

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-047170- -00000-0000

Fecha: 2014-03-05 16:08:21

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 74

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO USO DE PROTEINA CRISTALINA INSECTICIDA DIG# EN COMBINACION
CON Cry1Ab

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE DOW AGROSCIENCES LLC

DOMICILIO INDIANAPOLIS, INDIANA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

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

22. BOGOTÁ, D.C., _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-047170- -00000-0000

Fecha: 2014-03-05 16:08:21
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 74

de radicación

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/US2012/049491	Fecha 2012/08/03
	Publicación Internacional No.	WO 2013/022743	Fecha 2013/02/14
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
	USO DE PROTEÍNA CRISTALINA INSECTICIDA DIG3 EN COMBINACIÓN CON Cry1Ab		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	01H 005/000, 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, Indianapolis, Indiana 46268-1054, Estados Unidos de América	No. TELÉFONO 3 47 36 11
	CIUDAD	Indianapolis	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
	DEPARTAMENTO/ESTADO	Indiana	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
	PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América	Estado de Delaware, Estados Unidos de América
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1. BURTON	Stephanie L.	Estadounidense
	2. MEADE	Thomas	Estadounidense
	3. NARVA	Kenneth	Estadounidense
	4. SHEETS	Joel J.	Estadounidense
	5. STORER	Nicholas P.	Estadounidense
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
	1. Estados Unidos de América	Indiana	Indianapolis 6820 Bluffgrove Drive, Indianapolis, Indiana 46278, Estados Unidos de América
	2. Estados Unidos de América	Indiana	Zionsville 11471 Huntington Woods, Zionsville, Indiana 46077, Estados Unidos de América
	3. Estados Unidos de América	Indiana	Zionsville 4372 Creekside Pass, Zionsville, Indiana 46077, Estados Unidos de América
	4. Estados Unidos de América	Indiana	Zionsville 10005 Oak Ridge Drive, Zionsville, Indiana 46077 , Estados Unidos de América
	5. Estados Unidos de América	Maryland	Kensington 10703 Lexington Street, Kensington, Maryland 20895, Estados Unidos de América

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 61/515,553 (32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2011/08/05
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. 14-0024518 No. 14-0024503	Fecha: 2014/03/04 Fecha: 2014/03/04
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ		Firma <i>Luz Clemencia De Páez</i> <i>TPA235J5C55</i>	
C.C 35.456.344 de Usaquén		Tarjeta Profesional 23.555	

17 ANEXOS	
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: <u>29</u> 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: <u>23</u> 3. Dibujos y/o figuras N° folios: <u>1</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 prueba la cesión de los seis (6) inventores 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 medianas 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 (uno (1) inventor). ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$515.000. 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 13 reivindicaciones adicionales a 10 por \$403.000.



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
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
6. WOOSLEY		Aaron T.	Estadounidese	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
6. 8906 Tanner Way, Fishers, Indiana 46038, Estados Unidos de América		Fishers	Indiana	Estados Unidos de América
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

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

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 February 2013 (14.02.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/022743 A1

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

(21) International Application Number:
PCT/US2012/049491

(22) International Filing Date:
3 August 2012 (03.08.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/515,553 5 August 2011 (05.08.2011) US

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

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BURTON, Stephanie, L.** [US/US]; 6820 Bluffgrove Drive, Indianapolis, IN 46278 (US). **MEADE, Thomas** [US/US]; 11471 Huntington Woods, Zionsville, IN 46077 (US). **NARVA, Kenneth** [US/US]; 4372 Creekside Pass, Zionsville, IN 46077 (US). **SHEETS, Joel, J.** [US/US]; 10005 Oak Ridge Drive, Zionsville, IN 46077 (US). **STORER, Nicholas, P.** [US/US]; 10703 Lexington Street, Kensington, MD 20895 (US). **WOOSLEY, Aaron, T.** [US/US]; 8906 Tanner Way, Fishers, IN 46038 (US).

(74) Agent: **SANDERS, Jay, M.**; Faegre Baker Daniels LLP, 300 North Meridian Street, Suite 2700, Indianapolis, IN 46204 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: USE OF DIG3 INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEIN IN COMBINATION WITH CRY1AB

(57) Abstract: The subject invention includes methods and plants for controlling European corn borer, said plants comprising a Cry1Ab insecticidal protein and a DIG-3 insecticidal protein to delay or prevent development of resistance by the insect.



WO 2013/022743 A1

USO DE PROTEÍNA CRISTALINA INSECTICIDA DIG3 EN COMBINACIÓN CON Cry1Ab

Antecedentes de la Invención

Los seres humanos cultivan maíz para aplicaciones alimenticias y energéticas. Los seres humanos también cultivan muchos otros cultivos, incluyendo soja y algodón. Los insectos comen y dañan las plantas y de ese modo menoscaban estos esfuerzos de los seres humanos. Se gastan miles de millones de dólares por año para controlar pestes de insectos y miles de millones adicionales se pierden por el daño que causan. Los insecticidas químicos orgánicos sintéticos han sido las herramientas primarias empleadas para controlar pestes de insectos pero los insecticidas biológicos, tales como las proteínas insecticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), han jugado un rol importante en ciertas áreas. La capacidad de producir plantas resistentes a insectos a través de la transformación con genes de proteínas insecticidas *Bt* ha revolucionado la agricultura moderna y ha resaltado la importancia y el valor de las proteínas insecticidas y sus genes.

Se han utilizado diversas proteínas *Bt* para crear las plantas transgénicas resistentes a insectos que han sido exitosamente registradas y comercializadas hasta la fecha. Estas incluyen Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1F y Cry3Bb en el maíz, Cry1Ac y Cry2Ab en el algodón, y Cry3A en la papa.

Los productos comerciales que expresan estas proteínas expresan una única proteína excepto en los casos en que se desea el espectro insecticida combinado de 2 proteínas (por ejemplo, Cry1Ab y Cry3Bb en el maíz combinados para proporcionar resistencia a pestes lepidópteras y al gusano de la raíz, respectivamente) o donde la acción independiente de las proteínas las torna útiles como una herramienta para demorar el desarrollo de resistencia en poblaciones de insectos susceptibles (por ej., Cry1Ac y Cry2Ab en algodón combinados para proporcionar manejo de resistencia para el gusano del tabaco). SMART STAX es un producto comercial que incorpora varias proteínas *Cry*. Ver también Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2008/0311096, la cual se refiere, en parte, a Cry1Ab para controlar al taladrador europeo del maíz resistente a Cry1F (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)).

La Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2010/0269223 se refiere a DIG-3.

La rápida y generalizada adopción de plantas transgénicas resistentes a insectos ha dado origen a la preocupación en cuanto a que las poblaciones de pestes desarrollarán resistencia a las proteínas insecticidas producidas por estas plantas. Se han sugerido diversas estrategias para preservar la utilidad de rasgos de resistencia a insectos a base de *Bt* las cuales incluyen la utilización de proteínas a una dosis elevada en combinación con una protección, y alternancia con, o utilización conjunta de, diferentes toxinas (McGaughey *et al.* (1998), "*B.t. Resistance Management*," *Nature Biotechnol.* 16:144-146).

Las proteínas seleccionadas para utilizar en una mezcla para el manejo de resistencia a insectos (MRI) necesitan ejercer su efecto insecticida independientemente, de tal modo que la resistencia desarrollada a una proteína no confiera resistencia a la segunda proteína (es decir, no hay resistencia cruzada a las proteínas). Si, por ejemplo, una población de pestes seleccionada para resistencia a la "Proteína A" es sensible a la "Proteína B", se podría concluir que no existe resistencia cruzada y que una combinación de la Proteína A y la Proteína B sería eficaz para retrasar la resistencia a la Proteína A sola.

