos dobles enviando al objetivo las endonucleasas (por ejemplo, ZFNs).

Por consiguiente, los métodos de diseño y generación de ELPs se describen, así como los métodos de uso de los ELPs
15 para transformar una planta con una molécula de interés de ácido nucleico. También se describieron moléculas de ácido nucleico útiles en la presente invención, y plantas modificadas genéticamente producidas por métodos de acuerdo con la presente invención.

20 Las anteriores y otras características podrán ser apreciadas mejor a partir de la siguiente descripción detallada de varias modalidades, las cuales proceden con referencia a las figuras adjuntas.

Breve Descripción de las Figuras

25 La figura 1 incluye una ilustración de un vector

representativo que comprende un ELP, pDAB100610.

La figura 2 incluye una ilustración de un vector representativo que comprende un ELP, pDAB100611.

La figura 3 incluye una ilustración de un vector
5 representativo que comprende un ELP, pDAB100640.

La figura 4 incluye una ilustración de un vector representativo que comprende un ELP, pDAB100641.

La figura 5 incluye una ilustración de un vector representativo que comprende un fragmento donante para ser
10 integrado en un ELP, pDAB105955.

La figura 6 incluye una ilustración de un vector representativo que comprende un fragmento donante para ser integrado en un ELP, pDAB105956.

La figura 7 incluye una ilustración de un vector
15 representativo que comprende un fragmento donante para ser integrado en un ELP, pDAB105979.

La figura 8 incluye una ilustración de un vector representativo que comprende un fragmento donante para ser integrado en un ELP, pDAB105980.

20 La figura 9 es una representación esquemática de: a) el ELP 1 en maíz; b) construcción de donante para volver a enviar al objetivo el ELP1; c) el lugar del ELP1 que se volvió a enviar al objetivo.

La figura 10 incluye una ilustración de un vector
25 pDAB104132 representativo.

La figura 11 incluye una ilustración de un fragmento representativo de ADN de un Sitio de Clonación Múltiple el cual es flanqueado por medio del diseño del sitio de enlace del Dedo de Zinc y secuencias reguladoras.

5 La figura 12 incluye una ilustración de un vector pDAB104126 representativo.

La figura 13 incluye una ilustración de un vector pDAB104136 representativo.

10 La figura 14 incluye una ilustración de un vector pDAB104138 representativo.

La figura 15 incluye una ilustración de un vector pDAB104140 representativo.

La figura 16 incluye una ilustración de un vector pDAB104142 representativo.

15 La figura 17 incluye una ilustración de un vector pDAB104133 representativo.

La figura 18 incluye una ilustración de un vector pDAB104134 representativo.

20 La figura 19 incluye una ilustración de un vector pDAB104135 representativo.

La figura 20 incluye una ilustración de un vector pDAB104137 representativo.

La figura 21 incluye una ilustración de un vector pDAB104139 representativo.

25 La figura 22 incluye una ilustración de un vector

pDAB104141 representativo.

La figura 23 incluye una ilustración de un vector pDAB104143 representativo.

Descripción Detallada de la Invención

5 I. Revisión general de varias modalidades

En algunas modalidades, se proporcionan métodos para introducir moléculas de ácido nucleico que comprenden "plataformas de aterrizaje diseñadas" (ELPs) en un organismo huésped, de modo que la integración de las moléculas
10 adicionales de ácido nucleico de interés en el organismo huésped es facilitada. En las modalidades, las ELPs pueden comprender regiones de la secuencia de ácido nucleico que no son homólogas a las secuencias naturales del organismo huésped (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico generadas
15 de una manera esencialmente aleatoria, las cuales pueden entonces ser seleccionadas para la inserción basada en ciertos criterios deseables como aquí se describen), flanqueando los sitios de reconocimiento de endonucleasa de envío al objetivo (por ejemplo, los sitios de reconocimiento ZFN). Los sitios para
20 la integración de las ELPs pueden ser aleatorios, pueden ser determinados mediante la identificación, por ejemplo, un gen estructural dentro de un genoma huésped que tiene un nivel de expresión deseado para una molécula de ácido nucleico de interés para ser introducida en el sitio de la ELP, o puede ser
25 determinada mediante la identificación de las ubicaciones

dentro del genoma huésped que no imparten una penalidad metabólica, funcional, agronómica (si es una planta) o de otra índole al organismo huésped transformado cuando la ELP es introducida en el sitio. Las ELPs pueden ser introducidas en
5 tándem dentro del genoma, de modo que, por ejemplo, las ELPs están presentes como concatemos en un organismo producido de acuerdo con métodos de la presente invención.

En algunas modalidades, la integración de la molécula de ácido nucleico de interés es realizada en un sitio ELP. En
10 algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico de interés para ser introducida en un sitio ELP está asociada con una o más endonucleasas de envío al objetivo, proporcionadas como polipéptidos o expresadas del ARN o ADN introducido. Además, la molécula de ácido nucleico introducida puede incluir una ELP
15 diferente de la que ya se incorporó en el genoma huésped. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que una secuencia de ácido nucleico introducida dentro de un genoma huésped en un sitio en donde una secuencia de ácido nucleico natural es expresada en un organismo de tipo natural se esperará que sea
20 expresada de una manera similar que la secuencia de ácido nucleico natural. Por ejemplo, si la secuencia de ácido nucleico natural es expresada en el organismo de tipo natural bajo el control de los elementos regulatorios (por ejemplo, de modo que, la secuencia de ácido nucleico es expresada de una
25 manera específica del tejido o específica del desarrollo), la

secuencia de ácido nucleico introducida se esperará que pase por un control regulatorio igual o similar. Por lo tanto, las ELPs pueden facilitar la expresión temporal deseada y/o la expresión espacial de una molécula de ácido nucleico de interés

5 introducida en el sitio ELP.

II. Abreviaturas

ELISA ensayo inmunoabsorbente enlazado a la enzima
ELP plataforma de aterrizaje diseñada
ZFN nucleasa de dedo de zinc

III. Términos

Expresión del gen: El proceso por medio del cual la información codificada de una unidad de transcripción de ácido nucleico (incluyendo, por ejemplo, el ADN genómico) es convertido en una parte operacional, no operacional, o

15 estructural de una célula, que con frecuencia incluye la síntesis de una proteína. La expresión del gen puede ser influenciada por señales externas; por ejemplo, la exposición de una célula, tejido, u organismo a un agente que aumenta o disminuye la expresión del gen. La expresión de un gen también puede ser

20 regulada en cualquier otra parte de la trayectoria del ADN al ARN a la proteína. La regulación de la expresión del gen ocurre, por ejemplo, a través de los controles que actúan en la transcripción, traducción, transporte del ARN y procesamiento, la degradación de moléculas intermedias tales como el mRNA, o

25 a través de la activación, desactivación, compartimentalización,

o degradación de moléculas de proteína específicas después que se han hecho, o mediante combinaciones de las mismas. La expresión del gen puede ser medida en el nivel de ARN o el nivel de la proteína por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, los ensayos de Northern blot, RT-PCR, Western blot, de actividad de la proteína *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*.

Hibridación: Los oligonucleótidos y sus análogos hibridan por medio del enlace de hidrógeno, el cual incluye enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre las bases complementarias. Generalmente, las moléculas de ácido nucleico consisten de bases nitrogenosas que son ya sea pirimidinas (citosina (C), uracilo (U), y timina (T)) o purinas (adenina (A) y guanina (G)). Estas bases nitrogenosas forman los enlaces de hidrógeno entre una pirimidina y una purina, y el enlace de la pirimidina a la purina nos referimos como un "apareamiento de base". Más específicamente, A será hidrógeno enlazado a T o U, y G se enlazará a C. El término "complementario" se refiere al apareamiento base que ocurre entre dos diferentes secuencias de ácido nucleico o dos regiones diferentes de la misma secuencia de ácido nucleico.

"Específicamente hibridable" y "específicamente complementario" son términos que indican un grado suficiente de complementariedad de modo que ocurre el enlace específico y estable entre el oligonucleótido y el objetivo de ADN o ARN.

El oligonucleótido no necesita ser 100% complementario a su secuencia objetivo para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando el enlace del oligonucleótido a la molécula de ADN o ARN objetivo interfiere con la función normal del ADN o ARN objetivo, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar el enlace no específico del oligonucleótido a una secuencia que no es objetivo bajo condiciones en donde se desea el enlace específico, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos o sistemas *in vivo*. A dicho enlace es al que nos referimos como una hibridación específica.

Las condiciones de hibridación resultantes en grados particulares de severidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación seleccionado y la composición y longitud de las secuencias de ácido nucleico que se están hibridando. Generalmente, la temperatura de hibridación y la resistencia iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^{2+}) del regulador de hibridación contribuirá a la severidad de hibridación, aunque las veces del lavado también influye en la severidad. Los cálculos con respecto a las condiciones de hibridación requeridas para lograr los grados particulares de severidad los explicaron Sambrook y asociados. (ed.), en el libro "Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio" (Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 2ª edición, volumen 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring

Harbor, Nueva York, 1989, capítulos 9 y 11.

Para propósitos de la presente descripción, las "condiciones severas" comprenden condiciones bajo las cuales ocurrirá la hibridación si existe menos del 25% de mal acoplamiento entre la molécula de hibridación y la secuencia objetivo. Las "condiciones severas" pueden ser definidas además en niveles particulares de severidad. Por lo tanto, como se utilizaron aquí, las condiciones de "severidad moderada" son aquellas bajo las cuales las moléculas con más del 25% de mal acoplamiento no hibridarán; las condiciones de "severidad media" son aquellas bajo las cuales las moléculas con más del 15% de mal acoplamiento no hibridarán, y las condiciones de "alta severidad" son aquellas bajo las cuales la secuencia con no más del 10% de mal acoplamiento no hibridarán. Las condiciones de "muy alta severidad" son aquellas bajo las cuales las secuencias con más del 6% de mal acoplamiento no hibridarán.

En modalidades particulares, las condiciones severas pueden incluir la hibridación en una temperatura de 65°C, seguida por lavados consecutivos a una temperatura de 65°C con SSC 0.1x /SDS al 0.1% durante 40 minutos.

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína) ha sido separado substancialmente, producido separado de, o purificado lejos de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el cual el componente

ocurre de manera natural, es decir, otro ADN o ARN del cromosoma o extracromosoma, y proteínas. Las moléculas de ácido nucleico y las proteínas que han sido “aisladas” incluyen moléculas de ácido nucleico y proteínas purificadas por métodos de purificación estándar. El término también comprende ácidos nucleicos y proteínas preparados por medio de la expresión recombinante en una célula huésped, así como moléculas de ácido nucleico sintetizadas químicamente, proteínas, y péptidos.

10 Molécula de ácido nucleico: Una forma polimérica de nucleótidos, los cuales pueden incluir tanto los hilos de ARN, cADN, ADN genómico, y formas sintéticas sentido y antisentido y polímeros mezclados de los anteriores. El nucleótido se refiere a un ribonucleótido, un desoxinucleótido, o una forma
15 modificada de cualquier tipo de nucleótido. Una “molécula de ácido nucleico” como se usa en la presente descripción es sinónimo de “ácido nucleico” y “polinucleótido”. El término incluye formas de ADN de hilo doble o sencillo. Una molécula de ácido nucleico puede incluir cualquiera o ambos nucleótidos
20 que ocurren de manera natural y modificados enlazados juntos por enlaces de nucleótidos que ocurren de manera natural y/o ocurren de manera no natural.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser modificadas químicamente o bioquímicamente, o pueden contener bases de
25 nucleótidos derivadas o no naturales, como se podrá apreciar

fácilmente por los expertos en la técnica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, etiquetas, metilación, y sustitución de uno o más de los nucleótidos que ocurren de manera natural con un análogo. Otras modificaciones incluyen modificaciones internucleótidos tales como enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), porciones pendientes (por ejemplo, péptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), queladores, alquiladores, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.). Los términos "molécula de ácido nucleico" también incluyen cualquier conformación topológica, incluyendo conformaciones de un solo hilo, de doble hilo, duplexadas, triplexadas, en forma de horquilla, circulares, o cerradas por candado parcialmente.

Enlazado de manera operable: Una primera secuencia de ácido nucleico es enlazada de manera operable con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se encuentra en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor es enlazado de manera operable con una secuencia de codificación cuando el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia de codificación. Cuando es producido de manera recombinante, las secuencias de ácido nucleico enlazadas de manera operable generalmente

son contiguas y, en donde es necesario para unir dos regiones de codificación de proteína en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los elementos no necesitan ser contiguos para ser enlazados de manera operable.

5 Promotor: Una región de ADN que generalmente está localizada arriba (hacia la región 5' de un gen) que es necesaria para la transcripción. Los promotores permiten la activación o represión correcta del gen el cual controlan. Un promotor contiene secuencias específicas que son reconocidas
10 por los factores de transcripción. Estos factores enlazan a las secuencias promotoras de ADN y dan como resultado el reclutamiento de polimerasa de ARN, la enzima que sintetiza el ARN de la región de codificación del gen. En algunas modalidades, se utilizaron promotores específicos del tejido. Un
15 promotor específico del tejido es una secuencia de ADN que dirige un nivel más alto de transcripción de un gen asociado en el tejido para el cual el promotor es específico en relación con otros tejidos del organismo. Los ejemplos de los promotores específicos del tejido incluyen promotores específicos de
20 *tapetum*, promotores específicos del antero; promotores específicos de polen (ver, por ejemplo, la Patente Norteamericana No. 7,141,424, y la Publicación Internacional PCT documento No. WO 99/042587); promotores específicos del óvulo; (ver, por ejemplo, la Solicitud de Patente Norteamericana
25 No. 2001/047525 A1); promotores específicos de la fruta (ver,

por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 4,943,674, y 5,753,475); y promotores específicos de la semilla (ver, por ejemplo, las Patentes Norteamericanas Nos. 5,420,034, y 5,608,152). En algunas modalidades, también se utilizaron
5 promotores específicos de la etapa, por ejemplo, un promotor activo en una etapa tardía en el desarrollo.

Transformado: Un virus o vector "transforma" o "transduce" una célula cuando transfiere las moléculas de ácido nucleico dentro de la célula. Una célula es "transformada" por una
10 molécula de ácido nucleico transducida en la célula cuando la molécula de ácido nucleico llega a quedar duplicada de manera estable por la célula, ya sea mediante la incorporación de la molécula de ácido nucleico dentro del genoma celular, o por duplicación del episoma. Como se usa en la presente
15 descripción, el término "transformación" comprende todas las técnicas por medio de las cuales la molécula de ácido nucleico puede ser introducida dentro de dicha célula. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, transfección con vectores virales, transformación con vectores plásmidos, electroporación
20 (Fromm y asociados (1986) Nature 319: páginas 791 a 793), lipofección (Felgner y asociados (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84: páginas 7413 a 7417), microinyección (Mueller y asociados (1978) Cell 15: páginas 579 a 585), transferencia portada por *Agrobacterium* (Fraley y asociados (1983) Proc.
25 Natl. Acad. Sci. EUA 80: páginas 4803 a 4807), asimilación

directa de ADN, y bombardeo de microproyectiles (Klein y asociados (1987) Nature 327: página 70).

Transgén: Una secuencia exógena de ácido nucleico. En un ejemplo, un transgén es una secuencia de genes (por ejemplo, un gen de resistencia al herbicida), un gen que codifica un compuesto útil industrialmente o farmacéuticamente, o un gen que codifica una característica agrícola deseable. Todavía en otro ejemplo, el transgén es una secuencia de ácido nucleico antisentido, en donde la expresión de la secuencia de ácido nucleico antisentido inhibe la expresión de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Un transgén puede contener secuencias regulatorias enlazadas de manera operable al transgén (por ejemplo, un promotor). En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico de interés puede ser introducida por la recombinación enviada al objetivo de la ELP que es un transgén. Sin embargo, en otras modalidades, la molécula de ácido nucleico de interés es una secuencia de ácido nucleico endógena, en donde son deseadas las copias genómicas adicionales de la secuencia de ácido nucleico endógeno, o una molécula de ácido nucleico que se encuentra en la orientación antisentido con respecto a la molécula de ácido nucleico objetivo en el organismo huésped.

Vector: Una molécula de ácido nucleico como fue introducida dentro de una célula, por lo tanto, que produce una célula transformada. Un vector puede incluir secuencias de

ácido nucleico que permiten que se dupliquen en la célula huésped, tal como un origen de la duplicación. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, un plásmido, cósmido, bacteriófago, o virus que es portador del ADN exógeno dentro de la célula. Un vector puede también incluir uno o más genes, moléculas antisentido, y/o genes marcadores que se pueden seleccionar y otros elementos genéticos conocidos en la técnica. Un vector puede transducir, transformar, o infectar una célula, ocasionando de este modo que la célula exprese las moléculas de ácido nucleico y/o proteínas codificadas por el vector. Un vector puede incluir opcionalmente materiales para ayudar a lograr la entrada de la molécula de ácido nucleico dentro de la célula (por ejemplo, un liposoma, codificación de proteína, etc.).

15 ***IV. Plataformas de aterrizaje diseñadas para el envío al objetivo del gen en las plantas***

A. Revisión General

 En algunas modalidades, las ELPs son introducidas en las plantas, por ejemplo, para facilitar la introducción a una o más moléculas de interés de ácido nucleico adicionales. Las moléculas de interés de ácido nucleico adicionales pueden comprender, por ejemplo, cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína para ser expresada en el organismo huésped. En modalidades adicionales, las ELPs son utilizadas para facilitar la introducción de las moléculas de ácido nucleico

de función desconocida para discernir su función basada en la expresión ectópica del gen. Las regiones de flaqueo de las ELP(s) pueden ser homólogas a la secuencia de ácido nucleico genómica de la planta huésped, de modo que las ELP(s) son
5 integradas en el genoma de la planta huésped de una manera específica del sitio. Las ELPs pueden ser utilizadas para incorporar moléculas de ácido nucleico de diferentes longitudes.

En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico enviada al objetivo a un objetivo ELP transgénico y puede
10 contener una segunda ELP para permitir la adición continua del gen en el sitio objetivo. Una o más endonucleasas de envío al objetivo (por ejemplo, ZFNs) pueden ser utilizadas consecutivamente o simultáneamente en este proceso. Si se desea, más de un sitio de enlace de la endonucleasa de envío
15 al objetivo (por ejemplo, sitio de enlace ZFN) puede ser incorporada adicionalmente interna a las regiones de las ELP(s) que son homólogas a la secuencia de ácido nucleico genómica de la planta huésped. En algunas modalidades, los sitios de enlace de endonucleasa de envío al objetivo pueden ser
20 agregados de modo que flanquean las ELPs. En esta última y las modalidades adicionales, la expresión de la endonucleasa de envío al objetivo (por ejemplo, ZFN) que se disocia en los sitios de enlace agregados en la planta conducen a la remoción de las ELPs.

25 En algunas modalidades, las regiones homólogas a la

secuencia de ácido nucleico genómica de la planta huésped también pueden ser utilizadas en combinación con otros ADN de flaqueo para permitir la inserción de las moléculas de ácido nucleico adyacentes a una molécula de ácido nucleico de interés introducida en un objetivo ELP, tal como, por ejemplo, un elemento de expresión del gen o gen de interés. La disociación del ADN puede ser utilizada para mejorar la recombinación homóloga en este sitio. En algunas modalidades, las regiones de homología en las ELPs que son homólogas a la secuencia de ácido nucleico genómica también pueden ser utilizadas para la inserción enviada al objetivo de las moléculas de ácido nucleico que son facilitadas por las enzimas que disocian el ADN, tales como las ZFNs, meganucleasas u otras endonucleasas de envío al objetivo.

En algunas modalidades, las ELPs pueden ser incorporadas en regiones modificadas del cromosoma, de modo que pueden ser generadas por los procesos de amplificación del ADN o en minicromosomas. En algunas modalidades, las regiones de homología y las endonucleasas de envío al objetivo colocadas de manera apropiada (por ejemplo, ZFNs) son utilizadas para facilitar la modificación de las secuencias internas a las regiones de flaqueo homólogas a la secuencia de ácido nucleico genómica de la planta huésped.

B. Diseño de las ELPs

En algunas modalidades, las ELPs pueden ser diseñadas

para facilitar la recombinación homóloga en las ubicaciones del cromosoma de la planta. Las ELPs pueden tener un impacto neutral en los genes que las rodean o las secuencias del ADN. Las ELPs pueden representar secuencias de envío al objetivo
5 únicas dentro del genoma de la planta. En ciertas modalidades, el tamaño (por ejemplo, 1 kb) para la región del extremo 5' y el extremo 3' de homología a una ubicación del cromosoma deseada es seleccionada para cumplir con el tamaño mínimo que se puede considerar como deseable para facilitar la
10 recombinación dirigida a la homología. En modalidades específicas, el tamaño de cada región del extremo 5' y 3' de la homología es de aproximadamente 50 bp; 100 bp; 200 bp; 400 bp; 600 bp; 700 bp; 750 bp; 800 bp; 1 kb; 1.2 kb; 1.4 kb; 1.6 kb; 1.8 kb; 2 kb; o 3 kb. Las regiones del extremo 5' y 3' de
15 homología no son requeridas que sean del mismo tamaño en modalidades particulares. Las secuencias de ELP pueden ser producidas, por ejemplo, utilizando un programa de cómputo para la generación de un número aleatorio. Las secuencias de ELP producidas, por ejemplo, por la generación aleatoria de la
20 secuencia pueden ser entonces seleccionadas para utilizarse en las ELPs basadas en las características deseables, incluyendo pero sin limitarse a, secuencias substancial o completamente carentes de homología con las secuencias genómicas naturales del organismo objetivo. Las ELPs seleccionadas también
25 pueden ser modificadas como se detallan adicionalmente más

adelante.

En algunas modalidades, los criterios para el diseño de las ELPs y/o la modificación de las ELPs seleccionadas pueden incluir uno o más de los siguientes: remoción de los sitios de restricción utilizados rutinariamente para la clonación; reducción en el número de sitios de metilación potencial (por ejemplo, CG y CNG); y la ausencia de cualquier marco de lectura abierta mayor de 300 bp. Adicionalmente, durante el diseño de las ELPs, se pueden remover otros sitios en las secuencias de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo: uniones de exón:intrón (5' o 3'); señales de adición poli A; señales de terminación de polimerasa de ARN; y estructuras secundarias intrahilo altamente estables. Las secuencias también pueden ser analizadas y modificadas para reducir la frecuencia de los dobletes TA o CG. Los bloques de secuencia que tienen más de aproximadamente seis residuos consecutivos de [G+C] o [A+T] pueden también ser removidas de la secuencia durante el diseño de la ELP.

En las modalidades, las ELPs pueden incluir, por ejemplo, secuencias de nucleótidos de la fórmula X_1 -Y- X_2 , en donde Y es por lo menos un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo (por ejemplo, un sitio de enlace ZFN), en donde X_1 es una secuencia de nucleótidos seleccionada que carece de homología con el genoma del organismo huésped y colocado en la terminal 5' de Y, y en donde X_2 es una secuencia de

nucleótidos seleccionada que carece de homología con el genoma del organismo huésped que es diferente de X_1 .

Las secuencias de nucleótidos X_1 y X_2 de ejemplo pueden ser seleccionadas independientemente de las siguientes
5 secuencias: SEQ ID No: 1; SEQ ID No: 2; SEQ ID No: 3; SEQ ID No: 4; SEQ ID No: 5; SEQ ID No: 6; SEQ ID No: 7; SEQ ID No: 8; SEQ ID No: 9; y SEQ ID No: 10. Las modificaciones, eliminaciones, o adicionales a estas secuencias (por ejemplo, la remoción o adición de sitios de restricción) se pueden hacer en
10 algunas modalidades para proporcionar las funcionalidades agregadas o diferentes. Por ejemplo, en ciertas modalidades: la SEQ ID No: 1 puede ser modificada para generar la SEQ ID No: 11; la SEQ ID No: 3 puede ser modificada para generar la SEQ ID No: 12; la SEQ ID No: 2 puede ser modificada para generar
15 la SEQ ID No: 13; la SEQ ID No: 4 puede ser modificada para generar la SEQ ID No: 14; la SEQ ID No: 5 puede ser modificada para generar la SEQ ID No: 17; y la SEQ ID No: 6 puede ser modificada para generar la SEQ ID No: 18.

En modalidades particulares, las ELPs de ejemplo
20 incluyen, pero no están limitadas a las siguientes secuencias: SEQ ID No: 15; SEQ ID No: 16; y SEQ ID No: 19.

Los sitios de enzima de restricción (por ejemplo, sitios de enzima de restricción *FseI*) pueden ser introducidos
flanqueando una ELP para hacer posible la clonación de la ELP
25 en el vector apropiado. Los sitios de enzima de restricción

también pueden ser introducidos flanqueando una ELP que produce extremos compatibles al momento de la digestión de la enzima de restricción (por ejemplo, los sitios *Bgl*II y *Bam*HI), para permitir el encadenado de las ELPs juntas, por ejemplo, como un concatémero, en el genoma de la planta huésped. Los sitios de enzima de restricción también pueden ser introducidos para permitir el análisis en la planta huésped de las secuencias de ácido nucleico de interés enviadas al objetivo posteriormente a las ELPs por medio de la recombinación. Dos o más sitios de enzimas de restricción pueden ser introducidos flanqueando una sola ELP. Por ejemplo, los sitios *Bgl*II y *Bam*HI pueden ser incluidos internos a los sitios *Fse*I. Los sitios de enzimas de restricción también pueden ser introducidos para permitir el análisis en la planta huésped de las secuencias de ácido nucleico de interés enviadas al objetivo a la ELP para la inserción por medio de la recombinación. Por ejemplo, los sitios *Pme*I pueden ser introducidos para flanquear el sitio de inserción.