En ausencia de poblaciones de insectos resistentes, se pueden realizar evaluaciones en base a otras características que se presume están relacionadas con el mecanismo de acción y potencial de resistencia cruzada. Se ha sugerido que la utilidad de la unión mediada por el receptor para identificar proteínas insecticidas probablemente no exhiba resistencia cruzada (van Mellaert *et al.* 1999). El pronosticador clave de la falta de resistencia cruzada inherente en este método es que las proteínas insecticidas no compiten por los receptores en una especie de insecto sensible.

En el caso de que dos toxinas *Bt* compitan por el mismo receptor en un insecto, entonces si ese receptor muta en ese insecto de modo que una de las toxinas ya no se une a ese receptor y por ende ya no es insecticida contra el insecto, podría ser que el insecto también sea resistente a la segunda toxina (la cual está unida competitivamente al mismo receptor). Es decir, el insecto es resistente en

forma cruzada a ambas toxinas *Bt*. Sin embargo, si dos toxinas se unen a dos receptores diferentes, esto podría ser una indicación de que el insecto no sería simultáneamente resistente a esas dos toxinas.

En la página web del comité de nomenclaturas de B.t. oficial se encuentra una lista de toxinas *Cry* adicionales (Crickmore *et al.*; lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Existen en la actualidad casi 60 grupos principales de toxinas "Cry" (Cry1-Cry59), con toxinas Cyt adicionales y toxinas VIP y similares. Muchos de cada grupo numérico tienen subgrupos en letras mayúsculas y los subgrupos en letras mayúsculas tienen sub-subgrupos en letras minúsculas. (Cry1 tiene A-L, y Cry1A tiene a-i, por ejemplo).

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en parte al descubrimiento sorprendente de que DIG-3 y Cry1Ab no compiten por unirse a sitios en preparaciones de membrana celular de intestino del taladrador europeo del maíz (ECB; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)). Como el experto en la técnica reconocerá con el beneficio de esta descripción, las plantas que producen estas dos proteínas (incluyendo porciones insecticidas de las proteínas de longitud completa) se pueden utilizar para retrasar o evitar el desarrollo de resistencia a cualquiera de estas proteínas insecticidas por sí sola. El maíz es una planta preferida para utilizar de acuerdo con la presente invención. El TEM es el insecto objetivo preferido para el par de toxinas en cuestión.

Por consiguiente, la presente invención se refiere, en parte, al uso de una proteína Cry1Ab en combinación con una proteína DIG-3. Las plantas (y la superficie plantada con dichas plantas) que producen estas dos proteínas quedan incluidas dentro del alcance de la presente invención.

La presente invención también se refiere, en parte, a combinaciones triples o "pirámides" de tres toxinas (o más), siendo Cry1Ab y DIG-3 el par base. En algunas realizaciones de pirámides preferidas, la combinación de las toxinas seleccionadas proporciona tres sitios de acción contra el TEM. Algunas combinaciones preferidas de pirámides de "tres sitios de acción" incluyen el par base de proteínas en cuestión más Cry1F como la tercera proteína para el direccionamiento hacia el TEM. (Es sabido de US 2008 0311096 que Cry1Ab es eficaz contra el TEM resistente a

Cry1Fa). Esta triple combinación en particular, por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, proporcionaría ventajosa y sorprendentemente tres sitios de acción contra el TEM. Esto puede ser útil para reducir o eliminar el requerimiento de superficie de refugio.

Si bien la presente invención es descrita en esta invención como un par base de toxinas, Cry1Ab y DIG-3, las cuales, ya sea juntas como un par o en una "pirámide" de tres toxinas o más, proporcionan resistencia a insectos contra el TEM en el maíz, debería entenderse que también pueden utilizarse otras combinaciones con Cry1Ab y DIG-3 de acuerdo con la presente invención, preferentemente en el maíz.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

La Figura 1 muestra el porcentaje de unión específica de ^{125}I Cry1Ab (0,5 nM) en BBMV's de *Ostrinia nubilalis* en comparación con la competencia por Cry1Ab (●) homóloga y DIG-3 (■) heteróloga sin rotular. La curva de desplazamiento para la competencia homóloga por Cry1Ab da como resultado una curva con forma sigmoideal que muestra 50% de desplazamiento del radioligando en aproximadamente 0,5 nM de Cry1Ab. DIG-3 no desplaza nada de la unión de ^{125}I Cry1Ab de su sitio de unión en concentraciones de 100 nM o inferiores (200 veces superior a la concentración de ^{125}I Cry1Ab en el ensayo). Solamente a 300 nM observamos aproximadamente 25% de desplazamiento de la unión de ^{125}I Cry1Ab por DIG-3. Estos resultados muestran que DIG-3 no compite eficazmente por la unión de Cry1Ab a sitios del receptor localizados en BBMV de *Ostrinia nubilalis*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

SEC ID NO:1 es la proteína Cry1Ab de longitud completa ejemplificada. (MR818)

SEC ID NO:2 es la proteína DIG-3 de longitud completa ejemplificada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en parte al sorprendente descubrimiento de que Cry1Ab y DIG-3 no compiten entre sí por sitios de unión en el intestino del taladrador europeo del maíz (TEM; *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) o el gusano cogollero

(GC; *Spodoptera frugiperda*). Por lo tanto, se pueden utilizar una proteína Cry1Ab en combinación con una proteína DIG-3, preferentemente en maíz transgénico, para retrasar o evitar que el TEM desarrolle resistencia a cualquiera de estas dos proteínas por sí sola. El par de proteínas de la presente invención puede ser eficaz para proteger a las plantas (tales como a las plantas de maíz) del daño por TEM resistente a Cry. Es decir, un uso de la presente invención consiste en proteger al maíz y a otras especies de plantas económicamente importantes del daño y pérdida de rendimiento causados por poblaciones de TEM que podrían desarrollar resistencia a Cry1Ab o DIG-3.

Por consiguiente, la presente invención describe una combinación para el manejo de resistencia a insectos (MRI) que comprende Cry1Ab y DIG-3 para prevenir o mitigar el desarrollo de resistencia por parte de TEM a cualquiera de estas dos proteínas o a ambas.

Adicionalmente, si bien la presente invención, que se describe en este documento, describe una combinación de MRI que comprende Cry1Ab y DIG-3 para prevenir la resistencia por parte de TEM a cualquiera de estas dos proteínas o a ambas, dentro del alcance de la invención descrita en esta solicitud se contempla que una o ambas Cry1Ab y DIG-3 pueden adaptarse, ya sea por sí solas o en combinación, para prevenir la resistencia por el gusano cogollero a cualquiera estas dos proteínas o a ambas.

La presente invención proporciona composiciones para controlar pestes lepidópteras que comprenden células que producen una proteína que contiene toxina núcleo Cry1Ab y una proteína que contiene la toxina núcleo DIG-3.

La invención comprende además un huésped transformado para producir tanto una proteína insecticida Cry1Ab como una proteína insecticida DIG-3, donde dicho huésped es un microorganismo o una células de planta. El o los polinucleótidos de la presente invención están preferentemente en una construcción genética bajo el control de uno o más promotores no *Bacillus-thuringiensis*. Los presentes polinucleótidos pueden comprender el uso de codones para aumentar la expresión en una planta.

Adicionalmente, se pretende que la invención proporcione un método para controlar plagas lepidópteras que comprende poner en contacto a dichas plagas o al ambiente de dichas plagas con una cantidad eficaz de una composición que contiene una proteína insecticida Cry1Ab y además contiene una proteína insecticida DIG-3.

5 Una realización de la invención comprende una planta de maíz que comprende un gen expresable en una planta que codifica una proteína que contiene la toxina núcleo DIG-3 y un gen expresable en plantas que codifica una proteína que contiene la toxina núcleo Cry1Ab, y la semilla de dicha planta.

10 Una realización de la invención adicional comprende una planta de maíz donde un gen expresable en plantas que codifica una proteína insecticida DIG-3 y un gen expresable en plantas que codifica una proteína insecticida Cry1Ab han sido introducidos en dicha planta de maíz, y la semilla de dicha planta.

15 Según lo descrito en los Ejemplos, los estudios de unión al receptor competitivos utilizando proteínas DIG-3 y Cry1Ab radiomarcada muestran que la proteína DIG-3 no compite por la unión en tejidos de TEM a los cuales Cry1Ab se une. Estos resultados también indican que la combinación de proteínas Cry1Ab y DIG-3 puede ser un medio eficaz para mitigar el desarrollo de resistencia en poblaciones de TEM a cualquiera de estas dos proteínas. Por lo tanto, en base en parte a los datos descritos en esta invención, la co-producción (apilamiento) de DIG-3 con Cry1Ab para una dosis elevada puede utilizarse en combinaciones de MRI para controlar TEM.

20 Se pueden agregar otras proteínas a este par. Por ejemplo, la presente invención también se refiere, en parte, a pilas triples o "pirámides" de tres toxinas (o más), siendo Cry1Ab y DIG-3 el par base. En algunas realizaciones de pirámides preferidas, las toxinas seleccionadas tienen tres sitios de acción separados contra TEM. Algunas combinaciones de pirámides de "tres sitios de acción" preferidas incluyen el par base de proteínas en cuestión más Cry1Fa como la tercera proteína para el direccionamiento hacia TEM. Estas pilas triples en particular proporcionarían, de acuerdo con la presente invención, en forma ventajosa y sorprendente, tres sitios de acción contra TEM. Esto puede ayudar a reducir o eliminar el requerimiento para

25

30

la superficie de refugio. Por "sitios de acción separados" se quiere decir cualquiera de las proteínas dadas no causan resistencia cruzada entre sí.

Por lo tanto, una opción de uso consiste en utilizar el par de proteínas en cuestión en combinación con una tercera toxina/ gen, y utilizar esta triple pila para mitigar el desarrollo de resistencia en TEM a cualquiera de estas toxinas. Por consiguiente, la presente invención también se refiere, en parte, a pilas triples o "pirámides" de tres toxinas (o más). En algunas realizaciones preferidas de pirámides, las toxinas seleccionadas tienen tres sitios separados de acción contra TEM.

Se incluyen entre las opciones de uso de la presente invención el uso de dos, tres o más proteínas de las presentes proteínas en regiones de desarrollo de cultivos donde TEM puede desarrollar (o se sabe que puede desarrollar) poblaciones resistentes.

Cry1Fa es utilizada en los productos Herculex[®] y SmartStax[™], por ejemplo. El par de genes de la presente invención (Cry1Ab y DIG-3) podría ser combinado en, por ejemplo, un producto de Cry1Fa tal como Herculex[®] y/o SmartStax[™]. Por ende, el par en cuestión de proteínas podría ser importante para reducir la presión de selección sobre estas y otras proteínas. El par de proteínas de la presente invención podría utilizarse, por lo tanto, como en las combinaciones de tres genes para el maíz.

Como se discutió anteriormente, las toxinas/ genes adicionales también pueden agregarse de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, para el uso de Cry1Ab con Cry1Be para dirigirse a TEM, ver WO 2011/084631. Para el uso de Cry1Ab con Cry2Aa para el direccionamiento hacia TEM, ver WO 2011/075590. Por lo tanto, Cry1Be y/o Cry2Aa podrían emplearse (opcionalmente con Cry1Fa) en pilas de múltiples proteínas con el par de proteínas de la presente invención.

Las plantas (y superficies plantadas con dichas plantas) que producen cualquiera de las combinaciones de proteínas en cuestión quedan incluidas dentro del alcance de la presente invención. También pueden agregarse toxinas / genes adicionales, pero las pilas en particular descritas con anterioridad proporcionan en forma ventajosa y sorprendente múltiples sitios de acción contra TEM. Esto puede ayudar a reducir o eliminar el requerimiento de superficies de refugio. Un campo así

plantado de más de 4,046 hectáreas (diez acres) queda por ende incluido dentro de la presente invención.

GENBANK también puede utilizarse para obtener las secuencias para cualquiera de los genes y proteínas descritos en esta invención. También pueden utilizarse patentes. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5.188.960 y la Patente de los Estados Unidos No. 5.827.514 describen proteínas que contienen la toxina núcleo Cry1Fa adecuadas para utilizar en la realización de la presente invención. La Patente de los Estados Unidos No. 6.218.188 describe secuencias de ADN optimizadas para plantas que codifican proteínas que contienen toxina núcleo Cry1Fa que son adecuadas para utilizar en la presente invención.

El direccionamiento puede ser hacia insectos relacionados con TEM. Estos pueden incluir taladradores del tallo y/o insectos taladradores del tronco. El taladrador del maíz del suroeste (*Diatraea grandiosella* – de la suborden Heterocera) es un ejemplo. El taladrador de la caña de azúcar es también una especie *Diatraea* (*Diatraea saccharalis*). Las combinaciones de proteínas descritas en esta invención pueden utilizarse para apuntar a etapas larvarias del insecto objetivo. Los lepidópteros adultos, por ejemplo, las mariposas y las polillas, se alimentan principalmente del néctar de las flores y son un efector significativo de la polinización. Casi todas las larvas lepidópteras, es decir, las orugas, se alimentan de plantas, y muchas son plagas severas. Las orugas se alimentan sobre o dentro del follaje o de las raíces o tallo de una planta, quitándole a la planta los nutrientes y con frecuencia destruyendo la estructura de soporte físico de la planta. Por añadidura, las orugas se alimentan de los frutos, tejidos y granos y harinas almacenados, arruinando estos productos para la venta o disminuyendo severamente su valor.

Algunas toxinas quiméricas de la presente invención comprenden una porción de toxina núcleo de terminal N completa de una toxina *Bt* y, en cierto punto pasado el final de la porción de toxina núcleo, la proteína tiene una transición a una secuencia de protoxina heteróloga. La porción de toxina, insecticidamente activa, de terminal N de una toxina *Bt* es denominada la toxina “núcleo”. La transición desde el segmento de la toxina núcleo hasta el segmento de protoxina heteróloga puede ocurrir en aproximadamente la unión de la toxina/ protoxina o, alternativamente, una porción de

la protoxina nativa (que se extiende pasada la porción de la toxina núcleo) puede retenerse, con la transición a la porción de protoxina heteróloga que ocurre en sentido descendente.

Las proteínas *Cry de B.t.* de tres dominios de longitud completa, típicas, tienen aproximadamente 130 kDa a 150 kDa. Cry1Ab es un ejemplo. DIG-3 es también una toxina de tres dominios de un tamaño de aproximadamente 142 kDa.