C. Administración de moléculas de ácido nucleico a las células de las plantas que contienen una ELP

Con el objeto de hacer posible la integración portada por la endonucleasa de envío al objetivo de una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, ELP(s) y/o moléculas exógenas de ácido nucleico enviadas al objetivo a una ELP integrada anteriormente) dentro de un genoma de la planta por

medio de la integración enviada al objetivo, el envío de las endonucleasas al objetivo o las moléculas de ácido nucleico que codifican la endonucleasa de envío al objetivo seguidas por la expresión de una proteína de endonucleasa funcional de envío al objetivo en la célula de la planta que se requiere. Una molécula de ácido nucleico de interés debe estar presente en la célula de la planta al mismo tiempo que la endonucleasa de envío al objetivo que es entregada o expresada ahí, de modo que la proteína de la endonucleasa funcional de envío al objetivo puede inducir las roturas de hilos dobles en el sitio del objetivo las cuales son entonces reparadas por medio de la integración conducida por homología de la molécula de ácido nucleico de interés dentro del lugar del objetivo. Un experto en la técnica puede prever que la expresión de la proteína de endonucleasa de envío al objetivo funcional puede ser lograda por varios métodos, incluyendo, pero sin limitarse a, la transgénesis de una construcción que codifica la endonucleasa de envío al objetivo, o la expresión transitoria de una construcción que codifica la endonucleasa de envío al objetivo. En ambos de estos casos, la expresión de la proteína de endonucleasa de envío al objetivo funcional y la administración del ADN donante en la célula de la planta pueden ser logradas simultáneamente con el objeto de conducir la integración enviada al objetivo.

Por lo tanto, en modalidades particulares, las

endonucleasas de envío al objetivo (por ejemplo, las ZFNs) son expresadas de las moléculas de ácido nucleico en plantas transformadas para introducir roturas de hilos dobles en el genoma de las plantas transformadas, por ejemplo, en una o
5 más ELPs introducidas anteriormente a la planta. Las endonucleasas de envío al objetivo pueden ser utilizadas de modo que tienen por objetivo una o más secuencias de reconocimiento diseñadas para estar presentes en las ELPs. Los métodos de diseño y selección para construir una ELP de la
10 presente invención, por lo tanto, comienza determinando una o más secuencias específicas de ácido nucleico que son reconocidas por las endonucleasas de envío al objetivo para ser utilizadas posteriormente para introducir una molécula de ácido nucleico de interés en la ELP. La flexibilidad y especificidad del
15 sistema ZFN proporciona un nivel de control que anteriormente no se podía lograr por medio de las estrategias de remoción del gen portadas por la recombinasa conocidas.

Como un ejemplo, las ZFNs pueden ser diseñadas fácilmente, por ejemplo, para reconocer secuencias específicas
20 de ácido nucleico (por ejemplo, ELPs). Wu y asociados (2007) Cell. Mol. Life Sci. 64: páginas 2933 a 2944. La aleatorización de los codones para los residuos de reconocimiento del dedo de zinc permiten la selección de nuevos dedos que tienen una alta afinidad para las secuencias de ADN seleccionadas de manera
25 arbitraria. Además, los dedos de zinc son moléculas de enlace

de ADN naturales, y los dedos de zinc diseñados han mostrado actuar en sus objetivos designados en las células vivientes. Por lo tanto, las nucleasas basadas en los dedos de zinc se pueden enviar al objetivo a sitios de reconocimiento específicos pero
5 arbitrarios.

El requerimiento de dimerización de los dominios disociados de las nucleasas quiméricas de dedos de zinc, imparten un alto nivel de especificidad de la secuencia. Debido a que cada conjunto de tres dedos se enlaza en nueve pares
10 básicos consecutivos, dos nucleasas quiméricas demandan efectivamente un objetivo de 18 bp si cada dominio del dedo de zinc tiene la especificidad perfecta. Cualquier secuencia determinada de esta longitud se pronostica que sea única dentro de un solo genoma (suponiendo de aproximadamente
15 10^9 bp). Bibikova y asociados (2001) Mol. Cell. Biol. 21(1): páginas 289 a 297; Wu y asociados (2007), mencionada anteriormente. Además, los dedos adicionales proporcionan una especificidad aumentada. Beerli y asociados (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95: páginas 14628 a 14633; Kim y Pabo (1998)
20 Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 95: páginas 2812 a 2817; Liu y asociados (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 94: páginas 5525 a 5530, de modo que el número de dedos de zinc en cada dominio de enlace de ADN puede ser aumentado para proporcionar todavía una especificidad adicional. Por ejemplo, la
25 especificidad puede ser aumentada además usando un par de

ZFNs de cuatro dedos que reconocen una secuencia de 24 bp. Urnov y asociados (2005) Nature 435: páginas 646 a 651. De este modo, las ZFNs pueden ser utilizadas de modo que una secuencia de reconocimiento en una ELP introducida en el
5 genoma de la planta huésped es única dentro del genoma.

Una molécula de ácido nucleico de interés que es introducida por la recombinación enviada al objetivo en una ELP puede ser enlazada de manera operable a uno o más promotores de la planta que conducen la expresión del gen en
10 una cantidad suficiente para conferir una característica o fenotipo deseado. Los promotores adecuados para éste y otros usos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitativos que describen dichos promotores incluyen las Patentes Norteamericanas Nos. 6,437,217 (promotor RS81 de
15 maíz); 5,641,876 (promotor de actina de arroz); 6,426,446 (promotor RS324 de maíz); 6,429,362 (promotor PR-1 de maíz); 6,232,526 (promotor A3 de maíz); 6,177,611 (promotores constitutivos de maíz); 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196 (promotor 35S); 6,433,252 (promotor de oleosina L3
20 de maíz); 6,429,357 (promotor de actina 2 de arroz, e intrón de actina 2 de arroz); 5,837,848 (promotor específico de la raíz); 6,294,714 (promotores inducibles de luz); 6,140,078 (promotores inducibles de sal); 6,252,138 (promotores inducibles de patógenos); 6,175,060 (promotores inducibles de
25 deficiencia de fósforo); 6,388,170 (promotores bidireccionales);

6,635,806 (promotor de gamma-coixina); y la Solicitud de Patente Norteamericana Serie No. 09/757,089 (promotor de aldolasa de cloroplasto de maíz). Los promotores adicionales incluyen el promotor de sintasa de nopalina (NOS) (Ebert y asociados (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84(16): páginas 5745 a 5749); el promotor de sintasa de octopina (OCS) (el cual es portado en los plásmidos que inducen un tumor de *Agrobacterium tumefaciens*); los promotores de *caulimovirus* tales como el promotor 19S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Lawton y asociados (1987) Plant Mol. Biol. 9: páginas 315 a 324); el promotor CaMV 35S (Odell y asociados (1985) Nature 313: páginas 810 a 812; el promotor 35S del virus del mosaico de infusión de higo (Walker y asociados (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 84(19): páginas 6624 a 6628); el promotor de sintasa de sacarosa (Yang y Russell (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 87: páginas 4144 a 4148); el promotor de complejo del gen R (Chandler y asociados (1989) Plant Cell 1: páginas 1175 a 1183); el promotor del gen de proteína de enlace a/b de clorofila; el promotor CaMV35S (Patentes Norteamericanas Nos. 5,322,938, 5,352,605, 5,359,142, y 5,530,196); el promotor FMV35S (Patentes Norteamericanas Nos. 6,051,753, y 5,378,619); el promotor PC1SV (Patente Norteamericana No. 5,850,019); el promotor SCP1 (Patente Norteamericana No. 6,677,503); y los promotores AGRtu.nos (No. de Acceso al GenBank V00087; Depicker y asociados (1982) J. Mol. Appl.

Genet. 1: páginas 561 a 573; Bevan y asociados (1983) Nature 304: páginas 184 a 187), y similares.

Los elementos genéticos adicionales que pueden ser enlazados de manera operable opcionalmente a la molécula de
5 ácido nucleico de interés incluyen secuencias que codifican los péptidos de tránsito. Por ejemplo, la incorporación de un péptido de tránsito de cloroplasto adecuado, tal como la EPSPS CTP de *A. thaliana* (Klee y asociados (1987) Mol. Gen. Genet. 210: páginas 437 a 442), y la EPSPS CTP de *Petunia hybrida*
10 (della-Cioppa y asociados (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 83: páginas 6873 a 6877) han mostrado el envío al objetivo de las secuencias de proteína EPSPS heterólogas a los cloroplastos en las plantas transgénicas. La mono-oxigenasa dicamba (DMO) también puede ser enviada al objetivo a los cloroplastos, como
15 se describió en la Publicación Internacional PCT documento No. WO 2008/105890.

Los elementos genéticos adicionales que pueden estar enlazados de manera operable opcionalmente a la molécula de interés de ácido nucleico también incluyen los UTRs de la
20 terminal 5' localizados entre una secuencia promotora y una secuencia de codificación que funcionan como una secuencia líder de traducción. La secuencia líder de traducción está presente en el mRNA completamente procesado arriba de la secuencia del inicio de traducción. La secuencia líder de
25 traducción puede afectar el procesamiento del transcrito

primario al mRNA, la estabilidad del mRNA, y/o la eficiencia de traducción. Los ejemplos de las secuencias líder de traducción incluyen líderes de proteína de choque de calor de maíz y petunia (Patente Norteamericana No. 5,362,865), líderes de
5 proteína de recubrimiento del virus de la planta, líderes de la planta de rubisco, y otros. Ver, por ejemplo, la publicación de Turner y Foster (1995) en Molecular Biotech. 3(3): páginas 225 a 236. Los ejemplos no limitativos de los UTRs de la terminal 5' incluyen GmHsp (Patente Norteamericana No. 5,659,122);
10 PhDnaK (Patente Norteamericana No. 5,362,865); AtAntl; TEV (Carrington y Freed (1990) J. Virol. 64: páginas 1590 a 1597); y AGRtu.nos (No. de Acceso al GenBank V00087; y Bevan y asociados (1983) Nature 304: páginas 184 a 187).

Los elementos genéticos adicionales que pueden ser
15 enlazados de manera operable opcionalmente a la molécula de ácido nucleico de interés también incluyen secuencias de la terminal 3' no traducidas, regiones de terminación de transcripción de la terminal 3', o regiones de poliadenilación. Estos son elementos genéticos localizados debajo de la
20 molécula del polinucleótido, e incluyen polinucleótidos que proporcionan una señal de poliadenilación, y/u otras señales regulatorias que tienen la capacidad de afectar la transcripción, el procesamiento del mRNA, o la expresión del gen. La señal de poliadenilación funciona en plantas para ocasionar la adición de
25 nucleótidos de poliadenilato a la terminal 3' del precursor de

mARN. La secuencia de poliadenilación puede ser derivada del gen natural, de una variedad de genes de plantas, o de genes de T-ADN. Un ejemplo no limitativo de una región de terminación de transcripción de la terminal 3' es la región del extremo 3' de sintasa de nopalina (Nos. 3'; Fraley y asociados (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 80: páginas 4803 a 4807). Un ejemplo del uso de las diferentes regiones del extremo 3' sin traducir se proporciona en la publicación de Ingelbrecht y asociados (1989) en Plant Cell 1: páginas 671 a 680. Los ejemplos no limitativos de las señales de poliadenilación incluyen una proveniente del gen *Pisum sativum* RbcS2 (Ps.RbcS2-E9; Coruzzi y asociados (1984) EMBO J. 3: páginas 1671 a 1679) y AGRtu.nos (No. de Acceso al GenBank E01312).

D. Transformación de las células huésped con moléculas de ácido nucleico

Cualquiera de las técnicas conocidas en el arte para la introducción de moléculas de ácido nucleico en las plantas pueden ser utilizadas para producir una planta transformada de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, para introducir una o más ELPs dentro del genoma de la planta huésped, y/o para introducir además una molécula de interés de ácido nucleico. Los métodos adecuados para la transformación de plantas incluyen cualquier método por medio del cual el ADN pueda ser introducido dentro de una célula, tal como: por electroporación, como se ilustra en la Patente Norteamericana

No. 5,384,253; por bombardeo de microproyectiles, como se ilustra en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,015,580, 5,550,318, 5,538,880, 6,160,208, 6,399,861, y 6,403,865; por medio de la transformación portada por el *Agrobacterium* como
5 se ilustra en las Patentes Norteamericanas Nos. 5,635,055, 5,824,877, 5,591,616; 5,981,840, y 6,384,301; y por la transformación del protoplasto, como se establece en la Patente Norteamericana No. 5,508,184. A través de la aplicación de técnicas tales como éstas, las células de virtualmente cualquier
10 especie de planta puede ser transformada de manera estable, y esas células pueden ser desarrolladas en plantas transgénicas por técnicas conocidas para los expertos en el arte. Por ejemplo, las técnicas que pueden ser particularmente útiles en el contexto de la transformación del algodón se describen en
15 las Patentes Norteamericanas Nos. 5,846,797, 5,159,135, 5,004,863, y 6,624,344; las técnicas para transformar las plantas de *Brassica* en particular se describen, por ejemplo, en la Patente Norteamericana No. 5,750,871; las técnicas para transformar el frijol soya se describen, por ejemplo, en la
20 Patente Norteamericana No. 6,384,301; y las técnicas para transformar el maíz se describen, en la Patente Norteamericana No. 7,060,876, la Patente Norteamericana No. 5,591,616, y la Publicación Internacional PCT documento No. WO 95/06722.

Después de efectuar la entrega del ADN exógeno a las
25 células receptoras, las células transformadas generalmente son

identificadas para el cultivo adicional y la regeneración de la planta. Con el objeto de mejorar la capacidad para identificar los transformantes, se puede desear emplear un gen marcador que se pueda seleccionar con el vector de transformación usado
5 para generar el transformante. En este caso, la población de células potencialmente transformadas puede ser ensayada exponiendo las células a un agente o agentes selectivos, o las células pueden ser seleccionadas para la característica del gen marcador deseado.

10 Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo, o las células que han sido calificadas positivas en un ensayo de selección, pueden ser cultivadas en los medios que soportan la regeneración de las plantas. En algunas modalidades, cualquier medio de cultivo de tejido de planta
15 adecuado (por ejemplo, los medios MS y N6) pueden ser modificados incluyendo sustancias adicionales, tales como reguladores de crecimiento. El tejido puede ser mantenido en medios básicos con reguladores de crecimiento hasta que está disponible tejido suficiente para comenzar los esfuerzos de
20 regeneración de la planta, o después de rondas repetidas de selección manual, hasta que la morfología del tejido es adecuada para la regeneración (por ejemplo, por lo menos dos semanas), y luego transferidos a medios que conducen a la formación de brotes. Los cultivos son transferidos
25 periódicamente hasta que ha ocurrido una formación suficiente

de brotes. Una vez que son formados los brotes, son transferidos a los medios conductivos para la formación de la raíz. Una vez que son formadas raíces suficientes, las plantas pueden ser transferidas a la tierra para el crecimiento y
5 maduración adicional.

Para confirmar la presencia de una molécula de ácido nucleico de interés en la regeneración de las plantas, pueden ser realizados una variedad de ensayos. Dichos ensayos incluyen por ejemplo: ensayos de biología molecular, tales como Southern y Northern blotting y PCR; ensayos bioquímicos, tales como detectar la presencia de un producto de proteína, por ejemplo, por medios inmunológicos (ELISA y/o Western blots) o por medio de la función enzimática; ensayos de partes de la planta, tales como ensayos de hoja o raíz; y análisis del
10 fenotipo de la planta regenerada completa.
15

Los eventos de integración enviados al objetivo pueden ser seleccionados, por ejemplo, por medio de amplificación PCR utilizando, por ejemplo, cebadores de oligonucleótidos específicos para las moléculas de ácido nucleico de interés. La
20 genotipificación de PCR es entendido que incluye, pero no está limitada a, la amplificación de reacción de cadena de polimerasa (PCR) del ADN genómico derivado del tejido de callos de la planta huésped aislados que se pronostica que contienen una molécula de ácido nucleico de interés integrada
25 en el genoma, seguida por una clonación estándar y el análisis

de la secuencia de los productos de amplificación PCR. Los métodos de la genotipificación de PCR han sido bien descritos (por ejemplo, Rios, G. y asociados (2002) Plant J. 32: páginas 243 a 253) y pueden ser aplicados al ADN genómico derivado de cualquier especie de planta o tipo de tejido, incluyendo los cultivos celulares. Las combinaciones de cebadores de oligonucleótidos que se enlazan a ambas la secuencia objetivo y la secuencia introducida pueden ser utilizados consecutivamente o multiplexados en las reacciones de amplificación de PCR. Los cebadores de oligonucleótidos diseñados para reconocerlos al sitio del objetivo, las secuencias de ácido nucleico introducidas, y/o las combinaciones de los dos son factibles. Por lo tanto, las estrategias de genotipificación de PCR pueden incluir (pero no están limitadas a) amplificación de secuencias específicas en el genoma de la planta, amplificación de secuencias específicas múltiples en el genoma de la planta, amplificación de secuencias no específicas en el genoma de la planta, o combinaciones de las mismas. Un experto en la técnica puede prever combinaciones adicionales de cebadores y reacciones de amplificación para interrogar el genoma. Por ejemplo, un conjunto de cebadores directos o inversos de oligonucleótidos pueden ser diseñados para reconocerlos a la secuencia de ácido nucleico específica para el objetivo fuera de los límites de la secuencia de ácido nucleico introducida.

Los cebadores delanteros e inversos de oligonucleótidos pueden ser diseñados para reconocer específicamente a una molécula de ácido nucleico de interés introducida, por ejemplo, en una secuencia que corresponde a una región de codificación dentro de la molécula de ácido nucleico de interés, u otras partes de la molécula de ácido nucleico de interés. Estos cebadores pueden ser utilizados en conjunto con los cebadores descritos anteriormente. Los cebadores de oligonucleótidos pueden ser sintetizados de acuerdo con una secuencia deseada, y están disponibles comercialmente (por ejemplo, en Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA). La amplificación puede ser seguida por clonación y elaboración de secuencias, o por el análisis directo de la secuencia de los productos de amplificación. Un experto en la técnica podría prever métodos alternativos para el análisis de los productos de amplificación generados por la genotipificación de PCR. En una modalidad, los cebadores de oligonucleótidos específicos para el objetivo del gen son empleados en las amplificaciones PCR.

E. Cultivo y uso de plantas transgénicas

Una planta transgénica que comprende una o más ELPs y/o moléculas de interés de ácido nucleico, insertadas por la recombinación enviada al objetivo en el sitio de la ELP de acuerdo con la presente invención, puede tener una o más características deseables. Dichas características pueden incluir, por ejemplo: resistencia a los insectos, otras pestes, y

agentes que ocasionan enfermedades; tolerancias a los herbicidas; estabilidad mejorada, rendimiento, o vida en el almacén; tolerancias ambientales; producción farmacéutica; producción de productos industriales; y mejoras nutricionales.

5 Las características deseables pueden ser conferidas por una o más moléculas de ácido nucleico insertadas por la recombinación enviada al objetivo en un sitio de ELP que son expresadas en la planta que exhiben las características deseables. Por lo tanto, en algunas modalidades, la
10 característica deseada puede ser debido a la presencia de un transgén en la planta, el cual es introducido en el genoma de la planta en el sitio de una ELP. En una modalidad adicional, la característica deseada puede ser obtenida a través de la cría convencional, cuya característica puede ser conferida por una o
15 más moléculas de ácido nucleico insertadas por la recombinación enviada al objetivo en un sitio ELP.

Una planta transgénica de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier planta con la capacidad de ser transformada con una molécula de ácido nucleico de la
20 invención. Por consiguiente, la planta puede ser dicotiledónea o monodicotiledónea. Los ejemplos no limitativos de las plantas dicotiledóneas que se pueden usar en los métodos presentes incluyen alfalfa, frijoles, brócoli, calabaza, zanahoria, coliflor, perejil, calabaza China, algodón, pepino, berenjena, lechuga,
25 melón, chícharo, pimienta, cacahuate, papa, calabaza, rábano,

semilla de colza, espinaca, frijol soya, chayote, betabel, girasol, tabaco, tomate y sandía. Los ejemplos no limitativos de las plantas monocotiledóneas que se pueden usar en los métodos presentes incluyen maíz, cebolla, arroz, sorgo, trigo, centeno, mijo, caña de azúcar, avena, pasto y césped.

Las plantas transgénicas de acuerdo con la presente invención pueden ser utilizadas o cultivadas de cualquier manera, en donde es deseable la presencia de las ELP(s) y/o las moléculas de ácido nucleico de interés. Por consiguiente, se puede diseñar para, entre otras cosas, que tenga una o más características deseadas, siendo transformadas por las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, y cosechadas y cultivadas por cualquier método conocido para los expertos en la técnica.

15

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son incluidos para ilustrar las modalidades de la presente invención. Se podrá apreciar por aquellos expertos en la técnica que las técnicas descritas en los Ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores para que funcionen bien en la práctica de la presente invención. Sin embargo, aquellos expertos en la técnica, a la luz de la presente descripción, apreciarán que se pueden hacer muchos cambios en las modalidades específicas los cuales están descritos y todavía obtener un resultado igual o similar sin salirse del alcance de la presente invención. Más

20
25

específicamente, se podrá apreciar que ciertos agentes los cuales que están relacionados tanto químicamente como fisiológicamente pueden ser substituidos por los agentes aquí descritos, mientras que se lograrían resultados iguales o
5 similares. Todos dichos substitutos y modificaciones aparentes para los expertos en la técnica se considera que se encuentran dentro del alcance de la presente invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Construcción del Vector

10 Se sintetizaron dos ELPs diferentes que consistían de una región kbp 5' de homología ("la región 1 de la plataforma de aterrizaje diseñada" (SEQ ID No: 11) en pDAB100610/pDAB100640 y "la región 3 de homología sintética diseñada" (SEQ ID No: 12) en pDAB100611/pDAB100641) y una
15 región kbp 3' de homología ("la región 2 de la plataforma de aterrizaje diseñada" (SEQ ID No: 13) en pDAB100610 y "la región 4 de homología sintética diseñada" (SEQ ID No: 14) en pDAB100611/pDAB100641). Estas regiones de homología fueron separadas por dos sitios de enlace EXZACT de Nucleasa del
20 Dedo de Zinc (eZFN) diferentes.

Las dos ELPs utilizadas para pDAB100610 y pDAB100611, designadas ELP1 (SEQ ID No: 15) y ELP2 (SEQ ID No: 16), respectivamente, fueron transferidas utilizando la reacción de clonasa LR GATEWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA) dentro de
25 pDAB100704, un vector superbinario de destino el cual es

derivado de pSB11 (documentos WO94/00977 y WO95/06722). El pDAB100704 contiene el promotor ZmUbi1 (promotor (UTR) de la región no traducida del extremo 5' y el intrón derivado del promotor 1 de ubiquitina de *Zea mays* (Christensen y asociados 5 (1992) Plant Molecular Biology, 18(4); páginas 675 a 689)), el gen marcador que se puede seleccionar AAD-1 (un gen sintético, de versión optimizada de la planta de dioxigenasa de ariloxialcanoato de *Sphingobium herbicidovorans* (ATCC® 700291) que codifica una enzima con una actividad de 10 dioxigenasa dependiente de alfa cetoglutarato que confiere resistencia a los herbicidas de ariloxifenoxipropionato (documentos WO 2005/107437, WO 2008/141154A2, y la Patente Norteamericana No. US 2009/0093366, cada una de las cuales está incorporada como referencia a la presente 15 descripción), y la UTR del extremo 3' ZmLip ((UTR) de región sin traducir del extremo 3') que comprende el terminador de transcripción y el sitio de poliadenilación del gen *Zea mays* de maíz LIP; No. de Acceso al GenBank L35913).

Las dos ELPs utilizadas para pDAB100640 y pDAB100641, 20 designadas ELP1 (SEQ ID No: 15) y ELP2 (SEQ ID No: 16), respectivamente, fueron transferidas utilizando la reacción de clonasa LR GATEWAY® (Invitrogen, Carlsbad, CA) dentro del pDAB101849, un vector binario, pDAB101849 que contiene el promotor OsAct1 (promotor, e intrón derivados del promotor de 25 actina de arroz (Patente Norteamericana No. 5,641,876)), el gen

marcador *pat* que se puede seleccionar (gen de transferasa de fosfinotricina acetilo; Wohlleben y asociados (1988) Gene 70: páginas 25 a 37), y la UTR del extremo 3' ZmLip ((UTR) de la región sin traducir de la terminal 3') que comprende el
5 terminador de transcripción y el sitio de poliadenilación del gen *Zea mays* LIP; No. de Acceso del GenBank L35913).

Los clones resultantes, pDAB100610 (figura 1), pDAB100611 (figura 2), pDAB100640 (figura 3), y pDAB100641 (figura 4) fueron verificados en la secuencia. Los vectores
10 pDAB100610 y pDAB100611 fueron transferidos a una cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que hace puente con el plásmido binario pSB1, y la región del hilo-T fue integrada dentro del pSB1 por medio de la recombinación homóloga. Los vectores pDAB100640 y pDAB100641 fueron transferidos en una
15 cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. La estructura de cada plásmido fue confirmada por la digestión de la enzima de restricción.