Como un ejemplo, una toxina quimérica de la presente invención, es una porción de toxina núcleo completa de Cry1Ab (aproximadamente aminoácidos 1 a 601) y/o una protoxina heteróloga (aproximadamente aminoácidos 602 hasta el término C). En una realización preferida, la porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina es derivada de una toxina de proteína Cry1Ab. En una realización preferida, la porción de una toxina quimérica que comprende la protoxina es derivada de una toxina de proteína Cry1Ab.

Un experto en esta técnica apreciará que las toxinas *Bt* (incluso dentro de una cierta clase tal como Cry1B) pueden variar en cierta medida en longitud y en la ubicación precisa de la transición de la porción de toxina núcleo a la porción de protoxina. Las toxinas *Cry* de longitud completa típicas tienen aproximadamente alrededor de 1150 a alrededor de 1200 aminoácidos de largo. La transición desde la porción de toxina núcleo hasta la porción de protoxina típicamente ocurrirá en entre aproximadamente 50% y aproximadamente 60% de la toxina de longitud completa. La toxina quimérica de la presente invención incluirá la extensión completa de esta porción de toxina núcleo de terminal N. Por lo tanto, la toxina quimérica comprenderá por lo menos aproximadamente 50% de la proteína Cry1 de longitud completa. Esto será típicamente por lo menos aproximadamente 590 aminoácidos (y podría incluir 600-650 o algo así de residuos). Con respecto a la porción de protoxina, la extensión total de la porción de protoxina de Cry1Ab se extiende desde el final de la porción de toxina núcleo hasta el término C de la molécula.

Genes y toxinas. Los genes y toxinas útiles de acuerdo con la presente invención incluyen no solo las secuencias de longitud completa descritas sino además los fragmentos de estas secuencias, variantes, mutantes, y proteínas de fusión los cuales retienen la actividad pesticida característica de las toxinas

específicamente ejemplificadas en esta invención. En el presente contexto, los términos "variantes" o "variaciones" de genes se refieren a secuencias nucleotídicas las cuales codifican las mismas toxinas o las cuales codifican toxinas equivalentes que tienen actividad pesticida. En el presente contexto, el término "toxinas equivalentes" se refiere a toxinas que tienen la misma o esencialmente la misma actividad biológica contra las plagas objetivo que las toxinas reivindicadas.

En el presente contexto, los límites representan aproximadamente 95% (Cry1Ab, por ejemplo), 78% (Cry1A y Cry1B), y 45% (Cry1) de identidad de secuencia, según "Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins," N. Crickmore, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, y D.H. Dean. Microbiology and Molecular Biology Reviews (1998) Vol 62: 807-813. Estos límites también pueden ser aplicados a las toxinas núcleo solamente.

Debería ser evidente para una persona con experiencia en este campo que los genes que codifican toxinas activas pueden identificarse y obtenerse a través de diversos medios. Los genes o porciones génicas específicos ejemplificados en esta invención pueden obtenerse a partir de los aislados depositados en un depósito de cultivos. Estos genes, o sus porciones o variantes, también pueden ser construidos sintéticamente, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de genes. Las variaciones de genes pueden ser construidas fácilmente utilizando técnicas convencionales para preparar mutaciones puntuales. Asimismo, se pueden preparar fragmentos de estos genes utilizando exonucleasas o endonucleasas comercialmente disponibles de acuerdo con procedimientos convencionales. Por ejemplo, se pueden utilizar enzimas tales como Bal31 o mutagénesis dirigida al sitio para cortar sistémicamente nucleótidos desde los extremos de estos genes. Los genes que codifican fragmentos activos también pueden ser obtenidos utilizando una variedad de enzimas de restricción. Se pueden emplear proteasas para obtener directamente fragmentos activos de estas toxinas de proteínas.

Los fragmentos y equivalentes los cuales retienen la actividad pesticida de las toxinas ejemplificadas estarían dentro del alcance de la presente invención. Asimismo, debido a la redundancia del código genético, una variedad de secuencias

de ADN diferentes pueden codificar las secuencias de aminoácidos descritas en esta invención. El experto en la técnica sabe bien cómo crear estas secuencias de ADN alternativas que codifican las mismas, o esencialmente las mismas, toxinas. Estas secuencias de ADN variantes están dentro del alcance de la presente invención. En el presente contexto, la referencia a "esencialmente la misma" secuencia se refiere a secuencias las cuales tienen sustituciones, deleciones, adiciones o inserciones de aminoácidos que no afectan materialmente la actividad pesticida. Los fragmentos de genes que codifican proteínas que retienen la actividad pesticida quedan también incluidos en esta definición.

Un método adicional para identificar los genes que codifican las toxinas y porciones génicas útiles de acuerdo con la presente invención es a través del uso de sondas de oligonucleótidos. Estas sondas son secuencias nucleotídicas detectables. Estas secuencias pueden ser detectables en virtud de una etiqueta apropiada o pueden hacerse inherentemente fluorescentes según lo descrito en la Solicitud Internacional No. WO93/16094. Como es bien sabido en la técnica, si la molécula sonda y la muestra de ácido nucleico se hibridan formando un enlace fuerte entre las dos moléculas, se puede presumir razonablemente que la sonda y la muestra tienen homología sustancial. Con preferencia, la hibridación se realiza bajo condiciones severas mediante técnicas bien conocidas en la técnica, según lo descrito, por ejemplo, en Keller, G. H., M. M. Manak (1987) DNA Probes, Stockton Press, Nueva York, N.Y., pp. 169-170. Algunos ejemplos de concentraciones de sales y combinaciones de temperaturas son los siguientes (a fin de aumentar la severidad): 2X SSPE o SSC a temperatura ambiente; 1X SSPE o SSC a 42° C; 0.1X SSPE o SSC a 42° C; 0.1X SSPE o SSC a 65° C. La detección de la sonda proporciona un medio para determinar en una forma conocida si se ha producido la hibridación. Ese tipo de análisis de sonda proporciona un rápido método para identificar genes que codifican toxinas de la presente invención. Los segmentos nucleotídicos los cuales son empleados como sondas de acuerdo con la invención pueden ser sintetizados utilizando un sintetizador de ADN y procedimientos convencionales. Estas secuencias nucleotídicas también pueden utilizarse como cebadores de PCR para amplificar genes de la presente invención.

Toxinas variantes. Ciertas toxinas de la presente invención han sido específicamente ejemplificadas en esta invención. Puesto que estas toxinas son meramente ejemplares de las toxinas de la presente invención, debería ser fácilmente evidente que la presente invención comprende toxinas variantes o equivalentes (y secuencias nucleotídicas que codifican toxinas equivalentes) que tienen la misma actividad pesticida o similar de la toxina ejemplificada. Las toxinas equivalentes tendrán homología de aminoácidos con una toxina ejemplificada. Esta homología de aminoácidos típicamente será superior al 75%, preferentemente superior al 90%, y con máxima preferencia será superior al 95%. La homología de aminoácidos será la más elevada en regiones críticas de la toxina que representan la actividad biológica o están involucradas en la determinación de la configuración tridimensional la cual finalmente es responsable de la actividad biológica. Con respecto a esto, ciertas sustituciones de aminoácidos son aceptables y pueden ser esperadas si estas sustituciones están en regiones las cuales no son críticas para la actividad o son sustituciones de aminoácidos conservadores las cuales no afectan la configuración tridimensional de la molécula. Por ejemplo, los aminoácidos pueden ser colocados en las siguientes clases: no polares, polares no cargados, básicos y ácidos. Las sustituciones conservadoras por las cuales un aminoácido de una clase es reemplazado por otro aminoácido del mismo tipo caen dentro del alcance de la presente invención siempre y cuando la sustitución no altere materialmente la actividad biológica del compuesto. A continuación aparece un listado de ejemplos de aminoácidos que pertenecen a cada clase.