Los vectores que contienen moléculas de ácido nucleico de interés (donante de ADN) fueron ensambladas insertando el
20 cassette de expresión YFP y cualquiera de los cassettes de expresión PAT o AAD-1 entre las versiones truncadas de las regiones de la terminal 5' y las regiones de la terminal 3' de homología (anotadas como las versiones 2 (v2)) para ELP1 y ELP2. El cassette de expresión PAT contiene un promotor
25 OsAct1 (promotor de actina 1 de arroz; McElroy y asociados

(1990) Plant Cell 2: páginas 163 a 171) el cual fue utilizado para expresar el gen *pat* (gen de transferasa acetilo de fosfinotricina; Wohlleben y asociados (1988) Gene 70: páginas 25 a 37) que está flanqueado por la región sin traducir ZmLip 3'. El cassette de expresión AAD-1 contiene el promotor ZmUbi1 para conducir el gen *aad-1* y la UTR de la terminal 3' del ZmPer (Patente Norteamericana No. US 6384207). El cassette de expresión de YFP consiste del promotor ZmUbi1 el cual es utilizado para conducir la expresión del gen PhiYFP (proteína fluorescente amarilla (Solicitud de Patente Norteamericana No. US2007/0298412)) y es flanqueada por el UTR de la terminal 3' ZmPer5 (Patente Norteamericana No. US 6384207).

Los cassettes de expresión PAT y YFP fueron clonados entre las versiones truncadas de la "región 1 de la plataforma de aterrizaje diseñada" y la "región 2 de la plataforma de aterrizaje diseñada" en el ELP1 (pDAB105955, figura 5). Alternativamente, los cassettes de expresión PAT y YFP fueron clonados entre las versiones truncadas de la "región 3 de homología diseñada" y la "región 4 de homología diseñada" en el ELP2 (pDAB105956, figura 6). De un modo similar, los cassettes de expresión AAD-1 y YFP fueron clonados entre las versiones truncadas de la "región 1 de la plataforma de aterrizaje diseñada" y las versiones truncadas de la "región 2 de la plataforma de aterrizaje diseñada" en el ELP1 (pDAB105979, figura 7). Alternativamente, los cassettes de

expresión AAD-1 y YFP fueron clonados entre las versiones truncadas de la "región 3 de homología diseñada" y las versiones truncadas de la "región 4 de homología diseñada" en el ELP2 (pDAB105980, figura 8). Las construcciones de ADN del donante fueron clonadas en un vector binario para Biolistic, WHISKERS o la transformación portada por *Agrobacterium*. Además, las construcciones de ADN pueden ser clonadas en un plásmido con un número de copias alto (por ejemplo, derivados de pBR322 portadores del origen de duplicación ColE1) para la generación del ADN plásmido utilizado en la transformación de entrega directa de ADN.

Ejemplo 2: Entrega de ADN portado por *Whiskers* (Barbas)

El cultivo de células embriogénicas Hi-II del maíz fue producido como se describió en la Patente Norteamericana No. 7,179,902, y fue utilizado como la fuente de células de plantas vivas en las cuales fue ejemplificada la integración al objetivo.

Los fragmentos que contienen el cassette marcador que se puede seleccionar del AAD-1 de la planta y los ELP1 y ELP2, respectivamente, de pDAB100610 y pDAB100611 y los fragmentos que contienen el cassette marcador que se puede seleccionar de la planta PAT y los ELP1 y ELP2, respectivamente, de pDAB100640 y pDAB100641 fueron utilizados para generar eventos transgénicos. Los eventos transgénicos fueron aislados y caracterizados. Estos eventos entonces fueron enviados al objetivo utilizando recombinación

homóloga dirigida por homología, en donde una molécula de ácido nucleico de interés puede ser integrada dentro de una plataforma de aterrizaje diseñada.

12 mL de un volumen de células empacadas (PCV) de una
5 línea celular crioconservada anteriormente más 28 mL de medio
acondicionado se subcultivaron en 80 mL de medio líquido GN6
(medio N6 (Chu y asociados (1975) Sci Sin. 18: páginas 659 a
668), 2.0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, pH 5.8) en un
matraz Erlenmeyer de 500 mL, y colocado en un agitador en una
10 velocidad de 125 rpm a una temperatura de 28°C. Este paso fue
repetido dos veces utilizando la misma línea celular, de modo
que un total de 36 mL de PCV fueron distribuidos en todos los
tres matraces. Después de 24 horas, los medios líquidos GN6
fueron removidos y reemplazados por 72 mL de un medio
15 osmótico GN6 S/M (medio N6, 2.0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de
sacarosa, 45.5 g/L de sorbitol, 45.5 g/L de manitol, 100 mg/L de
mio-inositol, pH 6.0). Los matraces fueron incubados en la
oscuridad durante un período de 30 a 35 minutos a una
temperatura de 28°C con agitación moderada (125 rpm).
20 Durante el período de incubación, una suspensión de 50 mg/mL
de *whiskers* de carburo de silicón (Advanced Composite
Materials, LLC, Greer, SC) fueron preparados agregando 8.1 mL
de medio líquido GN6 S/M a 405 mg de *whiskers* de carburo de
silicón, estéril.

25 Después de la incubación en el medio osmótico GN6 S/M,

los contenidos de cada matraz fueron conjuntados en una botella centrífuga de 250 mL. Después de que todas la células del matraz se asentaron en el fondo, el volumen del contenido excedente de aproximadamente 14 mL de líquido GN6 S/M fue
5 decantado y recolectado en un matraz de 1 L estéril para uso futuro. La suspensión previamente humedecida de los *whiskers* fue mezclada en una velocidad máxima en un remolino por 60 segundos, y luego se agregó a la botella de la centrífuga.

170 µg de fragmentos purificados de cualquiera del ADN
10 plásmido pDAB100610 o pDAB100611 fueron agregados a cada botella. Una vez que se agregó el ADN, la botella fue colocada inmediatamente en un mezclador de pintura comercial Red Devil 5400 modificado (Red Devil Equipment Co., Plymouth, MN), y agitado durante 10 segundos. Después de la agitación, el
15 cocktail de células, medios, *whiskers* y ADN fueron agregados a los contenidos de un matraz de 1 L junto con 125 mL de medio líquido GN6 fresco para reducir el osmoticante. Se permitió que las células se recuperaran en un agitador programado en 125 rpm durante dos horas. Se filtraron 6 ml de agua dispersada en
20 papel de filtro Whatman #4 (5.5 cm) utilizando una unidad recolectora de células de vidrio conectada a una línea de vacío de la casa conforme fueron obtenidos 60 filtros por botella. Los filtros fueron colocados sobre placas de 60 mm x 20 mm del medio sólido GN6 (mismo que el medio líquido GN6 excepto con
25 2.5 g/L de agente de gelificación Gelrite) y cultivados a una

temperatura de 28°C bajo condiciones oscuras durante una semana.

**Ejemplo 3: Identificación y aislamiento de eventos
transgénicos putativos**

- 5 Una semana después de la administración del ADN, los papeles del filtro fueron transferidos a placas de 60 mm x 20 mm del medio de selección GN6 (1H) (medio N6, 2.0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mio-inositol, 2.5 g/L de Gelrite, pH 5.8) que contienen el agente selectivo apropiado.
- 10 Estas placas de selección fueron incubadas a una temperatura de 28°C por una semana en la oscuridad. Después de una semana de selección en la oscuridad, el tejido fue incrustado en medios frescos descartando la mitad de las células de cada placa en un tubo con un contenido de 3.0 mL de medio de
- 15 agarosa GN6 mantenido en una temperatura de 37°C a 38°C (medio N6, 2.0 mg/L de 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 100 mg/L de mio-inositol, 7 g/L de agarosa SEAPLAQUE®, pH 5.8, sometidos a autoclave durante 10 minutos a una temperatura de 121°C).
- 20 La mezcla de agarosa/tejido fue rota con una espátula, y posteriormente, se le vertieron de manera uniforme 3 mL de una mezcla de agarosa/tejido sobre la superficie de un plato de petri de 100 mm x 15 mm con un contenido de medio GN6 (1H). Este proceso se repitió para ambas mitades de cada placa. Una
- 25 vez que todos los tejidos fueron incrustados, las placas fueron

selladas individualmente con NESCOFILM® o PARAFILM® M, y cultivadas a una temperatura de 28°C bajo condiciones oscuras por hasta 10 semanas. Los aislados transformados de manera putativa que se cultivaron bajo estas condiciones de selección
5 fueron removidos de las placas incrustadas y transferidos a un medio de selección fresco en placas de 60 mm x 20 mm. Si era evidente el crecimiento sostenido después de aproximadamente dos semanas, se consideraba que un evento era resistente al herbicida aplicado (agente selectivo) y se recolectó
10 posteriormente un alícuota de células para el análisis del genotipo.

Ejemplo 4: Caracterización de eventos moleculares

Extracción de ADN genómico.

El ADN genómico (gADN) fue extractado de las células
15 aisladas de maíz y utilizado como plantilla para los experimentos de genotipificación de PCR. El gADN fue extractado de aproximadamente un volumen de células empacadas de 100 µl a 300 µl (PCV) del callo Hi-II que fue aislado de acuerdo con los protocolos del fabricante detallados
20 en el Equipo de la Planta DNEASY® 96 (QIAGEN Inc., Valencia, CA). El ADN genómico se eluyó en 100 µl de regulador de elución suministrado en el equipo con concentraciones finales de rendimiento de 20 ng/µL a 200 ng/µL, y analizados posteriormente por medio de métodos de genotipificación
25 basados en PCR.

Análisis molecular del número de copias.

La determinación del número de copias del transgén por el ensayo de sonda de hidrólisis, análogo al ensayo TAQMAN®, fue realizado mediante PCR de tiempo real utilizando el sistema

5 LIGHTCYCLER480® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Los ensayos fueron diseñados para los genes AAD-1 y PAT y un gen de referencia interna utilizando el Software de Diseño de Sonda 2.0 de LIGHTCYCLER® 2.0. Para la amplificación, la

10 mezcla Maestra de las Sondas 480 de LIGHTCYCLER® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) fue preparada en una concentración final 1x en una reacción de multiplexión de un volumen de 10 µl con un contenido de 0.4 µM de cada cebador y 0.2 µM de cada sonda. Se realizó una reacción de amplificación de dos pasos con una extensión en una temperatura de 58°C

15 durante 38 segundos con la adquisición de fluorescencia. Todas las muestras fueron operadas por triplicado, y los valores de umbral del ciclo promediados (Ct) fueron utilizados para el análisis de cada muestra. El análisis de los datos de PCR de tiempo real se realizó utilizando la liberación del software

20 LIGHTCYCLER® 1.5 utilizando un módulo de cuantificación relativa y estuvo basado en el método $\Delta\Delta C_t$. Para esto, una muestra del ADN genómico de un calibrador de una sola copia y la revisión de dos copias conocidas fueron incluidas en cada corrida (idénticas a las utilizadas para los ensayos

25 INVADER® anteriores). Para estos datos, el número de copias

de AAD-1 o PAT aparente fue entonces estimado por cada muestra.

Diseño del cebador para la genotipificación de PCR.

Los cebadores de oligonucleótidos fueron sintetizados
5 bajo condiciones de des-salación estándar y diluidos con agua
en una concentración de 100 μ M (por ejemplo, por Integrated
DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA)). El cebador de
oligonucleótidos fue diseñado para recocerse en las regiones
del extremo del inserto de ADN. Los cebadores fueron probados
10 utilizando diluciones del ADN plásmido en la presencia del ADN
aislado de los organismos no transgénicos. El inserto de
pDAB100610, pDAB100611, pDAB100640 y pDAB100641 fue
amplificado por PCR del ADN genómico de los eventos putativos
utilizando los cebadores. El fragmento resultante fue clonado en
15 un vector plásmido y se elaboraron las secuencias para
confirmar que la plataforma de aterrizaje diseñada estaba
completamente integrada en el genoma de la planta durante la
transformación.

Análisis Southern Blot.

20 El análisis Southern fue realizado para confirmar un
número de copias del transgén. Para este análisis, el ADN
genómico fue digerido con las enzimas de restricción
apropiadas y probadas.

El tejido del maíz identificado como que contenía la ELP
25 putativa por el lugar PCR específico fueron avanzados por los

análisis Southern blots. Para el análisis Southern, las muestras del tejido fueron recolectadas en tubos Eppendorf de 2 ml y liofilizadas durante dos días. La maceración del tejido fue realizada con un pulverizador de tejidos Kleco y cuentas de tungsteno (Kleco, Visalia, CA). Después de la maceración del
5 tejido, el ADN genómico fue aislado utilizando el Mini Equipo de Planta DNeasy (Qiagen, Germantown, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante.

El ADN genómico fue cuantificado por medio del equipo de
10 ensayo de ADN Verde Pico Quant-IT (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN cuantificado fue ajustado a 4 µg para el análisis Southern blot y digerido utilizando las enzimas de restricción apropiadas durante la noche a una temperatura de 37°C. El ADN digerido fue purificado utilizando
15 el sistema Quick-Precip (Edge BioSystem, Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. El ADN precipitado se volvió a suspender en un tinte 10X y se sometió a electroforesis durante 17 horas en un gel de agarosa al 0.8% SeaKem LE (Lonza, Rockland, ME) a 40 volts. El ADN fue
20 transferido a membranas cargadas de nylon (Millipore, Bedford, MA) durante la noche y reticulado a la membrana utilizando el enlazador 1800 de Estratos de UV (Stratagene, La Jolla, CA). Las manchas fueron previamente hibridadas con 20 mL de PerfectHyb Plus (Sigma, St. Louis, MO) y probadas con la
25 proporción apropiada de la sonda etiquetada durante la noche.

Las manchas fueron lavadas y colocadas en pantallas de imagen de fósforo durante 24 horas y luego analizadas utilizando el scanner 860 de STORM™ (Molecular Dynamics).

Ejemplo 5: Selección de eventos transgénicos con un inserto de ADN

5 Los eventos fueron seleccionados por medio del ensayo de sondas de hidrólisis y PCR, como se describió anteriormente, para una unidad intacta de transcripción de la planta (PTU) con un contenido de los cassettes de genes AAD-1 o PAT y las
10 ELPs intactas. El número de copias fue confirmado adicionalmente por el análisis Southern utilizando métodos estándar con un gen AAD-1 y PAT y una sonda ELP. El callo de los eventos transgénicos seleccionados que puentean una sola copia, los insertos intactos de pDAB100610 y pDAB100611
15 fueron mantenidos para una prueba posterior para la expresión del gen AAD-1. La selección utilizando un método AAD-1 qRT-PCR y la prueba de ELISA (más adelante) identificaron los eventos que expresan el AAD-1.

Análisis qRT-PCR de eventos que expresan el AAD-1.

20 Se utilizó un PCR de Tiempo Real Cuantitativo (qRT-PCR) para cuantificar la expresión de mRNA del gen de expresión AAD-1. El ensayo fue desarrollado para cuantificar la expresión de mRNA de AAD-1 relativa de las muestras de callos Hi-II transgénicos normalizando estos niveles contra la expresión de
25 mRNA de un gen de referencia interna. La normalización del

mARN del AAD-1 contra el mARN de un gen de referencia interna permite la comparación de la expresión de AAD-1 entre dos muestras diferentes, y puede ser utilizado para identificar eventos que parecen ser altamente expresivos.

5 El ARN total fue preparado de tejido de callos fresco utilizando el Equipo 96 de Qiagen RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA). El ARN fue tratado con DNasa libre de RNasa de acuerdo con las instrucciones del equipo para remover cualesquiera contaminantes del ADN genómico. La síntesis del primer hilo
10 fue preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la Enzima de Transcriptasa Inversa III de Superscript® (Invitrogen, Carlsbad, CA) y preparada utilizando hexámeros aleatorios. Los hilos de cADN sintetizados fueron diluidos en agua en proporciones de 1:10 y 1:50 (esto proporciona una
15 plantilla suficiente para los objetivos múltiples de amplificación de PCR). Cada alícuota fue guardado indefinidamente en una temperatura de -20°C. Las mezclas de reacción qRT-PCR fueron preparadas para la amplificación del cADN de AAD-1 de la manera siguiente: 7.5 µL de Regulador Maestro de Sondas
20 LC480 2X (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN), 0.3 µL del cebador directo específico del gen de 10 µM de material, 0.3 µL de cebador inverso específico del gen de 10 µM de material, 0.15 µL de la sonda UPL de las Sondas Maestras 480 de LightCycler®, Roche Diagnostic, Indianapolis, IN), 1.5 µl de
25 polivinilpirrolidona-40 al 10% (p/v) (PVP-40), y 3.9 µL de agua.

La sonda de UPL (Roche Diagnostics, Indianapolis, EUA) fue un ácido nucleico cerrado y por lo tanto, tiene un T_m más alto que el calculado de otra manera. Todos los componentes se volvieron a poner en el congelador antes del manejo de los
5 estándares y desconocidos. La microplaca de 384 depósitos fue demarcada y etiquetada, 13.5 μ L de la mezcla maestra fueron agregados por depósito. Una lámina de sellado fue adherida de manera suave a la microplaca. La placa fue centrifugada durante un minuto a una velocidad de 3,000 rpm en una
10 centrífuga de microplaca Qiagen. Se agregaron 1.5 μ L de hilos de cADN sintetizados diluidos, descongelados. Adicionalmente, se agregaron estándares del número de copias de ADN plásmido de 1.5 μ L para los depósitos separados en una serie de dilución de las concentraciones más bajas hasta las más
15 altas, y estos estándares fueron comparados con el cADN de AAD-1 (sintetizados del mRNA total) para cuantificar el número de copias. La serie estándar de número de copias de ADN de AAD-1 se hizo mediante la clonación de un amplicon objetivo en un plásmido pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y haciendo la
20 serie de diluciones para cuantificar el número de copias. Un sello de lámina fue firmemente fijado a la placa y centrifugado como se describió anteriormente. Un programa PCR fue realizado y el ADN fue amplificado en una instrumentación LC480 de PCR de Tiempo Real (Roche, Indianapolis, IN) o
25 equivalente.

Ejemplo 6: Determinación de la proteína AAD-1 en tejidos de maíz mediante la prueba de ELISA

Un método para determinar de manera cuantitativa la proteína AAD-1 en el callo del maíz utilizando una técnica del
5 ensayo inmunoabsorbente enlazado a la enzima (ELISA) fue desarrollada. El método aquí descrito puede ser utilizado para detectar la proteína AAD-1 y analizar las muestras del tejido de las plantas de los callos de maíz transgénico.

La proteína AAD-1 fue extractada de las muestras de maíz
10 con reguladores específicos del callo basados en una solución salina regulada por fosfato con un contenido de Tween 20 al 0.05% (PBST), y posiblemente con un contenido de albúmina de suero bovino, inhibidores de proteasa o ácido ascórbico. El extracto fue centrifugado, el sobrenadante acuoso recolectado,
15 diluido y ensayado utilizando una prueba de ELISA específica de AAD-1. El formato simultáneo de emparedado de ELISA fue aplicado en este ensayo. Un alícuota de la muestra diluida y un anticuerpo monoclonal anti-AAD-1 biotinilado (MAb 473F185) fueron incubados en los depósitos de una placa microtituladora
20 recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-AAD-1 inmovilizado (MAb 473H274). Estos anticuerpos se enlazaron con la proteína AAD-1 expresada del maíz en los depósitos para formar un "emparedado" con la proteína AAD-1 enlazada entre el anticuerpo soluble y el inmovilizado. Las muestras no
25 enlazadas y conjugadas entonces fueron removidas de la placa

mediante un lavado con PBST. Una cantidad excedente del conjugado de enzima de estreptavidina (fosfatasa alcalina) fue agregada a los depósitos para incubación. La presencia de AAD-1 fue detectada incubando el conjugado de enzima con un
5 sustrato de enzima; generando un producto coloreado. Debido a que la AAD-1 fue enlazada en el emparejado del anticuerpo, el nivel del desarrollo de color está relacionado con la concentración de AAD-1 en la muestra (es decir, las concentraciones inferiores de la proteína dan como resultado un
10 desarrollo de color más bajo). La absorbancia fue medida en 405 nm utilizando el lector de placa.

Los eventos AAD-1 que tienen la expresión alta fueron identificados de los eventos transgénicos seleccionados y mantenidos para el envío al objetivo posterior con el ADN
15 donante.

Ejemplo 7: Administración de ADN portada por biolística en las células de la planta que contienen una ELP

Regeneración de eventos transgénicos con ADN al objetivo.

20 Los eventos de pDAB100160 y pDAB100611 se confirmó que eran una copia baja y contenían PTU intacto fueron regenerados para producir el material de donantes de embriones inmaduros para el envío al objetivo. El tejido de crecimiento saludable fue transferido primero a un medio de
25 28+100 haloxyfop (medio MS (Murashige y Skoog (1962) Physiol

Plant 15: páginas 473 a 497), 0.025 mg/L de 2,4-D, 5 mg/L de BAP, 0.0362 mg/L de haloxyfop, 30 g/L de sacarosa, 2.5 g/L de Gelrite, pH 5.7) e incubado con poca luz ($14 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$, 16 horas de fotoperíodo) durante siete días seguido por alta luz (89 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$, 16 horas de fotoperíodo) por otros siete días. Las estructuras del invernadero fueron transferidas al haloxyfop de 36 + 100 (mismas que 28 + 100 haloxyfop menos el BAP y el 2,4-D) e incubados en alta luz ($40 \mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$, 16 horas de fotoperíodo) hasta que las estructuras de los brotes desarrollaron raíces suficientes para el trasplante al invernadero. Las plantas fueron cultivadas hasta la madurez en el invernadero utilizando una mezcla de Metro-Mix 360® al 95% y tierra de arcilla al 5% y polinados con dependencia a la salud de la planta. Las plantas que crecen vigorosamente fueron autopolinadas (plantas del mismo evento) y las plantas menos vigorosas fueron cruzadas con Hi-II, A188 o B104 para mantener la capacidad embrionaria del material del donante.

Ejemplo 8: Administración de ADN portada por biolística en las células de las plantas que contienen una ELP

El envío al objetivo de los eventos producidos de pDAB100610 y pDAB100611.

El envío al objetivo de la secuencia donante fue completado utilizando dos protocolos diferentes de transformación. Los eventos ELP intactos transgénicos que contenían AAD-1 como el marcador que se puede seleccionar

(eventos pDAB100610 y pDAB100611), el envío al objetivo fue realizado por medio de la administración de ADN portada por biolística dentro de embriones inmaduros con callosidades previas. Los embriones de tamaño de 1.2 mm a 2.0 mm fueron recolectados de 10 a 13 días después de la polinación y colocados en placas sobre el medio N6E (medio N6, 2.0 mg/L de 2,4-D, 2.8 g/L de L-prolina, 100 mg/L de hidrolisato de caseína, 100 mg/L de mio-inositol, 4.25 mg/L de nitrato de plata, 30 g/L de sacarosa, pH 5.8) e incubados a una temperatura de 28°C por un período de dos a tres días en la oscuridad. Los embriones hinchados fueron transferidos al N60SM (mismo que el N6E con la adición de 36.4 g/L de sorbitol, 36.4 g/L de manitol y L-prolina reducida a 0.7 g/L) que llenaron un círculo de un diámetro de 2.5 cm en el papel de filtro Whatman # 4. Se utilizó un colador de 1,000 µm para contener los embriones para el marchitado y los embriones fueron incubados en la oscuridad a una temperatura de 28°C por un período de cuatro horas hasta el marchitado. Para recubrir las partículas de biolística con ADN, se lavaron una vez 3 mg de partículas de oro de un diámetro de 0.60 micras con etanol al 100%, dos veces con agua destilada estéril, y se volvieron a suspender en 50 µl de agua en un tubo de microfuga siliconizado. Un total de 5 µg de ADN plásmido separa los vectores que codifica la nucleasa del dedo de zinc y el fragmento de ADN del donante; pDAB105955 o pDAB105956), 20 µl de espermidina (0.1 M) y 50 µl de cloruro

de calcio (2.5 M) fueron agregados por separado a la suspensión de oro y mezclados en un remolino. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, granulada a una velocidad de 10,000 rpm en una microcentrífuga de banco
5 durante 10 segundos, se volvieron a suspender en 60 µl de etanol frío al 100%, y de 8 µl a 9 µl fueron distribuidas sobre cada macroportador.

El bombardeo tuvo lugar utilizando el sistema Biolistic PDS-1000/HE™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las
10 placas que contienen los embriones fueron colocadas en el anaquel medio bajo condiciones de 650 psi (45.69 kg/cm²) y 27 pulgadas (68.58 cm) de vacío Hg⁺⁺, y fueron bombardeados una vez siguiendo el manual de operación. 24 horas después del bombardeo, los embriones fueron transferidos directamente (sin
15 papel de filtro) al medio N6E (mismo que el anterior) para la recuperación e incubados durante 13 días a una temperatura de 28°C en la oscuridad. Los embriones fueron transferidos al medio de selección N6S (medio N6, 2.0 mg/L de 2,4-D, 100 mg/L de mio-inositol, 0.85 mg/L de nitrato de plata, 2 mg/L de
20 bialafos, 30 g/L de sacarosa, 2.5 g/L de Gelrite y pH 5.8) para cada dos semanas por 3 transferencias en el medio de selección e incubados a una temperatura de 28°C en condiciones de oscuridad por hasta 10 semanas. Los aislados transformados de manera putativa que crecieron bajo estas
25 condiciones de selección fueron removidos de las placas

incrustadas y transferidos a un medio de selección fresco en placas de 60 mm x 20 mm. Si era evidente el crecimiento sostenido después de aproximadamente dos semanas, el evento se consideró que era resistente al herbicida aplicado (agente selectivo) y posteriormente se recolectó una alícuota de células para el análisis de genotipo (análisis que se describe más adelante).