Tabla 1: Ejemplos de Aminoácidos dentro de las Cuatro Clases de Aminoácidos

Clase de Amino Ácidos	Ejemplos de Aminoácidos
No polares	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Met, Phe, Trp
Polares No Cargados	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln
Ácidos	Asp, Glu
Básicos	Lys, Arg, His

En algunos casos, también pueden realizarse sustituciones no conservadoras. El factor crítico es que estas sustituciones no deben significativamente detraer de la actividad biológica de la toxina.

Huéspedes recombinantes. Los genes que codifican las toxinas de la presente invención pueden ser introducidos a una amplia variedad de huéspedes microbianos o vegetales. La expresión del gen de toxina da como resultado, directa o indirectamente, la producción intracelular y el mantenimiento del pesticida. La transferencia de conjugación y transferencia recombinante pueden utilizarse para crear una cepa de *Bt* que expresa ambas toxinas de la presente invención. Otros organismos huéspedes también pueden ser transformados con uno o ambos genes de toxinas luego empleados para lograr el efecto sinérgico. Con huéspedes microbianos adecuados, por ej., *Pseudomonas*, los microbios pueden ser aplicados en el sitio de la peste, donde proliferarán y serán ingeridos. El resultado es control de la peste. Alternativamente, el microbio que alberga el gen de toxina puede ser tratado bajo condiciones que prolongan la actividad de la toxina y estabilizan la célula. La célula tratada, la cual retiene la actividad tóxica, luego puede aplicarse al ambiente de la peste objetivo.

Donde el gen de toxina *Bt* es introducido por medio de un vector adecuado en un huésped microbiano, y dicho huésped es aplicado al ambiente en un estado vivo, es esencial que ciertos microbios huéspedes sean empleados. Los huéspedes de microorganismos son seleccionados los cuales se sabe que ocupan la "fitósfera" (filoplano, filosfera, rizosfera, y/o rizoplano) de uno o más cultivos de interés. Estos microorganismos son seleccionados de modo de ser capaces de competir exitosamente en el ambiente en particular (cultivo y otros hábitats de insectos) con los microorganismos del tipo salvaje, proporcionar un mantenimiento estable y expresión del gen que expresa el pesticida polipeptídico, y, deseablemente, proporcionar una protección mejorada del pesticida frente a la degradación y desactivación medioambiental.

Se sabe que una gran cantidad de microorganismos habitan el filoplano (la superficie de las hojas de las plantas) y/o la rizosfera (la tierra que rodea a las raíces de las plantas) de una amplia variedad de cultivos importantes. Estos

microorganismos incluyen bacterias, algas y hongos. De particular interés son los microorganismos, tales como bacterias, por ej., los géneros *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Xanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc*, y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levadura, por ej. los géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, y *Aureobasidium*. De particular interés son las especies bacterianas de la fitósfera tales como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes entrophus*, y *Azotobacter vinlandii*; y especies de levadura de la fitósfera tales como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odoratus*, *Kluyveromyces veronae*, y *Aureobasidium pollulans*. De particular interés son los microorganismos pigmentados.

Se encuentra disponible una amplia variedad de métodos para introducir un gen *Bt* que codifica una toxina en un microorganismo huésped bajo condiciones las cuales permiten el mantenimiento y expresión estables del gen. Estos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica y son descritos, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5.135.867, la cual se incorpora a la presente como referencia.

Tratamientos de células. Las células de *Bacillus thuringiensis* o recombinantes que expresan las toxinas *Bt* pueden ser tratadas para prolongar la actividad de toxina y estabilizar la célula. La microcápsula pesticida que es formada comprende la toxina o toxinas de *Bt* dentro de una estructura celular que ha sido estabilizada y protegerá a la toxina cuando la microcápsula sea aplicada al ambiente de la peste objetivo. Las células huéspedes adecuadas pueden incluir ya sea procariotas o eucariotas, siendo normalmente limitadas a aquellas células las cuales no producen sustancias tóxicas para organismos superiores, tales como los mamíferos. Sin embargo, los organismos los cuales producen sustancias tóxicas para organismos superiores podrían utilizarse, donde las sustancias tóxicas son inestables o el nivel de aplicación es

suficientemente bajo como para evitar cualquier posibilidad de toxicidad para un huésped mamífero. Como huéspedes, de particular interés serán las procariotas y las eucariotas inferiores, tales como hongos.

La célula generalmente estará intacta y cuando se trata estará sustancialmente en la forma proliferativa, más que en una forma de espora, si bien en algunos casos, se pueden emplear esporas.

El tratamiento de la célula microbiana, por ej., un microbio que contiene el gen o genes de la toxina Bt, puede ser por medios químicos o físicos, o por una combinación de medios químicos y/o físicos, siempre y cuando la técnica no afecte perjudicialmente las propiedades de la toxina, ni disminuya la capacidad celular de proteger a la toxina. Los ejemplos de reactivos químicos son agentes halogenantes, particularmente halógenos de N° atómico 17-80. Más particularmente, se puede utilizar yodo bajo condiciones suaves y durante un tiempo suficiente para lograr los resultados deseados. Otras técnicas adecuadas incluyen el tratamiento con aldehídos, tales como glutaraldehído; anti-infecciosos, tales como cloruro de zefiran y cloruro de cetilpiridinio; alcoholes, tales como isopropilo y etanol; diversos fijadores histológicos tales como yodo Lugol, fijador de Bouin, diversos ácidos y fijador de Helly (Ver: Humason, Gretchen L., Animal Tissue Techniques, W. H. Freeman and Company, 1967); o una combinación de agentes físicos (calor) y químicos que preservan y prolongan la actividad de la toxina producida en la célula cuando la célula es administrada al ambiente del huésped. Los ejemplos de medios físicos son radiación de longitud de onda corta tal como radiación gamma y radiación X, congelamiento, irradiación de UV, liofilización, y similares. Los métodos para el tratamiento de células microbianas son descritos en las Pat. de los Estados Unidos Nos. 4.695.455 y 4.695.462, las cuales se incorporan a la presente como referencia.

Las células en general tendrán una mayor estabilidad estructural lo cual aumentará la resistencia a condiciones del ambiente. Cuando el pesticida está en una proforma, el método de tratamiento celular debería seleccionarse de modo de no inhibir el procesamiento de la proforma a la forma madura del pesticida por el patógeno de la peste objetivo. Por ejemplo, el formaldehído entrecruzaría proteínas y

podría inhibir el procesamiento de la proforma de un pesticida polipeptídico. El método de tratamiento debería retener por lo menos una porción sustancial de la biodisponibilidad o bioactividad de la toxina.

Las características de particular interés en la selección de una célula huésped para propósitos de producción incluyen facilidad de introducción del gen o genes de *Bt* en el huésped, disponibilidad de sistemas de expresión, eficacia de expresión, estabilidad del pesticida en el huésped, y la presencia de capacidades genéticas auxiliares. Las características de interés para utilizar como una microcápsula pesticida incluyen calidades protectoras para el pesticida, tales como paredes celulares gruesas, pigmentación y empaquetamiento intracelular o formación de cuerpos de inclusión; supervivencia en ambientes acuosos; falta de toxicidad mamífera; atractivo para plagas para la ingestión; facilidad de matar o fijar sin dañar a la toxina; y similares. Otras consideraciones incluyen facilidad de formulación y manipuleo, economía, estabilidad en almacenamiento, y similares.