Envío al objetivo de los eventos producidos de pDAB100640 y pDAB100641.

10 Los eventos ELP transgénicos intactos que contenían el marcador de envío al objetivo que se podía seleccionar PAT (pDAB100640 y pDAB100641) fue realizado por medio de una entrega de ADN portada por biolística en los callos de maíz embriogénicos. De seis a ocho días posteriores del subcultivo, 15 el tejido del maíz embriogénico ((aproximadamente 0.4 mL de PCV de células) fue difundido de manera delgada en un círculo de 2.5 cm de diámetro en la parte superior de un papel de filtro Whatman #4 colocado en un plato de petri de 100 mm x 15 mm con un contenido de medios GN6 S/M (medio N6, 2.0 mg/L de 20 2,4-D, 30 g/L de sacarosa, 45.5 g/L sorbitol, 45.5 g/L de manitol, 100 mg/L de mio-inositol, pH 5.8) solidificado con 2.5 g/L de Gelrite. Las células fueron incubadas bajo condiciones de oscuridad por cuatro horas. El ADN fue preparado para el marchitado como se describió anteriormente, se utilizó 25 pDAB105979 y pDAB105980 para el envío al objetivo.

El bombardeo tuvo lugar utilizando el sistema Biolistic PDS-1000/HE™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las placas con contenido de las células fueron colocadas en el anaquel medio bajo condiciones de 1,100 psi (77.33 kg/cm²) y 27 pulgadas (68.58 cm) de vacío Hg⁺⁺, y fueron bombardeadas una vez después de la operación manual. 24 horas después del bombardeo, el papel de filtro que contiene las células de las plantas fue transferido al medio sólido GN6 (medio N6, 2.0 mg/L de 2,4-D, 100 mg/L de mio-inositol, 30 g/L de sacarosa, pH 5.8) solidificado con 2.5 g/L de Gelrite e incubados durante 24 horas a una temperatura de 28°C bajo condiciones de oscuridad. Después de 24 horas del período de recuperación, el papel de filtro que contiene las células de las plantas fue transferido al GN6+ 100 haloxyfop (medio N6, 2.0 mg/L de 2,4-D, 100 mg/L de mio-inositol, 30 g/L de sacarosa, 0.0362 mg/L de haloxyfop, 2.5 g/L de Gelrite, pH 5.8), la difusión de las células fuera de la capa delgada en el papel filtro. La transferencia continuó cada dos semanas por 3 transferencias en el medio de selección. El tejido fue incubado por hasta 12 semanas hasta que los aislados transgénicos putativos resultantes de la integración del ADN del donante comenzaron a aparecer. Los aislados transformados de manera putativa que crecieron bajo estas condiciones de selección fueron removidos de las plantas incrustadas y transferidos al medio de selección fresco en placas de 60 mm x 20 mm. Si era evidente el crecimiento

sostenido después de aproximadamente dos semanas, se consideró que es un evento para ser resistente al herbicida aplicado (agente selectivo) y un alícuota de células fue recolectado posteriormente para el análisis del genotipo
5 (análisis descrito más adelante).

Ejemplo 9: Selección de eventos de integración enviados al objetivo por medio de la genotipificación de PCR

El envío al objetivo de las moléculas donantes (pDAB105979, pDAB105980, pDAB105955, pDAB105956) en las
10 ELPs en maíz transgénico es analizado utilizando una combinación de: 1) PCR específico del lugar; 2) TaqMan específico del donante, y; 3) Southern blots específico del lugar para evaluar la precisión del inserto, lo intacto y el número de copias. Un evento positivo que se volvió a enviar al objetivo se
15 esperaba que tuviera a) un PCR positivo fuera-fuera o un traslape dentro-fuera del resultado de PCR y 2) un diagnóstico de imagen Southern de la presencia de un donante.

Extracción de ADN

El tejido del maíz transgénico que se volvió a enviar al
20 objetivo (tejido de callo u hojas de la planta) es liofilizado por al menos dos días en placas de recolección de 96 depósitos (Qiagen, Germantown, MD). El ADN es extractado del tejido liofilizado utilizando la estación de trabajo BioSprint 96 (Qiagen, Germantown, MD) siguiendo las instrucciones del
25 fabricante y se volvió a suspender en 200 µl de agua. Un

pulverizador de tejidos Kleco Modelo 2-96A (Garcia Manufacturing, Visalia CA) es utilizado para la interrupción del tejido.

Cuantificación de ADN: El ADN genómico resultante es
5 cuantificado utilizando un equipo de ensayo de ADN Verde Pico
QUANT-IT® (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). Cinco
estándares de ADN previamente cuantificados en un rango de
20 ng/ μ L a 1.25 ng/ μ L (diluidos en serie) son utilizados para la
generación de la gráfica estándar. Las muestras desconocidas
10 son diluidas primero en diluciones de 1:10 ó 1:20 para que se
encontraran dentro del rango lineal del ensayo. 5 μ L de
muestras diluidas y estándares son mezcladas con 100 μ L del
substrato Verde Pico diluido (1:200) e incubados durante 10
minutos en la oscuridad. Entonces la fluorescencia es
15 registrada utilizando el lector de placa Synergy2 (Biotek). La
concentración del ADN genómico es estimada de la gráfica
estándar calculada después de las correcciones de
fluorescencia del fondo. El ADN es analizado posteriormente a
concentraciones de 2 ng/ μ L utilizando un manejador líquido
20 automático Biorobot-3000 (Qiagen, Germantown, MD). El ADN
normalizado es utilizado para el PCR, y el análisis del número
de copias.

Análisis PCR

Tres tipos de PCR específicos del lugar (fuera-fuera,
25 fuera-dentro del extremo 5', fuera-dentro del extremo 3') son

realizados para evaluar si los plásmidos del donante son enviados al objetivo a las ELPs. Las reacciones PCR se realizaron para investigar la presencia de una copia intacta del ADN del donante (PCR fuera-fuera). El foco de las reacciones PCR adicional en el límite del extremo 5' entre el objetivo y el donante y el límite del extremo 3' entre el donante y el objetivo (PCR dentro-fuera). Un diagrama esquemático con posiciones de los cebadores utilizados para el análisis se ejemplifica en la figura 9. Los productos PCR esperados para cada donante y el objetivo ELP son subrayados en la Tabla 1. Las secuencias de los cebadores utilizadas para el análisis se muestran en la Tabla 2.

15

20

25

5

10

15

Tabla 1: Tamaños esperados del amplicon para el PCR específico del lugar para el análisis de integración del donante enviado al objetivo.

ID del Plásmido del Objetivo ELP	Nuevo Envío al Objetivo del Donante	Cebadores*	Amplicon Esperado (kB)
pDAB100640	pDAB105979 sLP1L-YFP-AAD1-sLP1R	610F-611R 610-YFP YFP-611	8.5 3.5 5.4
pDAB100641	pDAB105980 sLP2L-YFP-AAD1-sLP2R	611/611 611/YFP YFP/611	7.6 4.4 3.5
pDAB106685	pDAB105979 sLP1L-YFP-AAD1-sLP1R	610F-611R 610-YFP YFP-611	8.5 3.5 5.4
pDAB106686	pDAB105980 sLP2L-YFP-AAD1-sLP2R	611/611 611/YFP YFP/611	7.6 4.4 3.5
pDAB100610	pDAB105955 sLP1L-YFP-PAT-sLP1R	610F-611R 610-YFP YFP-611	8.5 3.5 5.4
pDAB100611	pDab105956 sLP2L-YFP-PAT-sLP2R	611/611 611/YFP YFP/611	7.6 4.4 3.5
* los cebadores de la lista fueron con el objeto de: fuera-fuera 5' en-fuera 3' fuera-en			

20

25

Tabla 2: Secuencias de cebadores utilizadas para el análisis de integración enviado al objetivo.

Oligo	SEQ ID NO:	Secuencia
610F	SEQ ID NO:21	GCTACTAAGAACAATACCTAAGTTGC
611F	SEQ ID NO:22	TGCACTCATGTTCATATCC
611R	SEQ ID NO:23	TGTACAAGAAAGCTGGGTG
YFPF 3302	SEQ ID NO:24	TATGGTCCAGAGTTGAAGG
YFPR 4577	SEQ ID NO:25	TCATCTGCACAACTGGTGA
YFPF 4302	SEQ ID NO:26	TCTTTCCCAACACATGACC

Amplificación de PCR:

La reacción de cadena de polimerasa (PCR) es realizada para evaluar y confirmar el nuevo envío al objetivo de las ELPs. Las reacciones PCR son preparadas en un volumen de 25 µl con
5 polimerasa de ADN Phusion (New England Biolabs, Ipswich, MA) o AccuPrime (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para el PCR Phusion cada reacción contiene un regulador GC Phusion 1X, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 µM de los oligonucleótidos directo e inverso, 2.5 unidades de polimerasa de ADN Phusion y 20 ng de ADN
10 genómico. De 10 ng a 20 ng del ADN plásmido construido para imitar el evento de nuevo envío al objetivo es operado como un control positivo. Un control sin plantilla (agua como plantilla) también es operado. Las condiciones PCR son las siguientes: 35 ciclos en una temperatura de 98°C durante un minuto,
15 temperatura de 98°C durante 10 segundos, 65°C durante 20 segundos, 72°C durante 2.5 minutos seguido por una temperatura de 72°C durante 10 minutos.

Veinticinco reacciones de microlitros de PCR realizadas con AccuPrime (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenían un
20 regulador II 1X, 0.2 µM de oligonucleótidos directos e inversos, 2.5 unidades de polimerasa Taq AccuPrime, y 20 ng de ADN genómico. Los controles positivo y negativo son operados como se describió anteriormente para Phusion. Las condiciones para AccuPrime son las siguientes: 35 ciclos a una temperatura de
25 98°C, de un minuto, temperatura de 98°C de 10 segundos,

temperatura de 65°C de 20 segundos, temperatura de 68°C por 2.5 minutos seguida por una temperatura de 68°C durante 10 minutos.

Los fragmentos amplificados son removidos con gel y purificados de acuerdo con las direcciones del fabricante. Los fragmentos purificados son clonados posteriormente en un vector plásmido y transformados en células competentes de *E. coli*.

Las colonias individuales son seleccionadas y confirmadas que contienen el fragmento de PCR amplificado. Las reacciones de secuencia de hilo doble de clones plásmidos son realizadas para confirmar que la secuencia genómica amplificada de PCR contiene el donante integrado. Han ocurrido eventos identificados que contienen el fragmento del donante que representa un objetivo en el cual la reparación conducida por homología de la rotura del hilo doble portada por la ZFN y la integración enviada al objetivo de un ADN donante en un objetivo de un gen específico.

Sonda de hidrólisis/ensayo TaqMan

El análisis TaqMan es conducido para definir el número de copias del donante en eventos putativos que se enviaron al objetivo. La determinación del número de copias por el ensayo de sonda de hidrólisis, el ensayo análogo TAQMAN®, es realizado en el PCR de tiempo real utilizando el sistema 480 de LIGHTCYCLER® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Los

ensayos son diseñados para PAT y AAD-1 y el gen de referencia interna GLP1 y la Invertasa utilizando el Software de Diseño de Sondas LIGHTCYCLER® 2.0. Para la amplificación, la mezcla Maestra de Sondas 480 LIGHTCYCLER® (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) es preparada en una concentración final 1X en un volumen de 10 µL de reacción de multiplexión que contiene 0.435 ciclos a una temperatura de 98°C, 1 minuto, temperatura de 98°C, 10 segundos, temperatura de 65°C, 20 segundos, temperatura de 72°C durante 2.5 minutos seguida por una temperatura de 72°C durante 10 minutos. M de cada cebador y 0.235 ciclos a una temperatura de 98°C, 1 minuto, temperatura de 98°C, 10 segundos, temperatura de 65°C, 20 segundos, temperatura de 72°C durante 2.5 minutos seguida por una temperatura de 72°C durante 10 minutos. M de cada sonda (Tabla 3). Se realiza una reacción de amplificación de dos pasos con una extensión en una temperatura de 58°C durante 38 segundos para PAT/GLP1 y 60°C durante 40 segundos para AAD-1 e Invertasa con adquisición de fluorescencia. Todas las muestras son operadas por triplicado y el valor del umbral del ciclo promediado (Ct) es utilizado para el análisis de cada muestra.

El análisis de los datos de PCR de tiempo real es realizado utilizando el software LIGHTCYCLER® liberación 1.5 utilizando el módulo cuantitativo relativo y se encuentra basado en el método $\Delta\Delta Ct$. Para esto, una muestra del gADN del

calibrador de una sola copia y una revisión de dos copias conocidas son incluidas en cada corrida.

Tabla 3: Información del cebador y sonda para el ensayo de sonda de hidrólisis de *pat* y referencia interna (HMG)

5

Número de Cebador	Secuencia	Detección
TQPATS	SEQ ID NO:27; 5' ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT 3'	
TQPATA	SEQ ID NO:28; 5' CTTTGATGCCTATGTGACACGTAAACAGT 3'	
TQPATFQ	SEQ ID NO:29; 5' CY5- GGTGTTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG-BHQ2 3'	Cy5
ZGP3S	SEQ ID NO:30; 5' CCTGCTCCACTACCAGTACAA 3'	
ZGP3A	SEQ ID NO:31; 5' GTCCAAGAAGGTGACCTTCTC 3'	
TQZGP3	SEQ ID NO:32; 5' FAM- AGATCACCGACTTTGCGCTCTTT-BHQ1 3'	FAM

10

15

Número de Cebador	Secuencia	Detección
GAAD1F	SEQ ID NO:33; 5'	

20

	TGTTTCGGTTCCTCTACCAA 3'	
GAAD1R	SEQ ID NO:34; 5' CAACATCCATCACCTTGACTGA 3'	
GAAD1P	SEQ ID NO:35; 5' FAM- CACAGAACCGTCGCTTCAGCAACA 3'	FAM
IVF-Taq	SEQ ID NO:36; 5' TGGCGGACGACGACTTGT 3'	
INR-Taq	SEQ ID NO:37; 5' AAAGTTTGGAGGCTGCCGT 3'	
IV-Probe	SEQ ID NO:38; 5' HEX CGAGCAGACCGCCGTGTACTTCTACC 3'	HEX

25

Análisis Southern

El análisis Southern es realizado para confirmar el envío al objetivo del ADN del donante en el lugar ELP. Para este análisis, el ADN genómico es digerido con enzimas de digestión apropiadas y probado con un fragmento radioetiquetado específico del lugar (no presente en el donante).

Los callos de maíz (experimentos al objetivo pDAB100640 y pDAB100641) o las plantas de maíz T₀ (experimentos al objetivo pDAB100610 y pDAB100611) son utilizados. Las muestras de tejido son recolectadas en tubos de microfuga de 2 ml y liofilizadas por dos días. La maceración del tejido es realizada en un pulverizador de tejido Kleco y cuentas de tungsteno como se hizo anteriormente. Después de la maceración del tejido, el ADN genómico es aislado utilizando el Mini Equipo de Planta DNeasy (Qiagen, Germantown, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante.

El ADN genómico es cuantificado por medio del equipo de ensayo de ADN Verde Pico Quant-IT (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). Cuatro microgramos de ADN por cada muestra son digeridos utilizando enzimas de restricción apropiadas durante la noche a una temperatura de 37°C. El ADN digerido es purificado utilizando el Quick-Precip (Edge BioSystem, Gaithersburg, MD) de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Después de la electroforesis en un gel de agarosa SeaKem LE al 0.8% (Lonza, Rockland, ME), el

ADN es transferido a membranas cargadas con nylon (Millipore, Bedford, MA) durante la noche y reticulado a la membrana utilizando el enlazador de Estratos UV 1800 (Stratagene, La Jolla, CA). Las manchas son previamente hibridadas con 20 ml
5 de PerfectHyb Plus (Sigma, St. Louis, MO) y probadas con la sonda de radioetiquetado apropiada durante la noche. Las manchas son lavadas y colocadas en las pantallas de imagen de fósforo durante 24 horas y luego analizadas utilizando el scanner Storm 860 (Molecular Dynamics).

10 **Ejemplo 10: Construcción de un vector de transformación de planta intermedio que aceptará las ELPs en los marcadores que se pueden seleccionar y que están posibilitados para la remoción en la planta de los elementos de construcción independientes**

15 Los sitios de enlace de la nucleasa del dedo de zinc diseñados (eZFN) y los elementos ELP pueden ser incorporados, individualmente o juntos, dentro del vector de transformación de la planta de modo que las células de plantas transformadas resultantes, tejidos o plantas tendrán las
20 siguientes propiedades: 1) capacidad para ser transformadas de nuevo con transgenes adicionales de una manera precisa enviada al objetivo dentro de la ELP en el sitio de inserción transgénico original y 2) la capacidad para modificar los lugares transgénicos removiendo los transgenes, particularmente los
25 genes marcadores que se pueden seleccionar de la planta, de

una manera predecible y eficiente. Una serie de vectores fueron
construidos para transformar un rango de especies de plantas.
Esto se logró mediante el uso de un "vector de transformación
de planta intermedio" (que se describe más adelante), un vector
5 para afectar la incorporación del eZFNs de flaqueo de todos
los marcadores seleccionados de las ELPs dentro de los
vectores de la base conocidos como vectores de transformación
primarios.

Un vector de transformación de la planta intermedio fue
10 construido el cual comprendía la estructura de un vector de
transformación binario de *Agrobacterium* con un sitio de
clonación múltiple único (MCS) colocado entre los límites del T-
ADN derecho e izquierdo. Este vector intermedio es
pDAB104132 (figura 10). Los MCS utilizados en el pDAB104132
15 contienen los sitios de enzima de restricción únicos para AgeI,
NotI, FseI, SmaI, XbaI, AseI, PaeI, XhoI, SalI, y NsiI. En este
ejemplo, estos sitios son usados para incorporar elementos
funcionales clave dentro de los vectores de transformación
primarios finales. El sitio NotI único puede ser utilizado para
20 introducir un fragmento NotI portador de un cassette del vector
de destino GATEWAY™, el cual puede entonces ser utilizado
para apilar transgenes múltiples dentro del vector de
transformación utilizando el sistema GATEWAY™ de Invitrogen.
El sitio FseI único puede ser utilizado para introducir las ELPs
25 las cuales tienen sitios FseI en sus terminales. Como se

describió anteriormente en estos ejemplos, cuando están presentes en una planta transgénica, las ELPs pueden ser utilizadas como sitios objetivo para insertar genes adicionales utilizando los eZFNs. Se pueden utilizar otros sitios en los MCS para insertar otros genes de interés, incluyendo genes marcadores que se pueden seleccionar. Utilizando los sitios de restricción únicos descritos anteriormente, los vectores de transformación de la planta intermedios tales como pDAB104132 pueden ser utilizados para juntarlos en un solo vector de transformación de la planta para cualquiera y todas las combinaciones de elementos funcionales incluyendo los cassettes del vector de destino GATEWAY™, las ELPs, los módulos ZFN marcadores que se pueden seleccionar, y cualesquiera otros transgenes que pueden o no hacer posible la remoción del eZFN.

Ejemplo 11: Construcción de los cassettes marcadores que se pueden seleccionar de las plantas con la remoción habilitada que utiliza módulos de nucleasa de dedos de zinc

En este ejemplo, los sitios de enlace de eZFN son utilizados para hacer posible la eliminación en la planta de cualquier transgén, incluyendo los genes marcadores que se pueden seleccionar de una planta transformada. Ver, la Solicitud de Patente Provisional Norteamericana No. 61/297,628, incorporada a la presente descripción como referencia. Esta capacidad es lograda flanqueando los

transgenes con uno o más sitios de enlace de eZFN y luego incorporando estos módulos del gen que se pueden remover dentro de los vectores de transformación de la planta y luego son usados para regenerar las células transgénicas de la planta. La construcción de dichos módulos y vectores puede ser realizada por un experto en la técnica que utiliza técnicas de biología molecular estándar.

El plásmido intermedio portador del módulo del sitio de enlace ZFN es un primer paso útil hacia la construcción de cassettes de genes que se pueden remover. Un módulo de sitio de enlace eZFN es un segmento de ADN que contiene al menos dos sitios de enlace eZFN que flanquean uno o más sitios de enzimas de restricción dentro de las cuales pueden ser clonados los transgenes. Un ejemplo es el módulo ZFN 2:4-MCS-2:4 representado por la SEQ ID: No. 20 de la figura 11. Este módulo contiene un sitio de clonación múltiple (MCS) que consiste de los sitios de restricción *Asel*, *HindIII*, *PacI*, *SbfI*, *SphI* y *Sall* que son flanqueados por pares de sitios de enlace para eZFN2 y eZFN4. También dentro de este módulo ZFN se encuentran dos copias idénticas de una secuencia que consiste de una secuencia aleatoria de 100 bp que flanquea los sitios de enlace eZFN. Adicionalmente, los pares de sitios de enzimas de restricción *SpeI* y *XhoI* flanquean el módulo funcional completo, permitiendo la clonación en un vector de transformación de la planta. El pDAB104126, un plásmido portador de un módulo ZFN

2:4-MCS-2:4 se muestra en la figura 12.

Cuatro genes marcadores de planta diferentes que se pueden seleccionar fueron insertados individualmente en un módulo ZFN 2:4-MCS-2:4 en el pDAB104126 utilizando técnicas de clonación molecular estándar. Un gen marcador que se puede seleccionar fue un gen PAT funcional diseñado para conferir tolerancia de glufosinato en las plantas dicotiledóneas. Este gen PAT comprendía una secuencia de codificación PAT enlazada de manera operable a un promotor de CsVMV (un promotor del extremo 5' de región no traducida derivado del Virus de Mosaico de la Vena Cassava; Verdaguer y asociados (1996) Plant Molecular Biology 31(6): páginas 1129 a 1139) y el UTR del extremo 3' de AtuORF. El cassette del gen PAT fue insertado como un fragmento HindIII-SphI dentro de los sitios HindIII-SphI del módulo ZFN para producir el plásmido pDAB104136 (figura 13).

Un segundo gen marcador que se puede seleccionar fue el gen PAT diseñado para conferir tolerancia al glufosinato en las plantas monocotiledóneas. Este gen PAT comprendía una secuencia de codificación PAT enlazada de manera operable a un promotor OsAct1 y un UTR del extremo 3' ZmLip. Este gen PAT monocotiledóneo fue insertado como un fragmento PacI-SphI dentro de los sitios PacI-SphI del módulo ZFN para producir el plásmido pDAB104138 (figura 14).

Un tercer gen marcador que se puede seleccionar que

comprendía el gen AAD-1 diseñado para conferir tolerancia a la haloxyfop o 2,4-D en plantas monocotiledóneas. Este gen AAD-1 comprendía una secuencia de codificación AAD-1 enlazada de manera operable al promotor ZmUbil y un UTR del extremo 3' ZmLip. Este gen AAD-1 monocotiledóneo fue insertado como un fragmento HindIII-SbfI dentro de los sitios HindIII-SbfI del módulo ZFN para producir un plásmido pDAB104140 (figura 15).

Un cuarto gen marcador que se puede seleccionar que comprende el gen PAT diseñado para conferir tolerancia al glufosinato en las plantas de canola. Este gen PAT comprendía una secuencia de codificación PAT enlazada de manera operable a un promotor CsVMV y un UTR del extremo 3' AtuORF y colocado dentro del gen de transferasa isopentenil interrumpida (ipt). El gen PAT fue insertado como un fragmento de AseI-SalI dentro de los sitios AseI-XhoI del módulo ZFN para producir un plásmido pDAB104142 (figura 16).

De este modo, los pDAB104136, pDAB104138, pDAB104140 y pDAB104142 son plásmidos intermediarios los cuales son portadores de diferentes remociones de ZFN que hicieron posible que los genes marcadores que se pueden seleccionar puedan ser incorporados dentro de los vectores de transformación de la planta. Cuando son incorporados finalmente en un genoma de la planta mediante la transformación, los módulos ZFN marcadores que se pueden seleccionar permiten la remoción subsecuente del gen marcador

que se puede seleccionar. Esto se puede lograr produciendo proteínas eZFN2 o eZFN4 en las células de la planta, ya sea mediante la expresión transitoria o la expresión estable de los genes que la codifican. Por ejemplo, el eZFN2, o
5 alternativamente el eZFN4, pueden ser expresados en las células de las plantas transformadas anteriormente por la expresión transitoria del eZFN de cualquiera de los genes eZFN2 o eZFN4. Las enzimas eZFN reconocerán y enlazarán los sitios de enlace específicos de eZFN y ocasionarán que ocurran
10 las roturas del hilo doble en el genoma en estas posiciones. Las roturas del hilo doble en ambos lados del gen marcador que se puede seleccionar dentro del módulo resultarán en la remoción del gen marcador que se puede seleccionar del ADN del genoma. Posteriormente, la rotura del hilo doble será reparada,
15 ya sea por medio de una unión del extremo no homólogo o por medio de la reparación de un solo hilo homólogo entre las secuencias de 100 bp repetidas que fueron incluidas en el módulo ZFN. Este proceso resultará en la eliminación permanente del gen marcador que se puede seleccionar por su
20 ubicación genómica original.