Crecimiento de células. El huésped celular que contiene el gen o genes insecticidas de *Bt* puede cultivarse en cualquier medio nutriente conveniente, donde la construcción de ADN proporciona una ventaja selectiva, proporcionando un medio selectivo de modo que sustancialmente todas o todas las células retengan el gen de *Bt*. Luego, estas células pueden ser recolectadas de conformidad con los modos convencionales. Alternativamente, las células pueden ser tratadas con anterioridad a la recolección.

Las células *Bt* que producen las toxinas de la invención pueden ser cultivadas utilizando medios convencionales de la técnica y técnicas de fermentación. Al completarse el ciclo de fermentación, las bacterias pueden ser recolectadas separando en primer lugar las esporas de *Bt* y cristales del caldo de fermentación por medios bien conocidos en la técnica. Las esporas y cristales de *Bt* recuperados pueden ser formulados en un polvo humectable, concentrado líquido, gránulos u otras formulaciones mediante la adición de surfactantes, dispersantes, portadores inertes, y otros componentes para facilitar el manipuleo y aplicación para plagas

objetivo en particular. Estas formulaciones y procedimientos de aplicación son todos bien conocidos en la técnica.

Formulaciones. Los gránulos cebo formulados que contienen un atrayente y esporas, cristales y toxinas de los aislados de Bt, o microbios recombinantes que comprenden los genes obtenibles de los aislados de Bt descritos en esta invención, pueden ser aplicados a la tierra. El producto formulado también puede ser aplicado como un recubrimiento de semilla o tratamiento de la raíz o tratamiento total de la planta en etapas posteriores del ciclo de cultivo. Los tratamientos de las plantas y la tierra de células de Bt pueden emplearse como polvos humectables, gránulos o polvillo, mezclando con diversos materiales inertes, tales como minerales inorgánicos (filosilicatos, carbonatos, sulfatos, fosfatos, y similares) o materiales botánicos (mazorcas de maíz en polvo, cáscaras de arroz, cáscaras de nuez, y similares). Las formulaciones pueden incluir adyuvantes del esparcimiento-pegajosidad, agentes estabilizantes, otros aditivos pesticidas o surfactantes. Las formulaciones líquidas pueden ser con base acuosa o no acuosa y empleadas como espumas, geles, suspensiones, concentrados emulsionables o similares. Los ingredientes pueden incluir agentes reológicos, surfactantes, emulsionantes, dispersantes, o polímeros.

Como será apreciado por un experto en la técnica, la concentración pesticida variará ampliamente dependiendo de la naturaleza de la formulación en particular, particularmente si es un concentrado o si va a ser utilizado directamente. El pesticida estará presente en al menos 1% en peso y puede ser 100% en peso. Las formulaciones secas tendrán entre aproximadamente 1-95% en peso del pesticida mientras que las formulaciones líquidas generalmente serán entre aproximadamente 1-60% en peso de los sólidos en la fase líquida. Las formulaciones generalmente tendrán entre aproximadamente 10^2 y aproximadamente 10^4 células/mg. Estas formulaciones serán administradas a aproximadamente 50 mg (líquidos o secos) hasta 1 kg o más por hectárea.

Las formulaciones pueden ser aplicadas al ambiente de la peste lepidóptera, por ej., al follaje o a la tierra, por fumigación, espolvoreo, rociado o similar.

Transformación de plantas. Un huésped recombinante preferido para la producción de las proteínas insecticidas de la presente invención es una planta transformada. Los genes que codifican las proteínas de toxina *Bt*, según lo descrito en esta invención, pueden ser insertados en células de planta utilizando una variedad de técnicas las cuales son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se encuentra disponible una gran cantidad de vectores de clonación que comprenden un sistema de replicación en *Escherichia coli* y un marcador que permite la selección de las células transformadas, para la preparación para la inserción de genes extraños en plantas superiores. Los vectores comprenden, por ejemplo, pBR322, serie pUC, serie M13mp, pACYC184, *inter alia*. Por consiguiente, el fragmento de ADN que tiene la secuencia que codifica la proteína de toxina *Bt* puede ser insertado en el vector en un sitio de restricción adecuado. El plásmido resultante es utilizado para la transformación en *E. coli*. Las células de *E. coli* son cultivadas en un medio de nutrientes adecuado, luego recolectadas y lisadas. El plásmido es recuperado. El análisis de secuencias, análisis de restricción, electroforesis, y otros métodos biológicos bioquímicos- moleculares se llevan a cabo generalmente como métodos de análisis. Después de cada manipulación, la secuencia de ADN utilizada puede ser disociada y unida a la próxima secuencia de ADN. Cada secuencia de plásmido puede ser clonada en el mismo o en otros plásmidos. Dependiendo del método de inserción de los genes deseados en la planta, pueden ser necesarias otras secuencias de ADN. Si, por ejemplo, se utiliza el plásmido Ti o Ri para la transformación de la célula de planta, entonces al menos el borde derecho, pero con frecuencia el borde derecho y el izquierdo del ADN-T del plásmido Ti o Ri, debe unirse como la región flanqueante de los genes a ser insertados. El uso de ADN-T para la transformación de células de plantas ha sido intensamente investigado y suficientemente descrito en EP 120 516, Lee y Gelvin (2008), Hoekema (1985), Fraley *et al.*, (1986), y An *et al.*, (1985), y está bien establecido en la técnica.

Una vez que el ADN insertado ha sido integrado en el genoma de la planta, el mismo es relativamente estable. El vector de transformación normalmente contiene un marcador seleccionable que confiere a las células de plantas transformadas resistencia a un biocida o un antibiótico, tal como Bialafós, Kanamicina, G418,

Bleomicina, o Higromicina, *inter alia*. El marcador empleado individualmente debería por lo tanto permitir la selección de células transformadas más que de células que no contienen el ADN insertado.

Una gran cantidad de técnicas se encuentran disponibles para insertar ADN en una célula huésped de planta. Aquellas técnicas incluyen transformación con ADN-T utilizando *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* como agente de transformación, fusión, inyección, biolística (bombardeo de micropartículas), o electroporación así como también otros métodos posibles. Si se utilizan Agrobacterias para la transformación, el ADN a ser insertado debe ser clonado en plásmidos especiales, es decir, ya sea en un vector intermedio o en un vector binario. Los vectores intermedios pueden ser integrados en el plásmido Ti o Ri mediante recombinación homóloga debido a secuencias que son homólogas a secuencias en el ADN-T. El plásmido Ti o Ri también comprende la región vir necesaria para la transferencia del ADN-T. Los vectores intermedios no pueden replicarse a sí mismos en Agrobacterias. El vector intermedio puede ser transferido a *Agrobacterium tumefaciens* por medio de un plásmido ayudante (conjugación). Los vectores binarios pueden replicarse a sí mismos tanto en *E. coli* como en Agrobacterias. Los mismos comprenden un gen marcador de selección y un ligante o poliligante los cuales están enmarcados por las regiones borde de ADN-T Derecha e Izquierda. Se pueden transformar directamente en Agrobacterias (Holsters *et al.*, 1978). Las Agrobacterias utilizadas como célula huésped consisten en comprender un plásmido que porta una región vir. La región vir es necesaria para la transferencia del ADN-T a la célula vegetal. El ADN-T adicional puede estar contenido. La bacteria así transformada es utilizada para la transformación de células de plantas. Los explantos vegetales pueden ser cultivados ventajosamente con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* para la transferencia del ADN a la célula vegetal. Luego, las plantas enteras pueden ser regeneradas a partir del material vegetal infectado (por ejemplo, trozos de hoja, segmentos del tallo, raíces, pero también protoplastos o células cultivadas en suspensión) en un medio adecuado, el cual puede contener antibióticos o biocidas para selección. Las plantas así obtenidas pueden luego ser analizadas para determinar la presencia del ADN insertado. No se

realizan demandas especiales de los plásmidos en el caso de inyección y electroporación. Es posible utilizar plásmidos comunes, tales como, por ejemplo, derivados de pUC.