Ejemplo 12: Ensamble de vectores de transformación primarios de la planta

Un experto en la técnica puede ensamblar los elementos descritos anteriormente en forma de pasos en una combinación
25 para producir vectores de transformación primarios para

utilizarse en diferentes cosechas de plantas. Las ELP1 fueron insertadas en el sitio FseI del pDAB104132 para producir el pDAB104133 (figura 17). Luego, el cassette del vector de destino GATEWAY™ fue insertado dentro del sitio NotI del pDAB104133 para producir el pDAB104134 (figura 18) y el pDAB104135 (figura 19) el cual difiere solamente en su orientación del cassette de Gateway en relación con la secuencia de la ELP. Luego, cuatro módulos ZFN marcadores que se pueden seleccionar descritos anteriormente fueron clonados en pDAB104135 para producir cuatro Vectores de Transformación de la Planta novedosos (PTV). Este ensamble puede ser logrado por un experto en la técnica utilizando métodos de clonación de ADN estándar como se describirá más adelante.

El módulo PAT de ZFN de los dicotiledóneos fue removido del pDAB104136 utilizando el SpeI y clonado en el sitio XbaI de pDAB104135 para producir el pDAB104137 de PTV (figura 20). El pDAB104137 es un vector de transformación de planta binario portador del ELP1 y el ZFN del marcador que se puede seleccionar PAT que se puede remover de dicotiledóneos, y también es un vector de destino GATEWAY™ que permite la clonación de GATEWAY™ para transgenes adicionales.

El módulo PAT de ZFN de monocotiledóneos fue removido del pDAB104138 utilizando el SpeI y clonado en el sitio XbaI del pDAB104135 para producir el pDAB104139 de PTV (figura 21).

El pDAB104139 es un vector de transformación de planta binario portador del ELP1 y el marcador que se puede seleccionar PAT de ZFN de monocotiledóneos que se pueden remover, y también es un vector de destino GATEWAY™.

5 El módulo AAD-1 de ZFN de monocotiledóneos fue removido del pDAB104140 utilizando el SpeI y clonado en el sitio XbaI del pDAB104135 para producir el pDAB104141 de PTV (figura 22). El pDAB104141 es un vector de transformación de planta binario portador del ELP1 y el marcador que se puede
10 seleccionar AAD-1 de ZFN de monocotiledóneos que se pueden remover, y también es un vector de destino Gateway™.

El módulo PAT de ZFN de canola se removió del pDAB104142 utilizando el XhoI y clonado en el sitio XhoI del pDAB104135 para producir el pDAB104143 de PTV (figura 23).
15 El pDAB104143 es un vector de transformación de planta binario portador del ELP1 y el marcador que se puede seleccionar PAT de canola de ZFN que se puede remover, y también es un vector de destino Gateway™.

Estas construcciones pueden ser utilizadas para
20 transformar las plantas de cosecha utilizando métodos de transformación de plantas. Los eventos transgénicos resultantes pueden ser enviados al objetivo posteriormente con nuevos transgenes adicionales. En donde, los nuevos transgenes son enviados al objetivo por medio de una recombinación homóloga
25 para las ELPs. Además, el cassette de expresión del marcador

que se puede seleccionar puede ser removido o eliminado. La ELP resultante que es producida de la remoción del cassette marcador que se puede seleccionar puede ser enviada al objetivo nuevamente con un transgén nuevo, por medio de la
5 recombinación homóloga, utilizando las técnicas descritas anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una planta transgénica o tejido de planta, comprendiendo el método:

proporcionar una molécula de ácido nucleico que
5 comprende al menos dos regiones de una secuencia de ácido nucleico que carece substancialmente de homología de la secuencia con el ADN genómico de una célula de una planta, y al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de envío al objetivo, en donde al menos dos regiones de la secuencia de
10 ácido nucleico que carecen de una homología substancial de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta flanquean al menos un sitio de reconocimiento de endonucleasa de envío al objetivo;

la transformación de la célula de la planta o tejido de la
15 planta que comprende la célula de la planta con la molécula de ácido nucleico, en donde la molécula de ácido nucleico es integrada de manera estable dentro del genoma de la célula de la planta; y

generar el tejido de la planta o regenerar una planta de la
20 célula de la planta transformada con una molécula de ácido nucleico.

2. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico comprende además sitios de restricción no idénticos.

25 3. El método tal y como se describe en la reivindicación

2, caracterizado porque los sitios de restricción no idénticos comprenden extremos de un solo hilo compatibles que permiten la concatemerización de múltiples ELPs.

4. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta no comprenden un marco de lectura abierta.

5. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque al menos una región de la secuencia de ácido nucleico que carece de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta no comprende un marco de lectura abierta.

6. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta son de aproximadamente 50 bp hasta aproximadamente 3 kb.

7. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta son seleccionados de uno o más de los grupos consistentes de las SEQ ID Nos: de la 1 a la 10.

8. El método tal y como se describe en la reivindicación

1, caracterizado porque al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta junto con las endonucleasas de envío al objetivo comprenden las SEQ ID
5 Nos: 15 y 16.

9. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta junto con las
10 endonucleasas de envío al objetivo comprenden las SEQ ID Nos: 15 y 16 incorporadas dentro de los vectores de transformación de la planta, pDAB104137, pDAB104139, pDAB104141, o pDAB104143, utilizados para transformar monocotiledóneos, dicotiledóneos, incluyendo canola.

15 10. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la endonucleasas de envío al objetivo es una nucleasa del dedo de zinc.

11. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico es
20 integrada de manera estable y aleatoria en el genoma de la célula de la planta.

12. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico es integrada de manera estable en uno o más sitios objetivo
25 conocidos en el genoma de la célula de la planta.

13. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico es integrada de manera estable en una región amplificada de un cromosoma o un minicromosoma.

5 14. El tejido de planta transgénica o planta producidos tal y como se describe en el método de la reivindicación 1.

15. La semilla producida por la planta transgénica tal y como se describe en la reivindicación 14.

10 16. Un método para producir una planta transgénica, comprendiendo el método:

proporcionar una célula o tejido aislado del tejido o planta transgénica o planta tal y como se describe en la reivindicación 8;

15 proporcionar al menos una endonucleasa de envío al objetivo o una primera molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una endonucleasa de envío al objetivo, en donde al menos una endonucleasa de envío al objetivo reconoce al menos un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de envío al objetivo introducido en el genoma de la planta transgénica;

20 proporcionar una segunda molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico de interés, y dos secuencias de ácido nucleico adicionales que flanquean la secuencia de ácido nucleico de interés, en donde cada una de las dos secuencias de ácido nucleico adicionales es homóloga

25

con una de las dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico;

introducir (i) al menos una endonucleasa de envío al
5 objetivo o la primera molécula de ácido nucleico; y (ii) la segunda molécula de ácido nucleico en la célula de la planta o tejido, en donde la secuencia de ácido nucleico de interés es integrada de manera estable en el genoma de la célula de la planta; y

10 regenerar la planta de la célula de la planta o tejido transformados por la primera y segunda moléculas de ácido nucleico.

17. La planta transgénica producida por medio del método tal y como se describe en la reivindicación 16.

15 18. La semilla producida por la planta transgénica tal y como se describe en la reivindicación 17.

19. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, caracterizado porque la molécula de ácido nucleico es flanqueada en cada extremo por uno o más sitios de
20 reconocimiento de endonucleasa de envío al objetivo adicionales.

20. El método tal y como se describe en la reivindicación 19, caracterizado porque comprende además introducir en el tejido de la planta o planta una o más endonucleasas de envío
25 al objetivos que reconocen el uno o más sitios de

reconocimiento de endonucleasa de envío al objetivo adicionales, en donde la molécula de ácido nucleico es removida del genoma del tejido de la planta o la planta.

21. El método tal y como se describe en la reivindicación
5 16, caracterizado porque la endonucleasa de envío al objetivo es una nucleasa de dedo de zinc.

RESUMEN

Un método para producir una planta transgénica que incluye proporcionar una molécula de ácido nucleico que comprende al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta, y al menos dos sitios de reconocimiento de la nucleasa del dedo de zinc, en donde al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta flanquean al menos dos sitios de reconocimiento de la nucleasa del dedo de zinc. Una célula de la planta o tejido que tiene una molécula de ácido nucleico integrada de manera estable dentro del genoma de la célula de la planta es transformada. Una planta es regenerada a partir de la célula de la planta. Las plantas transgénicas son producidas por los métodos. Las semillas son producidas por las plantas transgénicas.

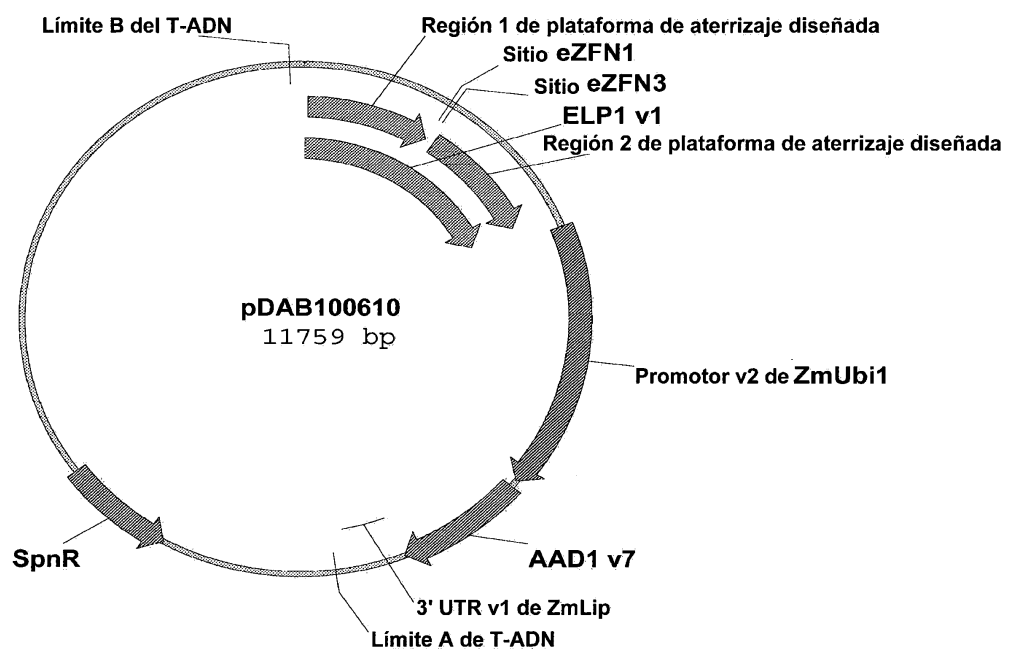


FIG. 1

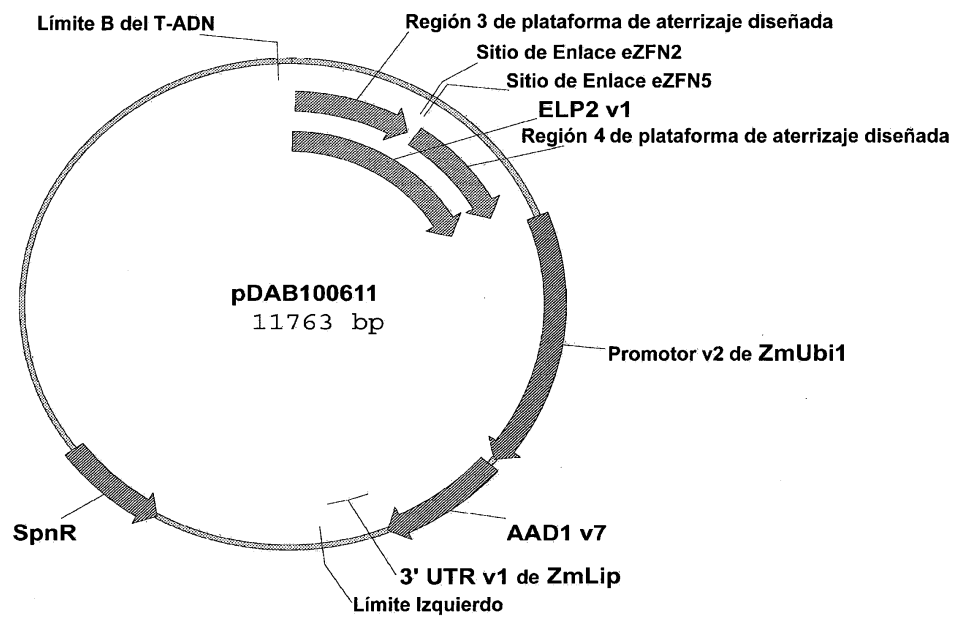


FIG. 2

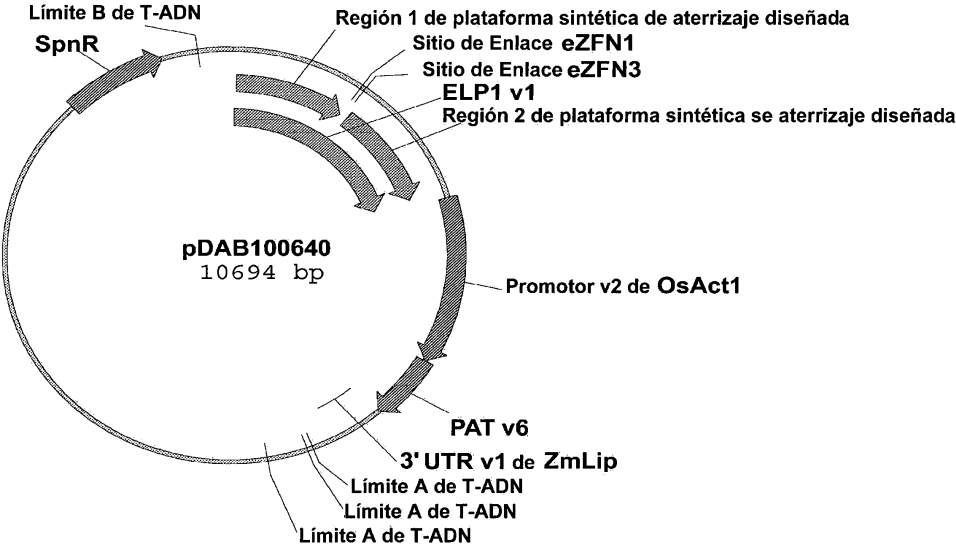


FIG. 3

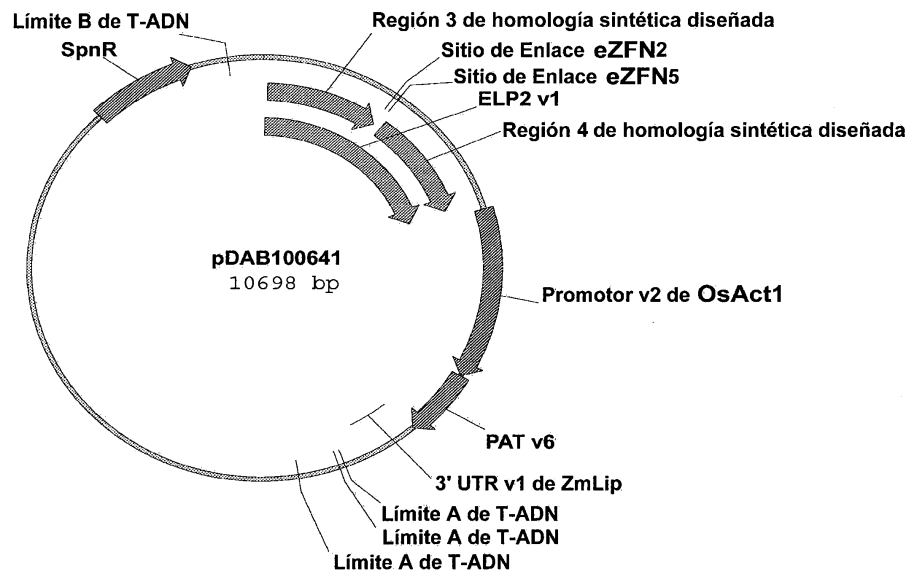


FIG. 4

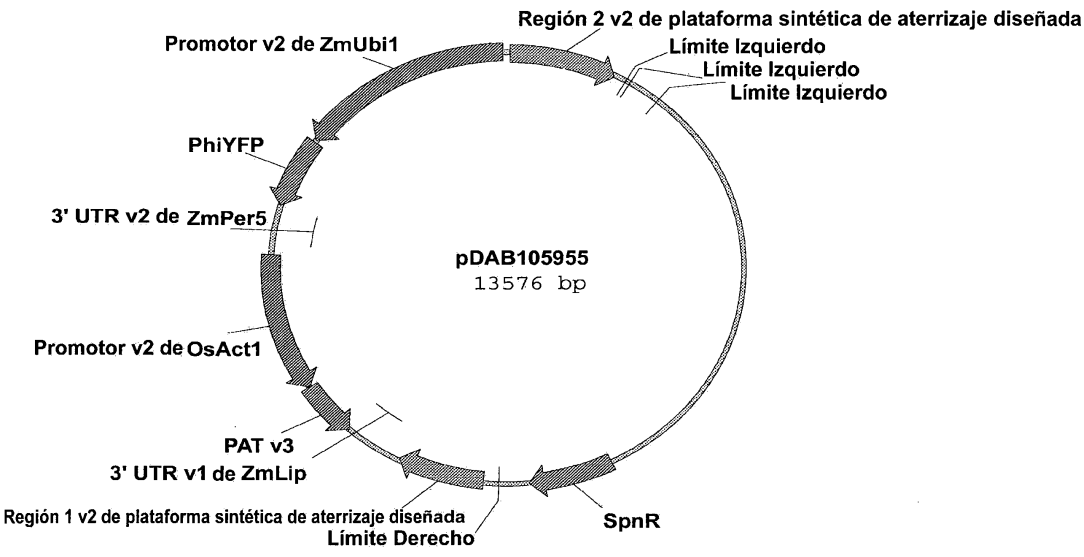


FIG. 5

100

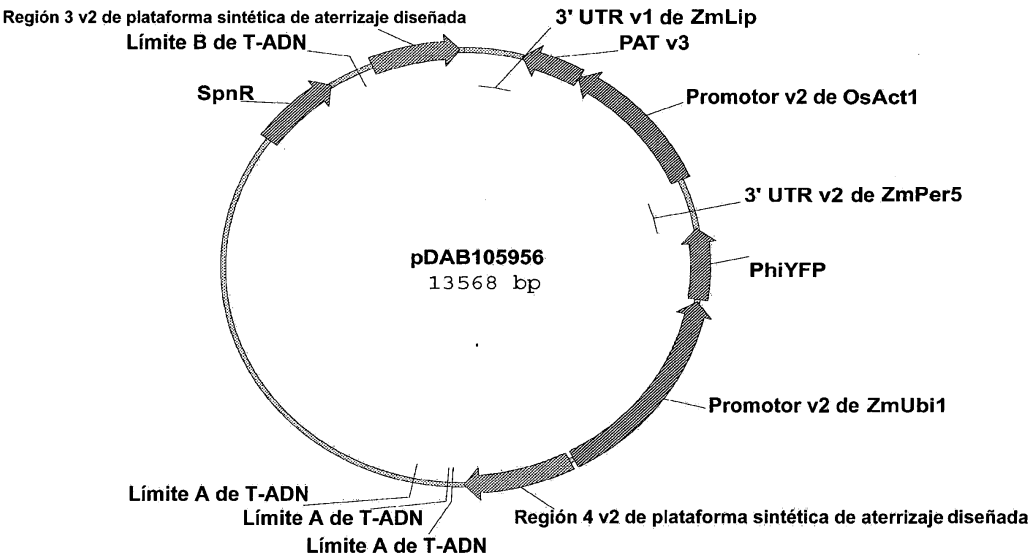


FIG. 6

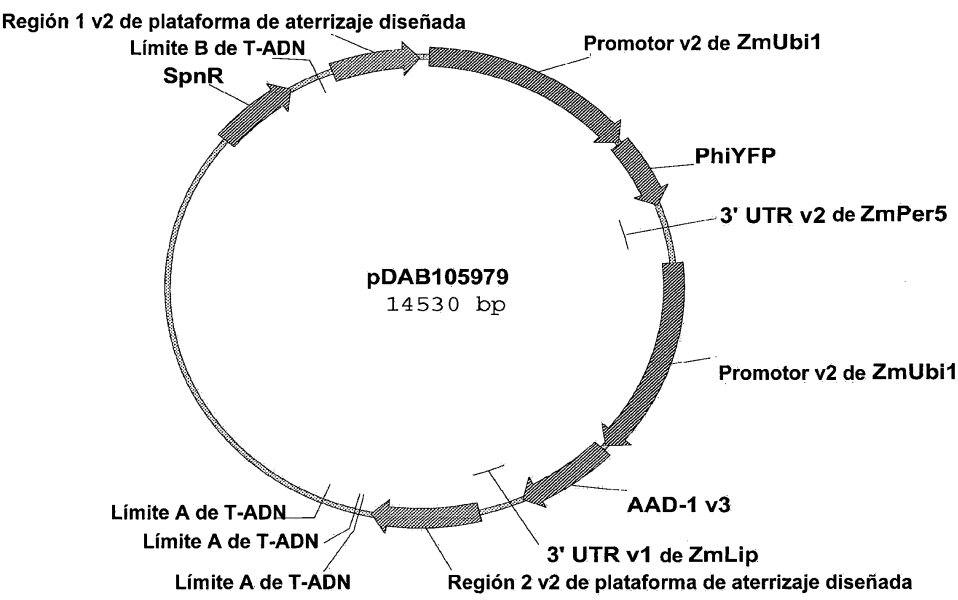


FIG. 7

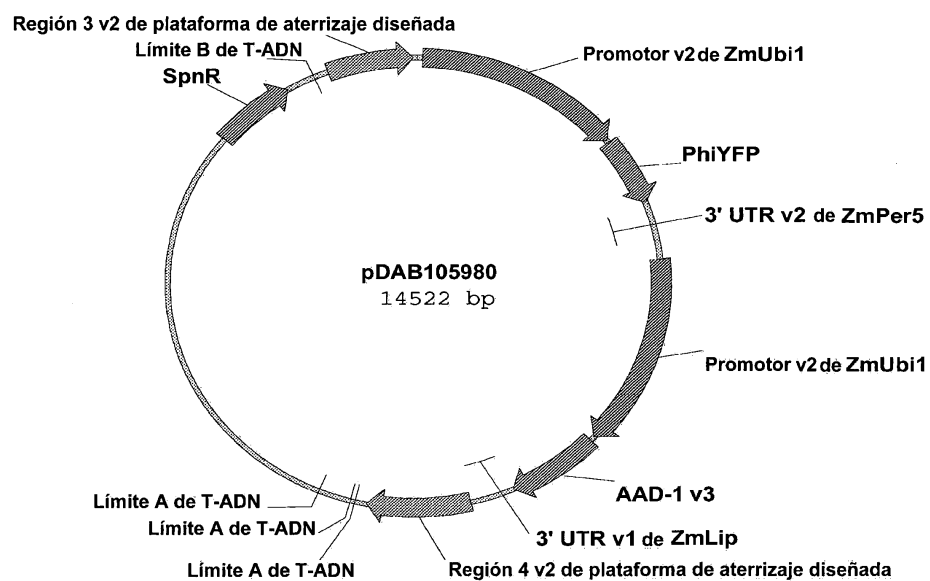


FIG. 8

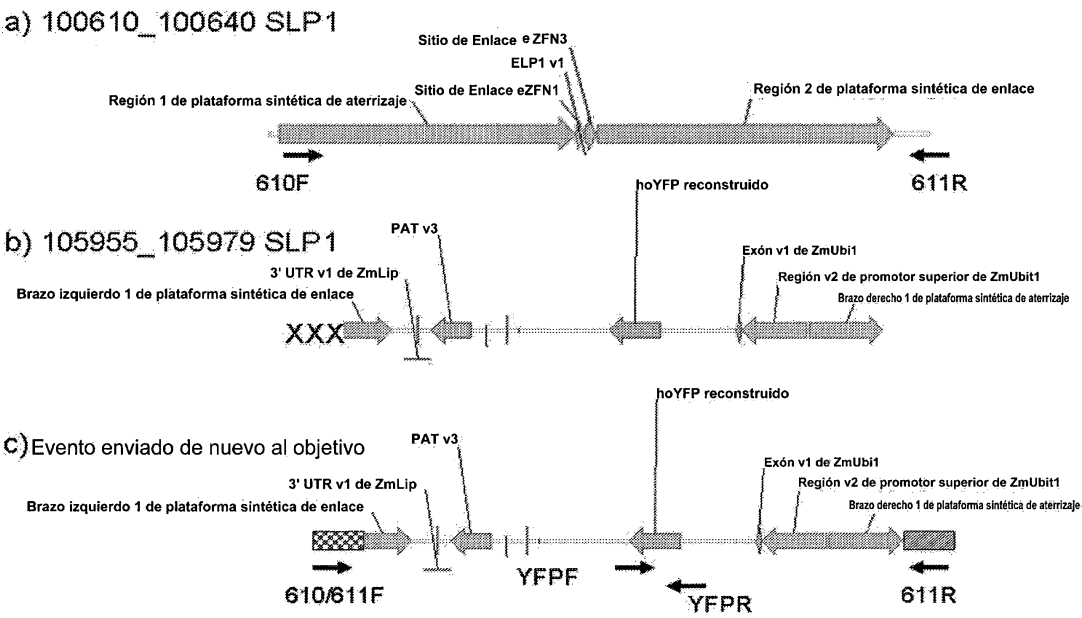


FIG. 9

290

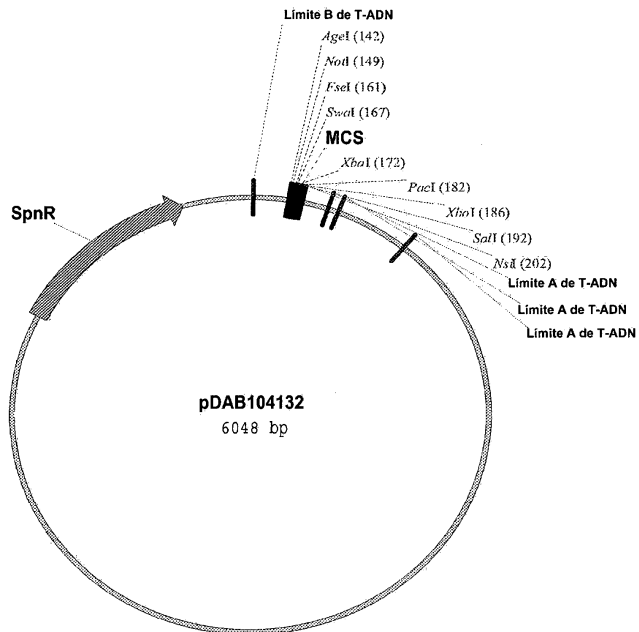


FIG. 10

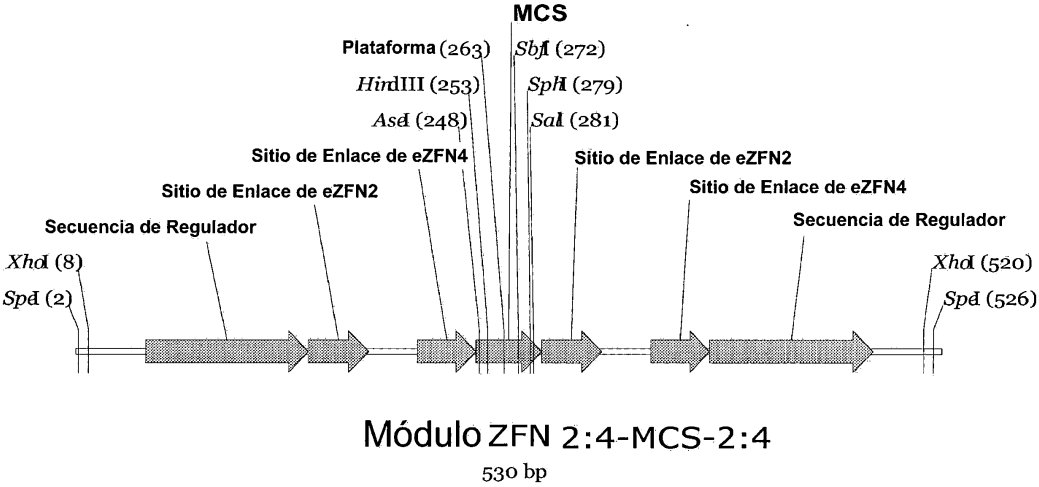


FIG. 11

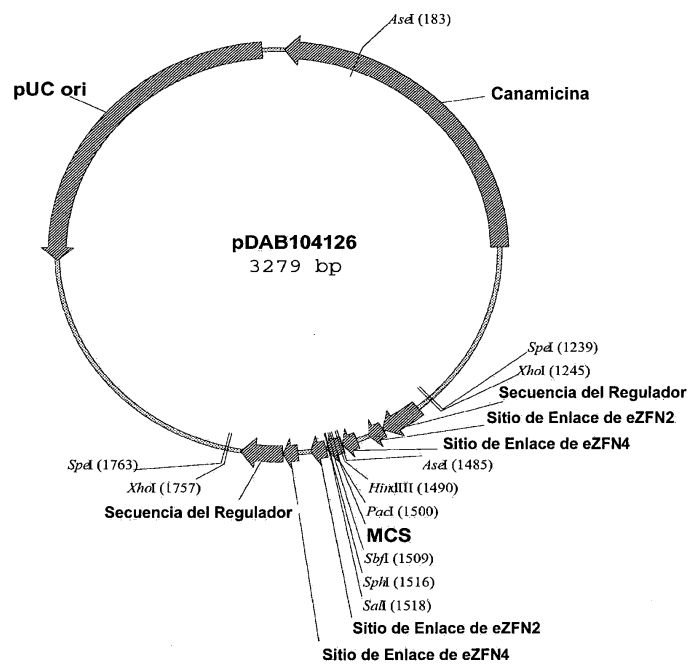


FIG. 12

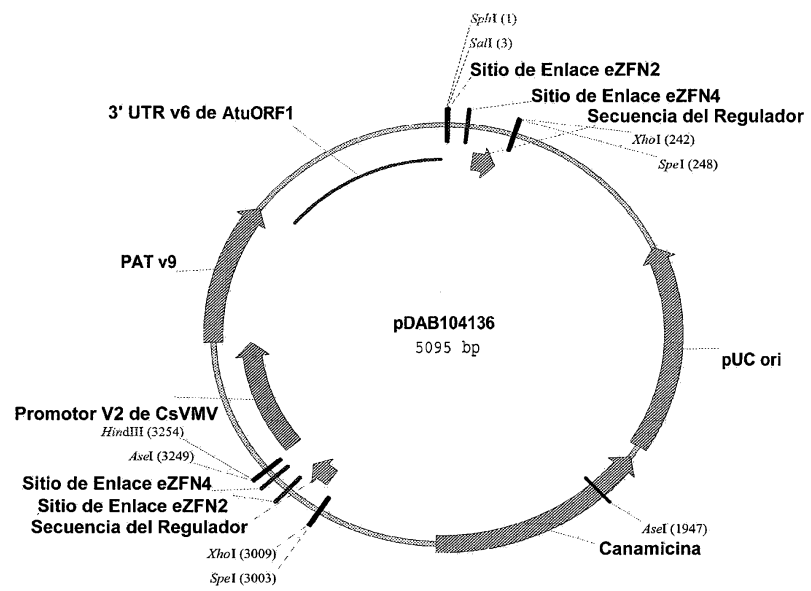


FIG. 13

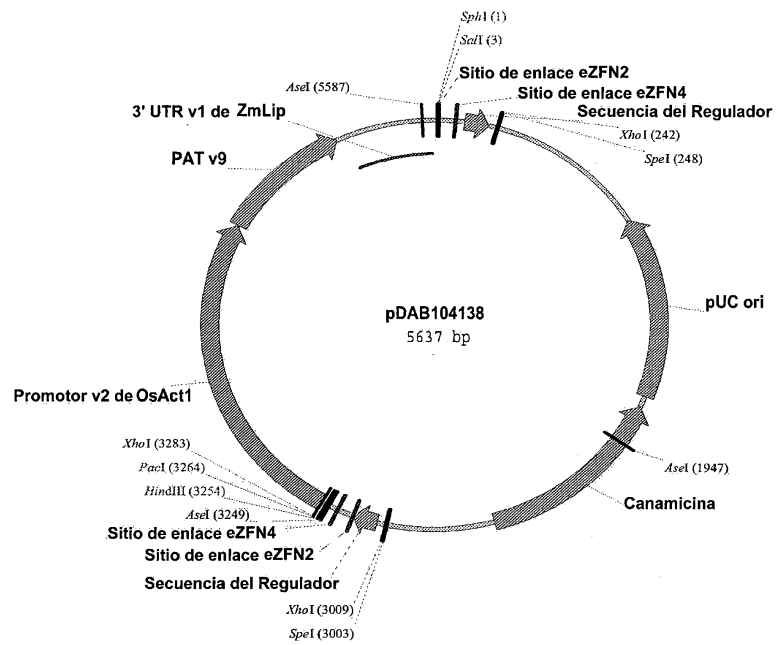


FIG. 14

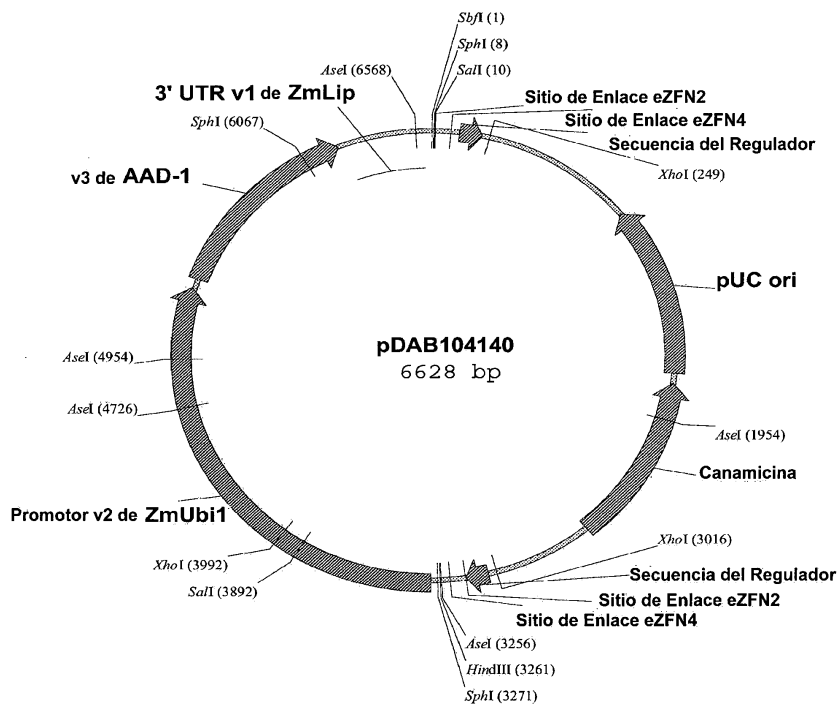


FIG. 15

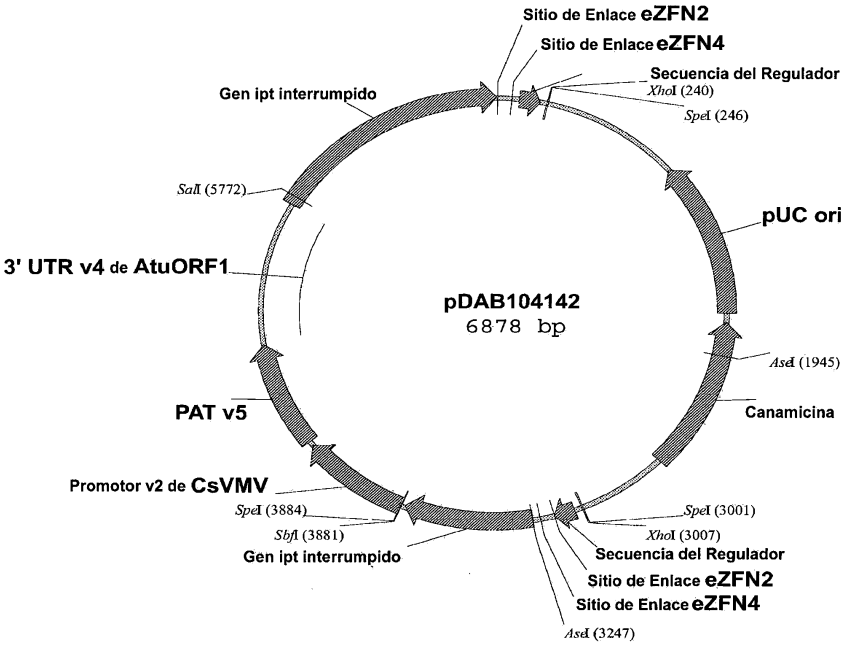


FIG. 16

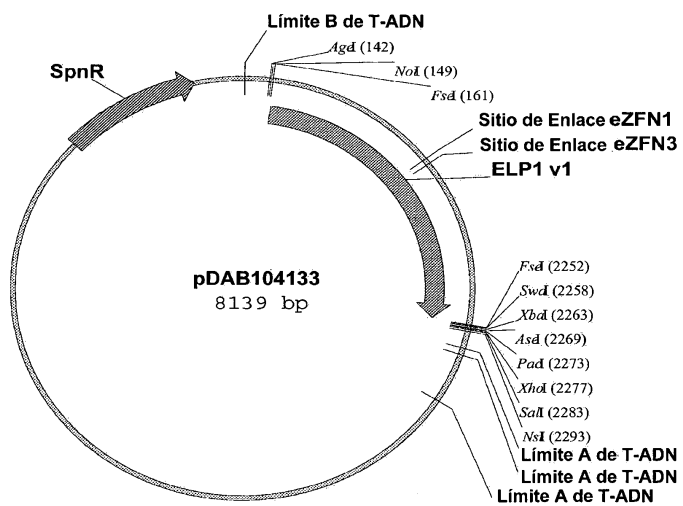


FIG. 17

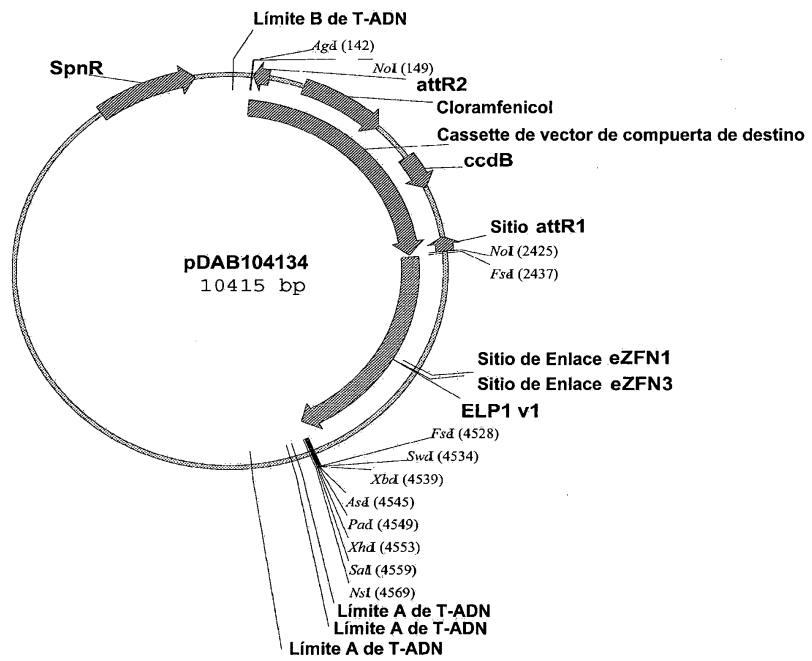


FIG. 18

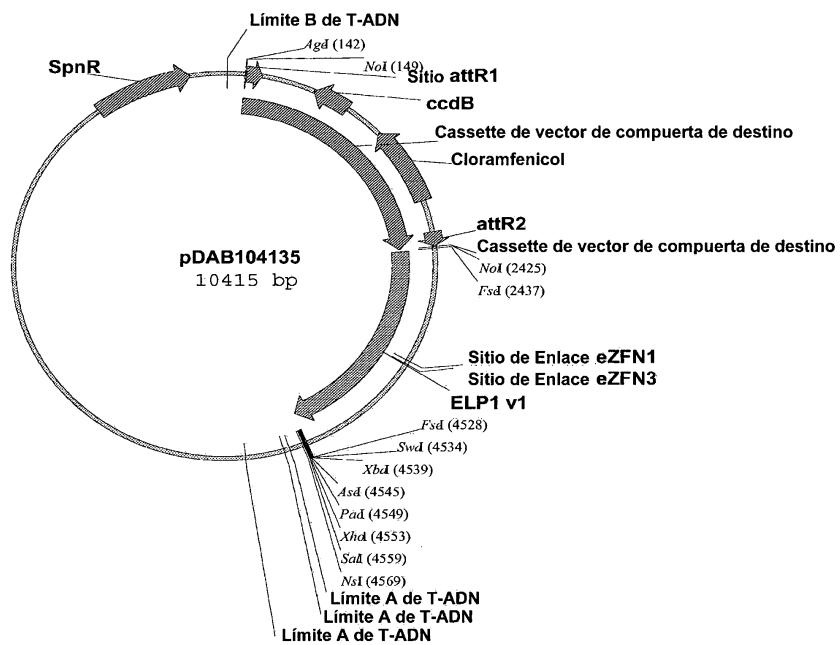


FIG. 19

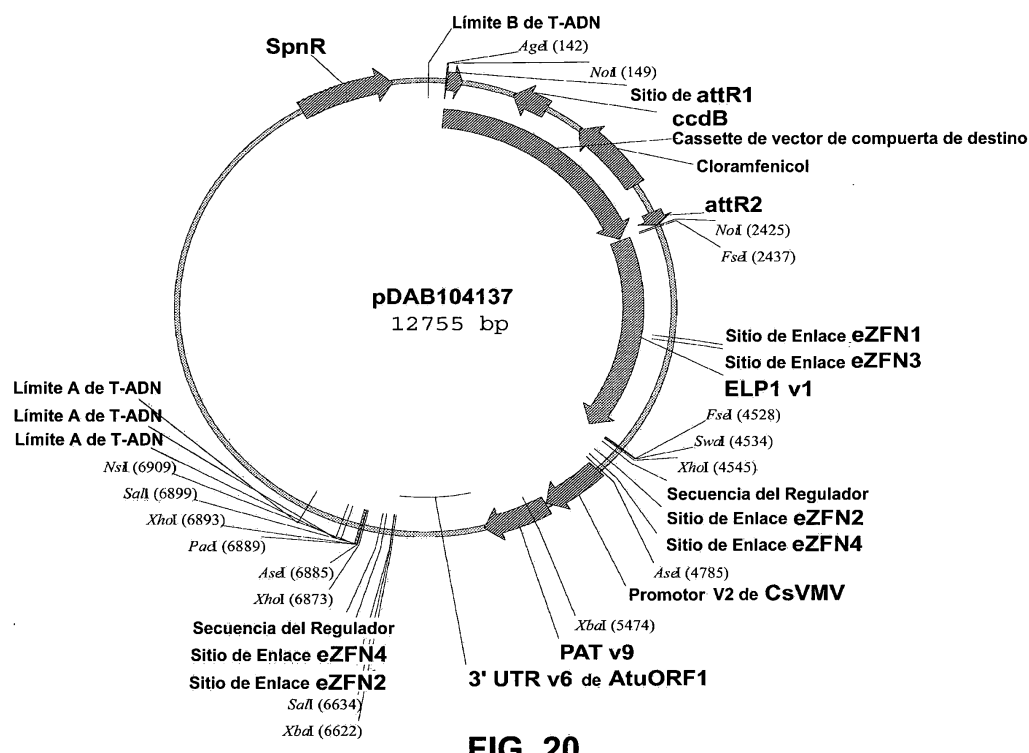


FIG. 20

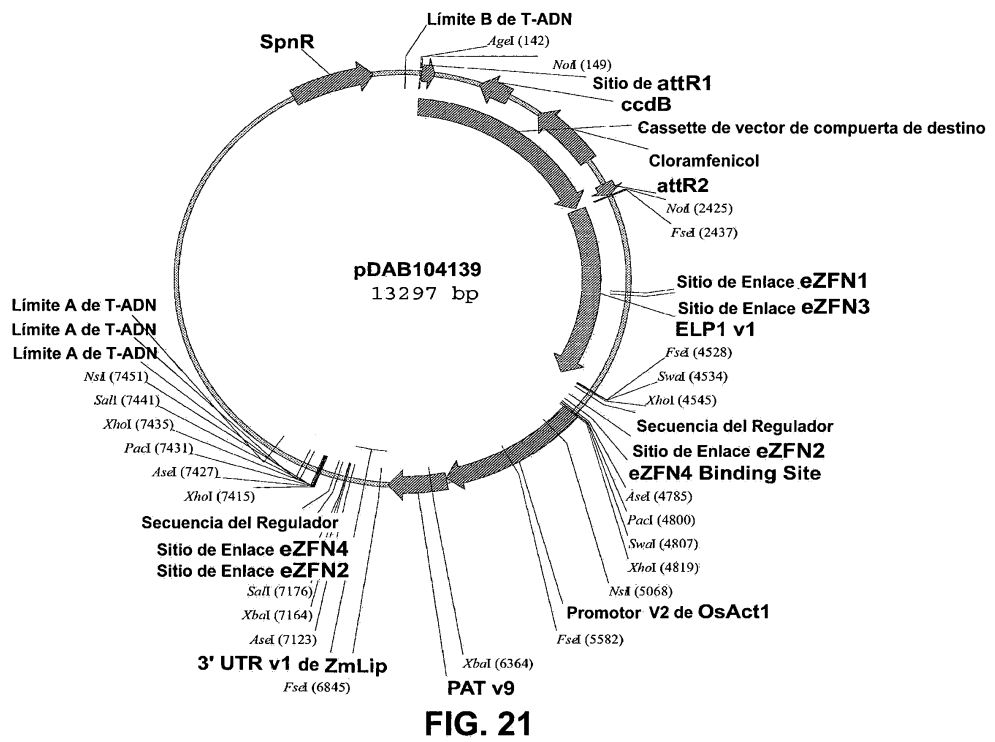


FIG. 21

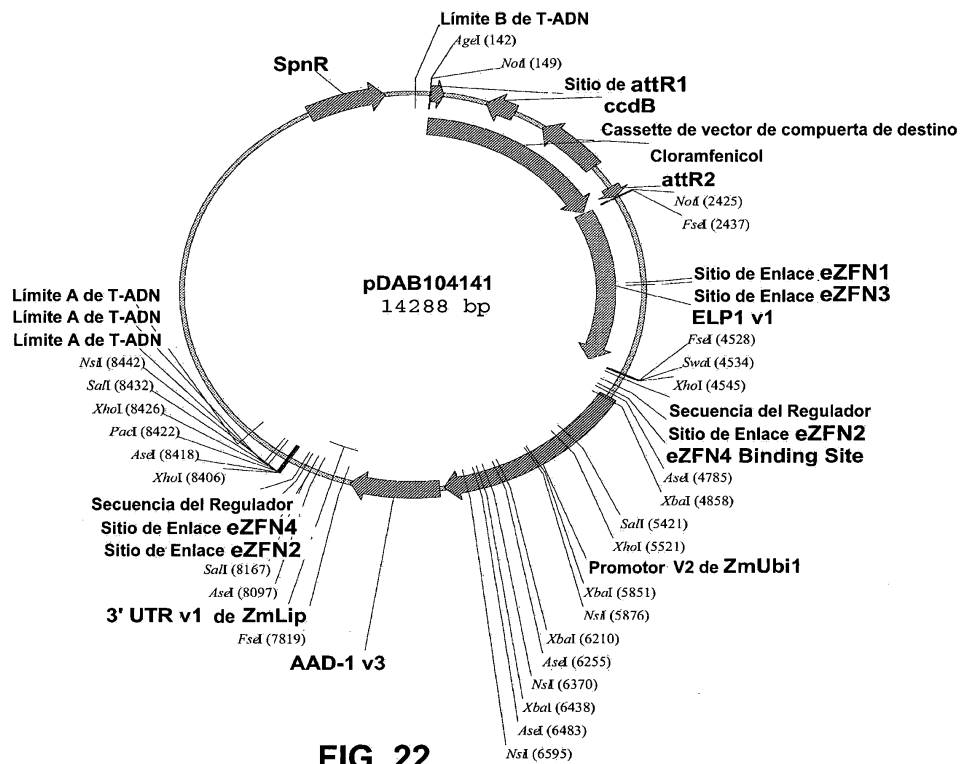


FIG. 22

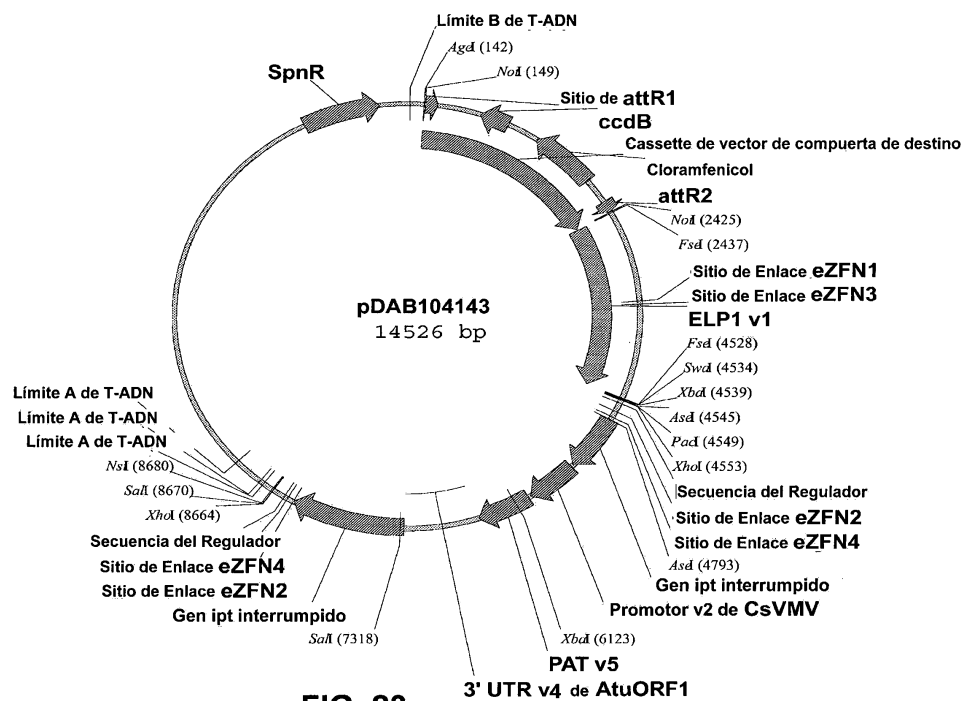


FIG. 23

LISTA DE SECUENCIAS

	<110>	Dow AgroSciences LLC Ainley, William Michael Blue, Ryan C. Murray, Michael G. Corbin, David Richard Miles, Rebecca Ruth Webb, Steven R.	
5	<120>	PLATAFORMAS DE ATERRIZAJE DISEÑADAS PARA EL ENVÍO AL OBJETIVO DEL GEN EN LAS PLANTAS	
	<130>	297I-9880.1PC (69559)	
	<150>	US 61/297,641	
	<151>	2010-01-22	
	<160>	38	
	<170>	PatentIn version 3.4	
10	<210>	1	
	<211>	1000	
	<212>	ADN	
	<213>	Artificial	
	<220>		
	<223>	Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo	
	<400>	1	
		ttcatctttg gacaagggaa taaagactcc ccacttgcta ctaagaacaa tacctaagtt	60
		gcccagacat gactgtaccc attcagagac ctaccacca ttagggctat gacactaaca	120
15		ctagcccctg gaggttgacc atgctaggca gtgggggtct cacctatgac ccactcagat	180
		aggggattgg tccagtgggt gggatctcag cctcatatag gtgtttgtgg tgagctttct	240
		cctagacaag agaaccctga agaacagcaa gaaccagcta atatgatatg tagacatagt	300
		gggttgctca aattttgtgt ttagtcatat tagaattgac ctcagtgacc actcagaaag	360
		tgcccaagcc catctatagg ggccaaagtg ctattgactg gtgtgtctgt gaattgttcc	420
		tccctacaga gttggtgctg atatattccta gcattctttg gaaaacctag ctagggactg	480
20		tcaagtgtaa gatacctcct gaattggagg gaacactagc tgccctgtac cttctggcta	540
		gtaccttaca ccctgaatgg gttagggggt ctattatttg ctggaaatat accagtttca	600
		gtagggctgc tgccttaggt cccacaaggt gtaacatgtg ctcaatagtt gcactaccac	660
		atgcacgtga acttaatgat gttatagcca caacaccaac cttggtttgc agtttgacat	720
		ccctctggaa tgggtgtagt catcttgctc tggatctgcc tgaatcattg gggctgtatg	780
		cagcctgggc ttaaagtgaa gaatgggatg tcccagaaat attttgggtg agaagaatcc	840
		tggagtagat ggtgacctga ctatccctgt cctatgggca caatctatca tcagatattg	900
25		cattcaaagg gctatcatgg gatcaagtcc taagtcaact gttgtttacc tggcagacat	960