Las células transformadas crecen dentro de las plantas en la forma usual.
5 Pueden formar células germinales y transmitir el o los rasgos transformados a las plantas progenie. Dichas plantas pueden ser cultivadas en la forma normal y cruzadas con plantas que tienen los mismos factores hereditarios transformados u otros factores hereditarios. Los individuos híbridos resultantes tienen las correspondientes propiedades fenotípicas.

10 En una realización preferida de la presente invención, las plantas serán transformadas con genes donde el uso de codones ha sido optimizado para las plantas. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5.380.831, la cual se incorpora a la presente como referencia. Si bien algunas toxinas truncadas son ejemplificadas en esta invención, es bien sabido en la técnica de Bt que las toxinas
15 del tipo 130 kDa (de longitud completa) tienen una mitad de terminal N que es la toxina núcleo, y una mitad de terminal C que es la “cola” de protoxina. Por lo tanto, se pueden utilizar “colas” apropiadas con toxinas truncadas/ núcleo de la presente invención. Ver, por ej. la Patente de los Estados Unidos No. 6.218.188 y la Patente de los Estados Unidos No. 6.673.990. Por añadidura, en la técnica se conocen
20 métodos para crear genes de Bt sintéticos para utilizar en plantas (Stewart y Burgin, 2007). Un ejemplo no limitativo de una planta transformada preferida es una planta de maíz fértil que comprende un gen expresable en plantas que codifica una proteína Cry1Ab, y que además comprende un segundo gen expresable vegetal que codifica una proteína Cry1Be.

25 La transferencia (o introgresión) del o de los rasgos determinados por Cry1Ab y Cry1Be en líneas de maíz endogámicas puede lograrse por mejoramiento genético por selección recurrente, por ejemplo por retrocruzamiento. En este caso, un progenitor recurrente deseado es cruzado, en primer lugar, con un donante endogámico (el progenitor no recurrente) que porta el o los genes apropiados para
30 los rasgos determinados por Cry1A y Cry1Be. La progenie de este cruzamiento luego se aparea de vuelta al progenitor recurrente seguido por selección en la progenie

resultante para la transferencia del o de los rasgos deseados del progenitor no recurrente. Después de tres, preferentemente cuatro, más preferentemente cinco o más generaciones de retrocruzamientos con el progenitor recurrente con selección para el o los rasgos deseados, la progenie será heterocigótica para los sitios que controlan el o los rasgos que se están transfiriendo, pero será como el progenitor recurrente para la mayoría o casi todos los otros genes (ver, por ejemplo, Poehlman & Sleper (1995) *Breeding Field Crops*, 4ta Ed., 172-175; Fehr (1987) *Principles of Cultivar Development*, Vol. 1: Theory and Technique, 360-376).

Estrategias de Manejo de la Resistencia a Insectos (MRI). Roush *et al.*, por ejemplo, describe estrategias de dos toxinas, también denominadas “construcción de pirámides” (“pyramiding”) o “apilamiento” (“stacking”), para el manejo de cultivos transgénicos insecticidas. (The Royal Society. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* (1998) 353, 1777-1786).

En su sitio web, the United States Environmental Protection Agency (Agencia Estadounidense de Protección Ambiental) (epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/bt_corn_refuge_2006.htm) publica los siguientes requerimientos para proporcionar refugios no transgénicos (es decir, no B.t.) (una sección de cultivos/ maíz no Bt) para utilizar con cultivos transgénicos que producen una proteína Bt única activa contra pestes objetivos.

"Los requerimientos estructurados específicos para productos de maíz Bt (Cry1Ab o Cry1F) protegidos del taladrador del maíz son los siguientes:

Refugios estructurados: 20% refugio de maíz Bt no lepidópteros en el Cinturón del Maíz;

50% refugio de Bt no lepidóptero en Cinturón del Algodón

Bloques

Internos (es decir, dentro del campo de Bt)

Externos (es decir, campos separados dentro de 0,804 km (½ milla) (0,402 km (1/4 de milla) si es posible) del campo de Bt para maximizar el apareamiento al azar)

Franjas en campo

Las franjas deben tener por lo menos un ancho de 4 hileras (preferentemente 6 hileras) para reducir los efectos del movimiento larvario"

Adicionalmente, the National Corn Growers Association (Asociación Nacional de Cultivadores del Maíz) , en su sitio web:

(ncga.com/insect-resistance-management-fact-sheet-bt-corn)

también proporciona pautas similares con respecto a los requerimientos de los refugios. Por ejemplo:

"Requerimientos del MRI del Taladrador del Maíz:

-Plantar por lo menos 20% de sus acres de maíz para refugiar híbridos

-En regiones productoras de algodón, el refugio debe ser 50%

-Debe plantarse dentro de 0,804 km (½ milla) de los híbridos en el refugio

-El refugio puede ser plantado como franjas dentro del campo Bt; las franjas de refugio deben tener al menos 4 hileras de ancho

-El refugio puede ser tratado con pesticidas convencionales solamente si se alcanzan los umbrales económicos para el insecto objetivo

-Los insecticidas pulverizables a base de Bt no pueden utilizarse sobre el maíz del refugio

-Debe plantarse un refugio apropiado en cada granja con maíz Bt"

Según lo expuesto por Roush *et al.* (en las páginas 1780 y 1784 columna derecha, por ejemplo); el apilamiento o construcción de pirámides de dos proteínas diferentes cada una eficaz contra las plagas objetivo y con poca o ninguna resistencia cruzada puede dar lugar al uso de un refugio más pequeño. Roush sugiere que para un apilamiento exitoso, un tamaño de refugio de menos del 10% de refugio, puede proporcionar un manejo de la resistencia comparable con aproximadamente 50% de refugio para un solo rasgo (no piramidal). Para productos de maíz Bt piramidales actualmente disponibles, la Agencia Estadounidense de Protección Ambiental requiere el plantado de un refugio estructurado

significativamente menor (generalmente 5%) de maíz no Bt que para productos de un solo rasgo (generalmente 20%).

Existen diversas maneras de proporcionar los efectos de MRI de un refugio, incluyendo diversos diseños geométricos de plantación en los campos (según lo mencionado con anterioridad) y mezclas de semillas en bolsa, según lo descrito adicionalmente por Roush *et al.* (*supra*), y en la Patente estadounidense No. 6.551.962.