	tcacatagga gttctctttt atgccacccc acagtgatcc	1000
	<210> 2	
	<211> 1000	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo	
	<400> 2	
	taaaatatag agtatagggg ttatcatcac agagaagcta ttgctggagg gcctctgtta	60
	tttctctcc atgccactcc catttttaac ctaccaactg aaatcccaag ggagactcca	120
	ccctgtaact agagtcctca gaggtgagcc atcccatatt aacaaatggg cattagggct	180
	aggatgccaa gggatacctg aaatgggaag ttgtggggct gagtcctcct gggaatcaga	240
	gataatatgt aaacagtttg ttgagagatt gatgagagct gactttgaga ggtggccatg	300
10	ctccctggtc ctcaataggg aaggcactac acaagaaacc tgggtttgat caactgcact	360
	gtgtcctact cacacattgt gtgcctggaa aaatgttact tagtatttg agggcctcca	420
	gaacccccct gggtgcaaga ctgggtgcta gtgactgggt gaatgagtct tggacacagt	480
	ggccttgtct aggttgtgtg aggtggctag gcatcatggc aatacctcat aattgatgag	540
	tgaggaaaca agactaagtc cttgactcct cttattacat gacctggtgg atattatgct	600
	ctcaatctgc aagctggaat gagtactggg tgcagatccc ctgggattct ggctacaaag	660
15	gtgaatgata gctagtctgt ttattagtag ccaaaaaagt cagtgagggg tgagtgcctt	720
	gggatgttgt taagttcaca ttgcacactt ggagaccctc tccatccagt aacataccag	780
	agaaaactga ccaagccctc atgggtgtat gggaacaaca aacctcctgg ctacttcaag	840
	ggcacataac accagcaagg agcctgtcat aaccaccatc tcaaacaata gaacttccta	900
	agtgaagcaa tgacttcaa tctacttgaa ggcattggagt ataagccatg ttcctttcag	960
	aggggactgt acttctgtag attactttcc ctcatcacc	1000
20	<210> 3	
	<211> 1000	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo	
	<400> 3	
	tgcactcatg ttcatatcca tcacaccac tgaggcagat attgcagtga gagggttgca	60
	tgtaggggcc tgctacctgg ccatgtaggt tttgggctgg gaaacaagga aaataatcca	120
25	aggtcccacc acacacaaga gcttctaaag gtcattggtg gctggatgag aaggccatta	180

	agaatctgga cctgttagag gaaccagtag cttacaaggg gatgggtccac cctttaatca	240
	tcagcttgac caaccccttt agtattcacc tctggcagac accagctttg ggattcctat	300
	ctaaccattt ggccagtacc tggcactcac accagtggag actacagagc tacatgaatg	360
	ggtcagatcc cactccata gtgcatagct ggccacatga tactttaccc tagatatttg	420
	ccataccgga gagtctgttc cctgggtttcg accgggagtg ggccaccttg tctttggggc	480
5	ctaagctgtg gagtgatggg tctggcacca cctgtgggtc tgatagcaca tgccccctcc	540
	tgcttatcca gtggtctgtt ctcatggata ttcaaggctt gtatagatgg aaaaggatga	600
	gggtgggtgaa ggctgttggg aagtgtgcct atgaagcccc aacaaagaga ttagacagta	660
	cagctgatta cctaactcct tgggatgtct caaacaatatg tttcaaggcc cttttccctt	720
	ggagcatgaa cctggcaata taaagtattt catctaaggg tcttatacaa attacccttt	780
	tacaccatta tggaccctga ggcaagctgt ctggcccact ctagctacct ggcaaatgtc	840
10	cacctgtagc tcataccaat ctttaagctc agagcaaagt tcagaagccc ttcagtgaca	900
	gtggcaatgg ctatccagtg aacctgacct aattagtggc ccattggatt attgaaaact	960
	ggcagtgctg agtccatcac cccaaatact gtccataggg	1000
	<210> 4	
	<211> 1000	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo	
	<400> 4	
	tcagaccacc tcaccaccac aaagccttgc cctgaccacc ttgtaggctg gcctagacaa	60
	tggtcatctt tggtgtcctc ctaccatta gagagagcca cttcatacc agcatccagt	120
	acctgaggaa taatggcctc aatggcatcc acaagtctca ctgggttggc ctgaggagca	180
	gcccattgcct gtgccctagt ttaaagagga gtgatgggtc ttcctgcctc ttgagtggaa	240
20	ccccttgctc catagtgaga atgggaggtg tgggccattc tgacaaagga ttttggacaa	300
	gtccagctat taacacctgg ctagggatta acacagtgat acctggttga aggtgggagg	360
	gcaagtgatc taacaaatct gttttgcaa ggacatcaga aatctgaggt gcctatagag	420
	aacatcccca aggttttagca gaaagaactc tttaggctga ctccctggata atctttccaa	480
	gggtggagcca ttaggcacac aactgggata cttgtcagta gggattaaag acctttataa	540
	gtctcaaggt ctgggtgtta aaggacagag tttattccaa gagggaatag agcaaaggca	600
25	tatatgggag tgtgggactg atccctgacc tctataatgg gagaggacat taggacctaa	660
	gggtgcagaat agtggccttc cttagcctct ggaagtaatg gtgggattcc ccttaacata	720

	ccctcctaaa aactgagaag tgggggaccc tgggggtggga tcaaaagatt agggactggt	780
	gtgtaagggtg aacatgtgct gcaaggatca tcctggctgt ggttgccctca tcagctagag	840
	aaagcccctg ccactaagcc atctgcaatg cctaattctg gaacaaggaa gctgggactg	900
	atccattatt gtcaaaacaa ctggtgaggg tgtgccctaa ggttggtgtt tactgattgt	960
	ggtcttggtt ctagggactt ccagatatgg aaaaaattag	1000
5	<210> 5 <211> 1000 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo	
	<400> 5	
	tgtaccaatg ttgtctccct taactagga atatctggcc agccctcatg tatagggtgtt	60
10	ttagtacact ctggtgagtg cattgctcag tcaactgggtg gaacctgtcc ccccatccta	120
	agggaaccc cttgtaccca atttgaagat aggggttgcta gagcagtgca atgagggtccc	180
	ttgagtaagc agatggcctg ctaggcttca aacctcagac ctgggttttt gtatggcctg	240
	ggatcagttg attatctacc ccatcatcaa taacttgccc ttaatactta aacatagggc	300
	caatcattgt ggggcctcta gggaaactgt ttggctcttg cactgtttct aaaaggggaa	360
	cacatcataa tcagtaggaa acagaaaagc aagagtggag cctaccctag ttgcccagtg	420
15	tgggagcaaa attgatgtaa ggctacatag aacccctata ccctagtagg tttacctgat	480
	cattaggctg gctccccctg tcccatagag cacactcaat ctcatggcca agacttgaag	540
	gttaaaatct catggggctg ctgatcagat tgcccacaaa aggtgttacc tgatacagtc	600
	taactttcta cctgccagca aaaattttga tggaagtatc ctggcaactg taatcctcta	660
	ccacttaaag attctagtat tgattaactt ctctccatac ctaaacagca gaatgtagca	720
	taggttcata ggcttccttt ggagggttcac tatggaactt accactggat gacaaccctc	780
	acctgtgcta ctctccctac cttaggaggac cattgttgac ctagagactt atctgagtgc	840
20	taacccatga cattaacctc tgggggcttc cccatccctg gacatgtggc tggagaaaat	900
	ataggtcaaa aacattgagc acattagggt gccaatggtg aggtctctta agggctctggg	960
	ttacaccaga ttagcagttc ttgacatggg agagtgtgat	1000
	<210> 6 <211> 1000 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220>	

<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa
 de envío al objetivo

	<400> 6	
	tcgtctcacg cttgctgaat ctgatcagac tattaggccc ctcatcttga acatctttgc	60
	catcctttta gcttggttgt cagtggaaac taggggtcaa tggtttagag tccagccaga	120
	tggaggttgg gcacaatgcc cctgcactat ccaccctagc tgtagaagtt atgcttgccc	180
5	aaaggttatg caactgctgt ctgttgggct tgagccaaga gattggtggg aaatcttgcc	240
	agagttggcc agttgtctcc tgtccaccaa catgatccta tatatgggtc cccaccctgg	300
	ttcccaagcc actctttagt gctgaagagg aaacacctca gaagctgagt agtccaagac	360
	tgcttgccac aagtttccac cccttacctg tcctgaaatt aaaggcacca gtgttccggt	420
	tcccttggac tttctacttg tagtgtagca ctgggtggac ctactccctt tctctggga	480
	tcatggcact ttctattaca gtgggtcaca acttgaggca gccctgtagt tgagtatata	540
10	gtggagagca ccagatgatg attttacttg gtgtaggttg tccctggccc ttagctgtgg	600
	tgaccccatc gtcacctccc agttccaact ttccatttcc tgcaatgagt ggtccacatt	660
	gctggctggg ggtggatcta tccctccatt tgggaagaaa cagtgatatg gacactaacc	720
	accataagtg gatggattct tcatagagtg gttgcttttg cccaagtctg tgcagcagag	780
	gtgtcaacct ggtccccaat tagtgaaata atctcacagc ctgggggcta ctcgatttag	840
	gaccagtacc cattccagcc tggcccaaaa ctttagttga gcctagacct tcccacttac	900
	atggactgat tgtggcggtt ccagatgact gttgacttcc tatccatttg gacttttga	960
15	ggggccagaa acctattcct ccagtatagt cctccacatt	1000

<210> 7
<211> 1000
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa
 de envío al objetivo

	<400> 7	
	tgtcacccag aggttccttc tgtacagctg aaaatccatt agtaaagcca tataactccc	60
	accagagggg tggcagtatc ctatctcaat accactgctg ggtgatagct tctcatccct	120
	tattactgag gccaaggct atttgaccaa tagagctggt ctccccact tcatcaacct	180
	tcactattaa ccctgtatct actagccact tgaaaccagt gccattctta aaatgtagga	240
	tggtttttagc catagagaac tggcatagtg gagggagtgt aggggcctct gcctggtggg	300
	aaggaacctt gattcagagc tttaagcctg tagggcctta aaagtacctt gatgacttgg	360
25	gtccctaag tcccttgggc caatgctgat ggatacctct tgggtcccaa aggattccct	420

5 tgaattacat ctgatagga ctccattgga cagcagcaca aaagtctgat ctaaactcac 480
ctgagatagt tactctgcat ccattgctgg ccattacaag tccatcaciaa tgtggaagggt 540
tttggagggt gaacagagcc aaggacagct taatgacttt tcccaaggag ggctaggcac 600
tcacaagtgt tgtttgtaca ccatctggct atggcaaaac ccaaaacact ttatgcctgg 660
tggaagaa gtggccatga tactttgttg atgggcagtt caagaaagag tgggtgatat 720
gaccctcttg ttaggcagag tttcaaggat tacctcctcc agcagatggg accatgttcc 780
ctcaagggtga gtagggccta aatcatgcct ggagttggag tttgtaggggt ctatgagaca 840
ttttcatact gtagaaacat cctattgtag gaggcaagcc acaagtggat tgtttaaagt 900
gggtgtcagtt gaattgaata gaactccatg ttagaggggc cctagtgttg tccctgcatg 960
tatttttagtg ccatccatct agtctataat atcacctagt 1000

10 <210> 8
<211> 1000
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo

15 <400> 8
ttccaccctg acagagttaa tcctagctta cccaaggga gtaacatgca gtggatggca 60
gtagggcaca actctgctgt ttatccacct ttgagtgtct ggcacccatg cataactggc 120
tacatgagag ggtaaatggt ccctggcagc cctgggtggt gcagcctgtc ctggctccaa 180
gttaataccc ctatattggg atctattgga cttgctgggc actgcctgat gggtcaccag 240
ctatgtcaca tgggtgggag tggacacca agtgatacct cctaagttag aggagcaaat 300
tacaatgcca ctttatgggc cactgggtgc atttgaggag cctagtgttg ctttttcttg 360
ggacccattg gtgctgggaa agggattcca cacagtggga ggggtgcctta aactcctcat 420
gtggggggtg gagctggaac taggagtggc tgactacaag cctggcttat tgacatcatt 480
agtggatgaat gggttccaga gcttgacaaa gctgaactgt taggaggacc tgggaccaat 540
20 cagagataat cttctaactg gcattggtgc tattaagtaa accatctcac cagtcagcca 600
aggggttctt tcaactgtcta cttgtgggac cttggccaca ctggtggacc catctattgg 660
tgttcaactg atcctgacat ttctcagctt aacagatgga cctacttggc accacattgg 720
ggggcttctt gacagttaag gtgacacctt agttggctga catgtaaact ccagtgatcc 780
ttgggcactt gtgattccca ccttactgtc cacattgcca ccagtttgct accaaggctt 840
tactgtccca taaggttgtg gcctaacctt tgggctgcaa attaatga atatccatag 900
25 aagatcaaga acctagtcac ttctgtagtg agtatggcag tgataagcag cttgactcct 960

	agatggcagt tgggcttatg gaggatctac tgcctacagt	1000
	<210> 9	
	<211> 1000	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo	
	<400> 9	
	tgcttgactc ttgcatagtg tacttccacc cacacactca aaccttaata taggccatcc	60
	ctgaggcaag aactccagtg gcacttattc tatgatccca aactaggcaa gggactagca	120
	caagccacca gcactggcta accctgaagg caaggatatt acatccagac acctcggacg	180
	tagcacacct cttactgttc taatggactt aatctacgat ctcacgatca tggggggggtc	240
	ttttggagtc ctacaatcct cttagaacaa cctatgggca tatatccatt cttctctcaa	300
10	cctgaggaga ctgggccaca acttccttat agggcattgt gagacctgct atgagggagt	360
	agctggtggg ttggttcctt ggcagtttag tagggccaaa tagcagatac gtcctttcat	420
	ggaagtggga tataggaag agaaatgtag cattggagca tgtaaacta aaaagacttt	480
	ttccagcatc ttgacccaaa agattacagt atttgaacta agtgtggagc accaaaaaac	540
	aaccagtacc tcttacaatt cccactctt tctgctactg tgccttatgc cctgcgttga	600
	aagatattgc cattctgctc actgattatt ttggtcagct ggattggcat gggaaaacaa	660
15	tcagtgtcca cttacagag gccatgtaga tagtcactat attactcagc tcatagacct	720
	gttaatcaag tttatctggt cactagggac tgcaaacaca atgcccatca tccccacgct	780
	agtgtaaacc tcactatttc tgtcaaacc ctgacatcatg ctagaggagc aacactgcct	840
	ggatggtatc agaagaggat cgcccaagcc cccttcact gacttctgga gttgtgaagg	900
	caacagctga taatggaagt cacctccttg accacgctac taaatgctta tcaattcacc	960
	tacccttgga ttcaaggagc acttaccaaa gccagaccc	1000
	<210> 10	
20	<211> 1001	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de ejemplo que flanquea un sitio de enlace de endonucleasa de envío al objetivo	
	<400> 10	
	tttcataggg atatgtgagg actaaccttg gccaaaggag ctggaactgc ttatgtaagg	60
	gccttagtcc aaattgctcc accctctggg aagctaattg tccctccttg ggccttatag	120
25	tgaagcggaa tgggcatacc tagttgtctg ttctgggttg accctgctgg actcctcagt	180

5 tttagttcca ctaccaaaga ccttgagtct acagatgtgt tgctaaatcc tcacaaacct 240
ccaacaattt ttatgccctc tatcttctcc aaagttgctg ctgatccctg cctctttatt 300
aagagccata gcaacaatac ctgaggtgag ggtttcacca ccaccatcta cctggaaaca 360
tcagccctcc tacatcttac cactcccaat agggggctta gccactcttg aggtgggtcat 420
ccttttagcac ctttggttct aggataggct gggcaccctg gcagatgccc actgacagcc 480
ctagaggaac ccaaggggaa acaagccact acatacaact tggcaagcaa gtcaaggcaa 540
ggcttgacta atctatagat caaggttagt accacttaat tggggaagtc cagaaagtga 600
gcactaagta tgagcaaccc tctaatagact cagactaaag ggtgacaagc caagtaaattg 660
ttttctacat tagaggttcc tgggggcttg atttctactt ccttaggatt ccttggtctt 720
agggagaata tgcctctta ggtgtcctag ccaaggacca gtaacaattc ttctggacc 780
tctattttgc tttataccac actcaatcac tttgggattc attccatgcc tcaagagaca 840
ccaagataga gggaaattgg ggaccaagt ggggagcatt tttgtctct ccttgagggc 900
aactctggac agtgaggaac taggaggtg tgatctctat atagatggag tgttgacct 960
aagggtgaaa gctggcacat ccattggttc aagtttgcct t 1001

<210> 11
<211> 1000
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Ejemplo modificado de secuencia que flanquea un sitio de enlace de envío al objetivo de endonucleasa

20 <400> 11
ttcatctttg gacaagggaa taaagactcc ccacttgcta ctaagaacaa tacctaagtt 60
gccagacat gactgtaccc attcagagac ctaccacca ttagggctat gacactaaca 120
ctagcccctg gaggttgacc atgctaggca gtgggggtct cacctatgac ccactcagat 180
aggggtttaa accagtgggt gggatctcag cctcatatag gtgtttgtgg tgagctttct 240
cctagacaag agaaccctga agaacagcaa gaaccagcta atatgatatg tagacatagt 300
gggttgctca aattttgtgt ttagtcatat tagaattgac ctcagtgacc actcagaaag 360
tgcccaagcc catctatagg ggccaaagtg ctattgactg gtgtgtctgt gaattgttcc 420
tccttacaga gttggtgctg atatatccta gcattctttg gaaaacctag ctagggactg 480
tcaagtgtaa gatactcct gaattggagg gaacactagc tgcctgtac cttctggcta 540
gtaccttaca ccctgaatgg gttagggggt ctattatttg ctggaaatat accagtttca 600
gtagggtgc tgccttaggt cccacaaggt gtaacatgtg ctcaatagtt gcactaccac 660
25 atgcacgtga acttaatgat gttatagcca caacaccaac cttggtttgc agtttgacat 720

	ccctctggaa tgggtgtagt catcttgctc tggatctgcc tgaatcattg gggctgtatg	780
	cagcctgggc ttaaagtgaa gaatgggatg tcccagaaat attttgggtg agaagaatcc	840
	tggagtagat ggtgacctga ctatccctgt cctatgggca caatctatca tcagatattg	900
	cattcaaagg gctatcatgg gatcaagtcc taagtcaact gttgtttacc tggcagacat	960
	tcatctagga gttctctttt atgccacccc acagtgatcc	1000
5	<210> 12 <211> 1000 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Ejemplo modificado de secuencia que flanquea un sitio de enlace de envío al objetivo de endonucleasa	
	<400> 12	
10	tgcactcatg ttcatatcca tcacaccac tgaggcagat attgcagtga gagggttgca	60
	tgtaggggtcc tgctacctgg ccatgtaggt tttgggctgg gaaacaagga aaataatcca	120
	aggtcccacc acacacaaga gcttctaaag gtcattggtg gctggatgag aaggccatta	180
	agtttaaaca cctgttagag gaaccagtac cttacaaggg gatgggtccac cttttaatca	240
	tcagcttgac caacccttt agtattcacc tctggcagac accagctttg ggattcctat	300
	ctaaccattt ggccagtacc tggcactcac accagtggag actacagagc tacatgaatg	360
	ggtcagatcc ccactccata gtgcatagct ggccacatga tactttaccc tagatatttg	420
15	ccataaccgga gagtctgttc cctggtttcg accgggagtg ggccaccttg tctttggggc	480
	ctaagctgtg gagtgatggt tctggcacca cctgtgggtc tgatagcaca tgccccctcc	540
	tgcttatcca gtggtctgtt ctcatggata ttcaaggctt gtatagatgg aaaaggatga	600
	ggtgggtgaa ggctgttggg aagtgtgcct atgaagcccc aacaaagaga ttagacagta	660
	cagctgatta cctaactcct tgggatgtct caaacaatg tttcaaggcc cttttccctt	720
	ggagcatgaa cctggcaata taaagtattt catctaaggg tcttatacaa attacccttt	780
20	tacaccatta tggacctga ggcaagctgt ctggcccact ctagctacct ggcaaagtgc	840
	cacctgtagc tcataccaat ctttaagctc agagcaaagt tcagaagccc ttcagtgaca	900
	gtggcaatgg ctatccagtg aacctgacct aattagtggc ccattggatt attgaaaact	960
	ggcagtgtctg agtccatcac cccaatact gtccataggc	1000
25	<210> 13 <211> 1000 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	

	<223>	Ejemplo modificado de secuencia que flanquea un sitio de enlace de envío al objetivo de endonucleasa		
	<400>	13		
		taaaatatag agtatagggg ttatcatcac agagaagcta ttgctggagg gcctctgtta	60	
		tttcctctcc atgccactcc catttttaac ctaccaactg aaatcccaag ggagactcca	120	
		ccctgtaact agagtcctca gaggtgagcc atcccatatt aacaaatggg cattagggct	180	
5		aggatgccaa gggatacctg aaatgggaag ttgtggggct gagtctcctt gggaatcaga	240	
		gataatatgt aaacagtttg ttgagagatt gatgagagct gactttgaga ggtggccatg	300	
		ctccctggtc ctcaataggg aaggcactac acaagaaacc tgggtttgat caactgcact	360	
		gtgtcctact cacacattgt gtgcctggaa aaatgttact tagtatttgg agggcctcca	420	
		gaacccccct ggggtgcaaga ctgggtgcta gtgactgggt gaatgagtct tggacacagt	480	
		ggccttgtct aggttgtgtg aggtggctag gcatcatggc aatacctcat aattgatgag	540	
10		tgaggaaaca agactaagtc cttgactcct cttattacat gacctggtgg atattatgtt	600	
		taaactctgc aagctggaat gagtactggg tgcagatccc ctgggattct ggctacaaag	660	
		gtgaatgata gctagtctgt ttattagtag ccaaaaaagt cagtgagggg tgagtgcctt	720	
		gggatgttgt taagttcaca ttgcacactt ggagaccctc tccatccagt aacataccag	780	
		agaaaactga ccaagccctc atgggtgtat gggaacaaca aacctcctgg ctacttcaag	840	
		ggcacataac accagcaagg agcctgtcat aaccaccatc tcaaacaata gaacttccta	900	
		agtgaagcaa tgacttcaaa tctacttgaa ggcattggagt ataagccatg ttcctttcag	960	
15		aggggactgt acttctgtag attactttcc ctcattaacc	1000	
	<210>	14		
	<211>	1000		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
	<220>			
	<223>	Ejemplo modificado de secuencia que flanquea un sitio de enlace de envío al objetivo de endonucleasa		
20	<400>	14		
		tcagaccacc tcaccaccac aaagccttgc cctgaccacc ttgtaggctg gcctagacaa	60	
		tggtcatctt tggtgtcctc ctaccatta gagagagcca cttcatacc agcatccagt	120	
		acctgaggaa taatggcctc aatggcatcc acaagtctca ctgggttggc ctgaggagca	180	
		gcccattgcct gtgccctagt ttaaagagga gtgatgggtgc ttctgcctc ttgagtggaa	240	
		ccccttgttc catagtgaga atgggaggtg tgggccattc tgacaaagga ttttggacaa	300	
		gtccagctat taacacctgg ctagggatta acacagtgat acctggttga aggtgggagg	360	
25		gcaagtgatc taacaaatct gttttgcaaa ggacatcaga aatctgaggt gcctatagag	420	

5 aacatcccca aggttttagca gaaagaactc tttaggctga ctccctggata atcttttcaa 480
ggtggagcca ttaggcacac aactgggata cttgtcagta gggattaaag acctttataa 540
gtctcaaggg tttaaactta aaggacagag tttattccaa gagggaaatag agcaaaggca 600
tatatgggag tgtgggactg atccctgacc tctataatgg gagaggacat taggacctaa 660
ggtgcagaat agtggccttc cttagcctct ggaagtaatg gtgggattcc ccttaacata 720
ccctcctaaa aactgagaag tgggggacct tggggtggga tcaaaagatt agggactggt 780
gtgtaagggtg aacatgtgct gcaaggatca tcctggctgt ggttgacctca tcagctagag 840
aaagccccctg ccactaagcc atctgcaatg cctaattctg gaacaaggaa gctgggactg 900
atccattatt gtcaaaacaa ctggtgaggg tgtgccctaa ggttggtgtt tactgattgt 960
ggtcttgggt ctagggactt ccagatatgg aaaaaattag 1000

10 <210> 15
<211> 2099
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plataforma de aterrizaje diseñada de ejemplo

15 <400> 15
ggccggcccg atccttcac tttggacaag ggaataaaga ctccccactt gctactaaga 60
acaataccta agttgccag acatgactgt acccattcag agacctacca ccattaggg 120
ctatgacact aacactagcc cctggagggt gaccatgcta ggcagtggg gtctcaccta 180
tgaccactc agataggggt ttaaaccagt ggggtggatc tcagcctcat atagggtgtt 240
gtggtgagct ttctcctaga caagagaacc ctgaagaaca gcaagaacca gctaatatga 300
tatgtagaca tagtgggtg ctcaaatttt gtgttttagtc atattagaat tgacctcagt 360
gaccactcag aaagtgccca agcccatcta taggggccaa agtgctattg actggtgtgt 420
ctgtgaattg ttctcccta cagagttggt gctgatatat cctagcattc tttggaaaac 480
ctagctaggg actgtcaagt gtaagatacc tcctgaattg gagggaacac tagctgccct 540
gtaccttctg gctagtacct tacaccctga atgggttagg gggcttatta tttgctggaa 600
20 atataccagt ttcagtaggg ctgctgcctt aggtcccaca aggtgtaaca tgtgtcaat 660
agttgcacta ccacatgcac gtgaacttaa tgatgttata gccacaacac caaccttgg 720
ttgcagtttg acatccctct ggaatgggtg tagtcattct gctctggatc tgcctgaatc 780
attggggctg tatgcagcct gggcttaaag tgaagaatgg gatgtcccag aaatattttg 840
ggtgagaaga atcctggagt agatggtgac ctgactatcc ctgtcctatg ggcacaatct 900
atcatcagat attgcattca aagggtatc atgggatcaa gtcctaagtc aactgttgtt 960
25 tacctggcag acattcatct aggagttctc ttttatgcc cccacagtg atccgccttt 1020

	tgcagtttat ccactagga caggattgcc accccacagt ggggcctcta tgccggggac	1080
	aagtgtaaaa tatagagtat aggggttata atcacagaga agctattgct ggagggcctc	1140
	tgttatttcc tctccatgcc actcccattt ttaacctacc aactgaaatc ccaagggaga	1200
	ctccaccctg taactagagt cctcagaggt gagccatccc atattaacaa atgggcatta	1260
	gggctaggat gccaagggat acctgaaatg ggaagttgtg gggctgagtc ctcctgggaa	1320
5	tcagagataa tatgtaaaca gtttgttgag agattgatga gagctgactt tgagagggtg	1380
	ccatgtctcc tggtcctcaa tagggaaggc actacacaag aaacctgggt ttgatcaact	1440
	gcactgtgtc ctactcacac attgtgtgcc tggaaaaatg ttacttagta tttggagggc	1500
	ctccagaacc cccctgggtg caagactggg tgctagtgc tgggtgaatg agtcttgga	1560
	acagtggcct tgtctagggt gtgtgaggtg gctaggcatc atggcaatac ctcataattg	1620
	atgagtgagg aaacaagact aagtccttga ctcctcttat tacatgacct ggtggatatt	1680
10	atgtttaaac tctgcaagct ggaatgagta ctgggtgcag atccctggg attctggcta	1740
	caaagggtgaa tgatagctag tctgtttatt agtagccaaa aaagtcagtg aggggtgagt	1800
	gccctgggat gttgttaagt tcacattgca cacttggaaga cctctccat ccagtaacat	1860
	accagagaaa actgaccaag cctcatggg tgtatgggaa caacaaacct cctggctact	1920
	tcaagggcac ataacaccag caaggagcct gtcataacca ccatctcaa caatagaact	1980
	tcctaagtga agcaatgact tcaaatctac ttgaaggcat ggagtataag ccatgttctc	2040
15	ttcagagggg actgtacttc tgtagattac tttccctcat taaccagatc tggccggcc	2099
	<210> 16	
	<211> 2103	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Plataforma de aterrizaje diseñada de ejemplo	
	<400> 16	
	ggccggccgg atcctgcact catgttcata tccatcacac ccactgaggc agatattgca	60
20	gtgagagggg tgcattgtag gtctgtctac ctggccatgt aggttttggg ctgggaaaca	120
	aggaaaataa tccaagggtc caccacacac aagagcttct aaagggtcatg gtgtgctgga	180
	tgagaaggcc attaatggtt aacacctgtt agaggaaacca gtaccttaca aggggatggt	240
	ccacccttta atcatcagct tgaccaaccc ctttagtatt cacctctggc agacaccagc	300
	tttgggattc ctatctaacc atttggccag tacctggcac tcacaccagt ggagactaca	360
	gagctacatg aatgggtcag atccccactc catagtgcac agctggccac atgatacttt	420
25	accctagata tttgccatac cggagagtct gttccctggg ttcgaccggg agtgggccac	480

cttgtctttg gggcctaagc tgtggagtga tggttctggc accacctgtg ggtctgatag 540
cacatgcccc ctctgctta tccagtggtc tgttctcatg gatattcaag gcttgtatag 600
atggaaaagg atgaggtggg tgaaggctgt tgggaagtgt gcctatgaag ccccaacaaa 660
gagattagac agtacagctg attacctaac tccttgggat gtctcaaaca aatgtttcaa 720
ggcccttttc ccttggagca tgaacctggc aatataaagt atttcatcta agggctttat 780
5 acaaattacc cttttacacc attatggacc ctgaggcaag ctgtctggcc cactctagct 840
acctggcaaa tgtccacctg tagctcatc caatctttaa gctcagagca aagttcagaa 900
gcccttcagt gacagtggca atggctatcc agtgaacctg acccaattag tggcccattg 960
gattattgaa aactggcagt gctgagtcca tcaccccaaa tactgtccat aggcaagact 1020
cccgccatc tctctatgcc cgggacaagt ggagtccatg ctcaacaccg tgcactaggg 1080
acaggattgt cagaccacct caccaccaca aagccttgcc ctgaccacct tgtaggctgg 1140
10 cctagacaat ggtcatcttt ggtgtcctcc taccattag agagagccac tttcatacca 1200
gcatccagta cctgaggaat aatggcctca atggcatcca caagtctcac tgggttggcc 1260
tgaggagcag cccatgcctg tgccctagtt taaagaggag tgatggtgct tcctgcctct 1320
tgagtggaac cccttgttcc atagtgagaa tgggaggtgt gggccattct gacaaaggat 1380
tttgacaag tccagctatt aacacctggc tagggattaa cacagtgata cctggttgaa 1440
gggtggagggg caagtgatct aacaaatctg ttttgcaaag gacatcagaa atctgaggtg 1500
15 cctatagaga acatcccaa ggtttagcag aaagaactct ttaggctgac tcctggataa 1560
tctttccaag gtggagccat taggcacaca actgggatac ttgtcagtag ggattaaaga 1620
cctttataag tctcaagggg ttaaacttaa aggacagagt ttattccaag agggaataga 1680
gcaaaggcat atatgggagt gtgggactga tccctgacct ctataatggg agaggacatt 1740
aggacctaag gtgcagaata gtggccttcc ttagcctctg gaagtaatgg tgggattccc 1800
cttaacatac cctcctaaaa actgagaagt gggggaccct ggggtgggat caaaagatta 1860
gggactggtg tgtaagggtga acatgtgctg caaggatcat cctggctgtg gttgcctcat 1920
20 cagctagaga aagcccctgc cactaagcca tctgcaatgc ctaatcttgg aacaaggaag 1980
ctgggactga tccattattg tcaaaacaac tggtgagggg gtgccctaag gttggtgttt 2040
actgattgtg gtcttgggtc tagggacttc cagatatgga aaaaattaga gatctggccg 2100
gcc 2103

25 <210> 17
<211> 990
<212> ADN
<213> Artificial
<220>

	<223>	Ejemplo modificado de secuencia que flanquea un sitio de enlace de envío al objetivo de endonucleasa		
	<400>	17		
		tgtaccaatg ttgtctccct taactagggga atatctggcc agccctcatg tataggtggt	60	
		ttagtacact ctggtgagtg cattgctcag tcaactgggtg gaacctgtcc ccccatccta	120	
		agggcaaccc cttgtaccca atttgaagat aggggttgcta gagcagtgca atgaggtccc	180	
5		ttgagtaagc agatggcctg ctaggcttca aacctcagac ctgggttttt gtatggcctg	240	
		ggatcagttg attatctacc ccatcatcaa taacttggcc ttaataactta aacatagggc	300	
		caatcattgt ggggcctcta gggaaactgt ttggctctgg cactgtttct aaaaggggaa	360	
		cacatcataa tcagtaggaa acagaaaagc aagagtggag cctaccctag ttgcccagtg	420	
		tgggagcaaa attgatgtaa ggctacatag aaccctata ccctagtagg gtttaaacct	480	
		gatcattagg ctggctcccc ctgtcccata gagcacactc aatctcatgg ccaagacttg	540	
10		aagggttaaaa tctcatgggg ctgctgatca gattgcccac aaaaggtggt acctgataca	600	
		gtctaacttc ttacctgcca gcaaaaattt tgatggaagt atcctggcaa ctgtaatcct	660	
		ctaccactta aagattctag tattgattaa cttctctcca tacctaaaca gcagaatgta	720	
		gcatagggtc ataggcttcc tttggagggt cactatggaa cttaccactg gatgacaacc	780	
		ctcacctgtg ctactctccc taccttgag gaccattgtt gacctagaga cttatctgag	840	
		tgctaacca tgacattaac ctctgggggc tccccatcc ctggacatgt ggctggagaa	900	
15		aatataggtc aaaaacattg agcacattag gtcgactgcc aatggtgagg ctctctaagg	960	
		gtctgggtta caccagatta gcagttcttg	990	
	<210>	18		
	<211>	1022		
	<212>	ADN		
	<213>	Artificial		
	<220>			
	<223>	Ejemplo modificado de secuencia que flanquea un sitio de enlace de envío al objetivo de endonucleasa		
20	<400>	18		
		catgggagag tgtgattcgt ctcacgcttg ctgaatctcg agtcagacta ttaggccctt	60	
		catcttgaac atctttgcca tccttttagc ttggttgta gtggaaacta gggccaatg	120	
		gtttagagtc cagccagatg gaggttgggc acaatgcccc tgcactatcc accctagctg	180	
		tagaagttat gcttgccaa aggttatgca actgctgtct gttgggcttg agccaagaga	240	
		ttggtgggaa atcttgccag agttggccag ttgtctcctg tccaccaaca tgatcctata	300	
		tatgggtccc caccctgggt cccaagccac tcttgtaggc tgaagaggaa acacctcaga	360	
25		agctgagtag tccaagactg cttgcaccaa gttccaccc cttacctgtc ctgaaattaa	420	

	aggcaccagt gttccggttc ccttggactt tctacttgta gtgtagcact gggtaggacct	480
	actcccgttt aaactcctgg gatcatggca ctttctatta cagtgggtca caacttgagg	540
	cagccctgta gttgagtata tagtggagag caccagatga tgattttact tgggtgtaggt	600
	tgtccctggc ccttagctgt ggtgaccca ttgtcatcct ccagttccaa ctttccattt	660
	cctgcaatga gtggccaca ttgctggctg ggggtggatc tatccctcca tttgggaaga	720
5	aacagtgata tggacactaa ccaccataag tggatggatt cttcatagag tggttgcttt	780
	tgcccaagtc tgtgcagcag aggtgtcaac ctggtcccca attagtgaat taatctcaca	840
	gcctgggggc tactcgtatt aggaccagta cccattccag cctggcccaa aacttttagtt	900
	gagcctagac cttcccactt acatggactg attgtggcgg ttccagatga ctgttgactt	960
	cctatccatt tggacttttg gaggggccag aaacctattc ctccagtata gtctccaca	1020
	tt	1022
10	<210> 19 <211> 2082 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Plataforma de aterrizaje diseñada de ejemplo <400> 19	
	tgtaccaatg ttgtctccct taactagggg atatctggcc agccctcatg tatagggtgtt	60
	ttagtacact ctggtgagtg cattgctcag tcaactggtg gaacctgtcc cccatcccta	120
15	agggcaaccc cttgtacca atttgaagat agggttgcta gagcagtga atgagggtccc	180
	ttgagtaagc agatggcctg ctaggcttca aacctcagac ctggtttttt gtatggcctg	240
	ggatcagttg attatctacc ccatcatcaa taacttgccc ttaatactta aacatagggc	300
	caatcattgt ggggcctcta gggaaactgt ttggtcctgg cactgtttct aaaaggggaa	360
	cacatcataa tcagtaggaa acagaaaagc aagagtggag cctaccctag ttgcccagtg	420
	tgggagcaaa attgatgtaa ggctacatag aacccctata ccctagtagg gtttaaacct	480
20	gatcattagg ctggctcccc ctgtccata gagcacactc aatctcatgg ccaagacttg	540
	aagggttaaaa tctcatgggg ctgctgatca gattgcccac aaaagggtgtt acctgataca	600
	gtctaacttc ttacctgcca gcaaaaattt tgatggaagt atcctggcaa ctgtaatcct	660
	ctaccactta aagattctag tattgattaa cttctctcca tacctaaaca gcagaatgta	720
	gcatagggtc ataggcttcc tttggagggt cactatggaa cttaccactg gatgacaacc	780
	ctcacctgtg ctactctccc taccttgag gaccattgtt gacctagaga cttatctgag	840
	tgctaacca tgacattaac ctctgggggc ttcccatcc ctggacatgt ggctggagaa	900
25	aatatagggtc aaaaacattg agcacattag gtcgactgcc aatgggtgagg ctctctaagg	960

	gtctgggtta caccagatta gcagttcttg gccttttgca gtttatctct atgcccggga	1020
	caagtgaaga ctcccggcca tccaggatga ggatgaccaa catgggagag tgtgattcgt	1080
	ctcacgcttg ctgaatctcg agtcagacta ttaggcccct catcttgaac atctttgcca	1140
	tccttttagc ttggttgca gtggaaacta gggccaatg gtttagagtc cagccagatg	1200
	gagggtgggc acaatgcccc tgcactatcc accctagctg tagaagttat gcttgtccaa	1260
5	aggttatgca actgctgtct gttgggcttg agccaagaga ttggtgggaa atcttgccag	1320
	agttggccag ttgtctcctg tccaccaaca tgatcctata tatgggtccc caccctggtt	1380
	ccaagccac tctttaggc tgaagaggaa acacctcaga agctgagtag tccaagactg	1440
	cttgaccaa gtttccaccc cttacctgtc ctgaaattaa aggcaccagt gttccgggtc	1500
	ccttggaactt tctacttgta gtgtagcact gggtagacct actcccgttt aaactcctgg	1560
	gatcatggca ctttctatta cagtgggtca caacttgagg cagccctgta gttgagtata	1620
10	tagtggagag caccagatga tgattttact tgggtgaggt tgtccctggc ccttagctgt	1680
	ggtagcccca ttgtcatcct ccagttccaa ctttccattt cctgcaatga gtggtccaca	1740
	ttgttggtg ggggtggatc tatccctcca tttgggaaga aacagtgata tggacactaa	1800
	ccaccataag tggatggatt cttcatagag tggttgcttt tgcccaagtc tgtgcagcag	1860
	aggtgtcaac ctggccccca attagtga aaatctcaca gcctgggggc tactcgtatt	1920
	aggaccagta cccattccag cctggcccaa aactttagtt gagcctagac cttcccactt	1980
15	acatggactg attgtggcgg ttccagatga ctgttgactt cctatccatt tggacttttg	2040
	gaggggcccag aaacctattc ctccagtata gtcctccaca tt	2082

<210> 20
 <211> 530
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Módulo ZFN 2:4-MCS-2:4

20	<400> 20	
	actagtctcg agtgtccgat actggatcgt tctttcatgt agcagagcgg ttggcccaaa	60
	tgtttatttg gatatcgtga gtcagatgtt cacttgggtca atgggtacag tccgccgcca	120
	gtgtctatct gagcctctct gcaagactcc cgcccatctc tctatgcccg ggacaagtgt	180
	ggacgacaag cgagtgcagc cggcttacag ccttttgtag tttatctcta tgcccgggac	240
	aagtgattaa taagctttta attaacctgc agggcatgcg tcgacaagac tcccgcccat	300
	ctctctatgc ccgggacaag tgtagagagg aatggccatg agtatttggg ttgccttttg	360
25	cagtttatct ctatgcccgg gacaagtgca gagcgggttg cccaaatgtt tattgggata	420

	tcgtgagtca gatgttcact tggccaatgg gtacagtccg ccgccagtgt ctatttgagc	480
	ctctctgcgt acatgataac ctcagttggc gagcgttgct cgagactagt	530
	<210> 21	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido 610F	
	<400> 21	
	gctactaaga acaataccta agttgc	26
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido 611F	
	<400> 22	
	tgcactcatg ttcatatcc	19
	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido 611R	
	<400> 23	
	tgtacaagaa agctgggtg	19
	<210> 24	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido YFPF_3302	
	<400> 24	
	tatgggtccag agttgaagg	19
	<210> 25	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido YFPR_4577	
	<400> 25	
	tcactctgcac aactggtga	19

	<210> 26	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido YFPF_4302	
5	<400> 26 tctttcccaa cacatgacc	19
	<210> 27	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador TQPATS	
10	<400> 27 acaagagtgg attgatgatc tagagaggt	29
	<210> 28	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador TQPATA	
15	<400> 28 ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt	29
	<210> 29	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador TQPATFQ	
20	<400> 29 gggtgtgtgg ctggtattgc ttacgctgg	29
	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador ZGP3S	
	<400> 30 cctgctccac taccagtaca a	21
25	<210> 31	

	<211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador ZGP3A	
	<400> 31 gtccaagaag gtgaccttct c	21
5	<210> 32 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador TQZGP3	
	<400> 32 agatcaccga ctttgcgctc ttt	23
10	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador GAAD1F	
	<400> 33 tgttcggttc cctctaccaa	20
15	<210> 34 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador GAAD1R	
	<400> 34 caacatccat caccttgact ga	22
20	<210> 35 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador GAAD1P	
	<400> 35 cacagaaccg tcgcttcagc aaca	24
25	<210> 36 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	

	<220> <223> Cebador IVF-Taq <400> 36 tggcggacga cgacttgt	18
5	<210> 37 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador INR-Taq <400> 37 aaagtttgga ggctgccgt	19
10	<210> 38 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Cebador de Sonda-IV <400> 38 cgagcagacc gccgtgtact tctacc	26
15		

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

144
243

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

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, 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 mediante 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, ejerzan 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, enseñas, 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 representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the shall state their intention not 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 appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn 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 I (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, 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 →

© CAVELIER ABOGADOS

WPPODERE-21 (MINUTA N° 12.1.1.2.9.r USA)

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
Signature _____ Firma _____

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

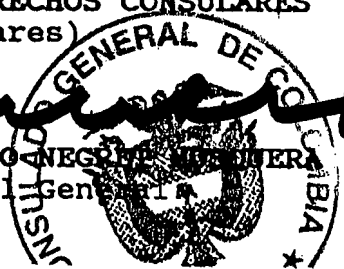
Chicago, FEB 20 1998

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. LOERTSCHER, 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



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

221220
Requisit

1998 MAR 11 11:55

NO A FIRMAR APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPERA
FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

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

SF 20

UNITED STATES OF AMERICA
CERTIFICATE OF OFFICE
STATE OF INDIANA

I, Sue Anne Gilroy, Secretary of State of Indiana, DO HEREBY CERTIFY: That,
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



Sue Anne Gilroy
Secretary of State
by: Harry Beaver
Deputy

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, 1991
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 1 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 ~~Corporation~~ Company 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, 1991
Board written consent, dated July 1, 1997

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC
Limited Liability
is a ~~Corporation~~ Company legally constituted and in existence
in accordance with the laws of the State of Delaware,
United States of America

2.2. That the domicile of said ~~Corporation~~ Company 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~~ 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.

new requirements

**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.

3. 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-Attorney 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 execution.
- 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 it.

3. Then the Colombian Consul must legalize the signature of the Notary Public.

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.

(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 fue debidamente elegido y
nombrado para el cargo de NOTARIO PUBLICO en y para el Condado
de Hendricks y que el término de dicho cargo incluía la fecha
del 6 de febrero de 1998: que a todos sus actos oficiales se
les debe dar completa fe y crédito dentro y fuera de todas las
Corte de Justicia. EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he firmado y
estampado el Gran Sello del Estado de Indiana, en Indianápolis,
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

(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 de la firma que antecede 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 cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, 17 de marzo de 1998

COLO 6641-801-001-3

BRM.137

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

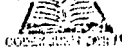
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIRMA(S) PUESTA(S) POR

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

99 MAR 18 AM 11:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

022686

CUYA FIRMA ATTESTA
DOCUMENTO DESEMPEÑAR
LAS FUNCIONES INDICADAS

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

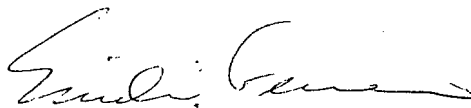
E. S. D.

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 BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C.
 Ante mí AMPARO QUINTERO AMBROSIO
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Comparado(s) con *Emilio Ferrer*
Williamson y Luz Clemencia
Guarez de Paez
 Quien(es) es (son) la(s) C.C.
 CC 432019 TP 31929
 CC 35456341 TP 23555
 Y declaró(n) que la(s) firma(s) que se hizo(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En consecuencia se firma esta diligencia.

Emilio Ferrer
Luz Clemencia Guarez de Paez



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0070422	
				Bogotá D.C., Julio 11 de 2012 - 10:57:54	
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	446258676	11/07/2012	22.325.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN			590.000.00	590.000.00
					\$590.000.00
=====					
SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 12-121225- -00000-0000					
Fecha: 2012-07-18 16:49:40 Dep. 2020 DIR. NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156					
COLO: 10975 - 841-115-0.					
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					
Julio 11 de 2012 - 10:57:56					

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0071432	
				Bogotá D.C., Julio 13 de 2012 - 13:11:36	
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	446258680	13/07/2012	51.725.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO			Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	113 PTC CAP-I EXAMEN DE PATENTIBILIDAD DE MODELO DE UTILIDA			330.000.00	330.000.00
					\$330.000.00
=====					
SON: **TRESCIENTOS TREINTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO					
					
No. 12-121225- -00000-0000					
Fecha: 2012-07-18 16:49:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR					
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI					
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156					
Código: 10975-841-115-0					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Julio 13 de 2012 - 13:45:32					

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/297,641 2010/01/22 US		(51) Int Cl: A01H 005/000 (71) Solicitante(s) DOW AGROSCIENCES LLC (72) Inventor(es) WILLIAM MICHAEL AINLEY Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2012/08/22 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2011/01/21 No. de solicitud PCT/US2011/022145		(87) Publicación internacional Fecha: 2011/07/28 N° publicación: WO 2011/091317 A2	
(54) Título: PLATAFORMAS DE ATERRIZAJE DISEÑADAS PARA EL ENVÍO AL OBJETIVO DEL GEN EN LAS PLANTAS			

Resumen:

Un método para producir una planta transgénica que incluye proporcionar una molécula de ácido nucleico que comprende al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta, y al menos dos sitios de reconocimiento de la nucleasa del dedo de zinc, en donde al menos dos regiones de la secuencia de ácido nucleico que carecen de homología de la secuencia con el ADN genómico de la célula de la planta flanquean al menos dos sitios de reconocimiento de la nucleasa del dedo de zinc. Una célula de la planta o tejido que tiene una molécula de ácido nucleico integrada de manera estable dentro del genoma de la célula de la planta es transformada. Una planta es regenerada a partir de la célula de la planta. Las plantas transgénicas son producidas por los métodos. Las semillas son producidas por las plantas transgénicas.

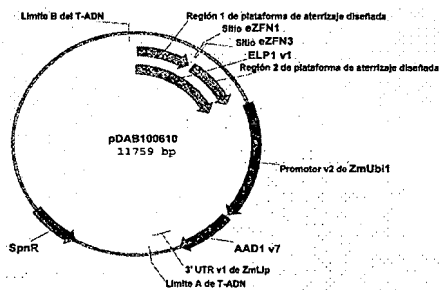


FIG. 1



No. 12-121225- -00000-0000

Fecha: 2012-07-18 16:49:40 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 156

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILI

- ☐ 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 ☐