Los porcentajes antes mencionados, o relaciones similares de refugio, pueden emplearse para los apilamientos dobles o triples o pirámides de la presente invención. Para apilamientos triples con tres sitios de acción contra una única peste objetivo, una meta sería refugio cero (o menos del 5% de refugio, por ejemplo). Esto es particularmente cierto para superficies en acres comerciales – de más de 4,046 hectáreas (10 acres) por ejemplo.

Todas las patentes, solicitudes de patentes, solicitudes provisionarias y publicaciones a las que se hace referencia o se citan en esta invención se incorporan por referencia en su totalidad en tanto y en cuanto no sean inconsistentes con las descripciones explícitas de esta memoria descriptiva.

A menos que se indique o implique específicamente lo contrario, los términos “un”, “una” y “el”, “la” significan “por lo menos uno/una” en el presente contexto.

Lo que sigue son ejemplos que ilustran procedimientos para poner en práctica la invención. Estos ejemplos no deberían ser interpretados como una limitación. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de solventes son en volumen a menos que se indique lo contrario. Todas las temperaturas se brindan en grados Celsius.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Etiquetado con ^{125}I de Proteína Cry1Ab

5 **Yodación de toxina núcleo Cry1Ab.** La toxina Cry1Ab (SEC ID NO:1) fue activada con tripsina y tratada con yodo utilizando Iodo-Beads (Pierce). Brevemente, se lavaron dos perlas Iodo-Beads dos veces con 500 μl de solución salina tamponada con fosfato, PBS (fosfato sódico 20 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5), y se colocaron en un tubo de centrifugación de 1,5 ml detrás de la protección de plomo. A

10 esto se agregaron 100 μl de PBS. En una campana y a través del uso de técnicas de manipuleo radioactivo apropiadas, se agregó 0,5 mCi Na^{125}I (17,4 Ci/mg, Amersham) a la solución de PBS con la Perla de Yodo Iodo-Bead. Los componentes se dejaron reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se agregaron 10 μg de proteína Cry1Ab truncada altamente pura a la solución y se dejó reaccionar

15 durante 5 minutos más. La reacción finalizó por la eliminación de la solución de las perlas de yodo y su aplicación a una columna giratoria Zeba de desalado de 0,5 ml (InVitrogen) equilibrada en buffer CAPS 20 mM, pH 10,5 + DTT 1 mM. La perla de yodo se lavó dos veces con 10 μl de PBS cada una y la solución de lavado también se aplicó a la columna de desalado. La solución radiactiva se eluyó a través de la

20 columna de desalado por centrifugación a 1,000 x g durante 2 min. Se determinó la radio-pureza de la Cry1Ab radio-yodada por SDS-PAGE, imágenes fosforescentes y recuento gamma. Brevemente, 2 μl de la proteína radiactiva se separaron por SDS-PAGE usando geles de tris glicina poliacrilamida al 4-20% (1 mm de espesor, InVitrogen). Luego de la separación, los geles fueron secados utilizando un aparato

25 de secado de geles BioRad siguiendo las instrucciones del fabricante. Se les sacó imágenes a los geles secados envolviéndolos en una película Mylar (espesor de 12 μm), y exponiéndolos bajo una pantalla de fósforo de almacenamiento Molecular Dynamics (35 cm x 43 cm), durante 1 hora. Las placas fueron reveladas usando un aparato por imagen fosforescente y la imagen se analizó utilizando un programa

30 informático ImageQuant TM. La actividad específica era aproximadamente 4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ de proteína.

Ejemplo 2 – Protocolo de Preparación de BBMV

Preparación y Fraccionamiento de BBMV Solubilizadas. Se colocaron en ayuno larvas de *Ostrinia nubilalis* de último estadio durante la noche y luego se diseccionaron por la mañana después de enfriamiento en hielo durante 15 minutos. El tejido del intestino medio fue extraído de la cavidad corporal, dejando atrás el intestino distal unido al integumento. El intestino medio se colocó en volumen 9X de buffer de homogenización enfriado con hielo (manitol 300 mM, tris. base 17 mM, pH 7.5), suplementado con Cóctel de Inhibidor de Proteasa¹ (Sigma P-2714) diluido según lo recomendado por el proveedor. El tejido se homogenizó con 15 golpes de un homogenizador de tejido de vidrio. Se prepararon las BBMV mediante el método de precipitación de MgCl₂ de Wolfersberger (1993). Brevemente, se mezcló un volumen igual de una solución de MgCl₂ 24 mM en manitol 300 mM con el homogenizado del intestino medio, se agitó durante 5 minutos y se dejó en reposo sobre hielo durante 15 min. La solución se centrifugó a 2,500 x g durante 15 min a 4° C. El sobrenadante se guardó y el pellet se suspendió en el volumen original de buffer de homogenización diluido 0,5X y se centrifugó nuevamente. Los dos sobrenadantes se combinaron, centrifugaron a 27.000 x g durante 30 min a 4 °C para formar la fracción de BBMV. El pellet se suspendió en 10 ml de buffer de homogenización suplementado con inhibidores de proteasa y centrifugado nuevamente a 27.000 x g durante 30 min a 4 °C para lavar las BBMV. El pellet resultante se suspendió en Buffer de Almacenamiento de BBMV (HEPES 10 mM, KCl 130 mM, 10% glicerol, pH 7.4) hasta una concentración de aproximadamente 3 mg/ml de proteína. Se determinó la concentración de proteína utilizando el método Bradford (1976) con albúmina de suero bovino (BSA) como el patrón. Se realizó la determinación de fosfatasa alcalina con anterioridad al congelamiento de las muestras utilizando el ensayo Sigma siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad específica de esta enzima marcador en la fracción de BBMV típicamente aumentó 7 veces en comparación con aquella encontrada en la fracción del

¹ Concentración final de componentes de cóctel (en μ M) son AEBSF (500), EDTA (250 mM), Bestatina (32), E-64 (0,35), Leupeptina (0,25), y Aprotinina (0,075).

homogenado de intestino medio. Las BBMV se distribuyeron en muestras de 250 µl, se congelaron instantáneamente en N₂ líquido almacenado a -80 °C.

Ejemplo 3 – Método para Medir la Unión de Proteína ¹²⁵I Cry1Ab a Proteínas de BBMV

Unión de Proteína ¹²⁵I Cry1Ab a BBMV. Para determinar la cantidad óptima de proteína de BBMV a utilizar en los ensayos de unión, se generó una curva de saturación. Se incubó proteína Cry1Ab radioetiquetada con ¹²⁵I (0,5 nM) durante 1 hora a 28 °C con diversas cantidades de proteína de BBMV, que oscilan entre 0-500 µg/ml en buffer de unión (NaHPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 150 mM, 0,1% albúmina de suero bovino, pH 7.4). El volumen total era 0,5 ml. Se separó la proteína ¹²⁵I Cry1Ab unida de la no unida por muestreo de 150 µl de la mezcla de reacción por triplicado de un tubo de centrifugación de 1,5 ml en un tubo de centrifugación de 500 µl y centrifugando las muestras a 14.000 x g durante 6 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado suavemente, y el pellet se lavó suavemente tres veces con buffer de unión enfriado con hielo. El fondo de la centrífuga que contenía el pellet se cortó y colocó en un tubo de cultivo de vidrio de 13 x 75 mm. Las muestras se contaron durante 5 minutos cada una en el contador gamma. Los recuentos contenidos en la muestra fueron restados de los recuentos de fondo (reacción sin proteína alguna) y se graficaron en comparación con la concentración de proteína de BBMV. La cantidad óptima de proteína a utilizar se determinó como siendo de 0,15 mg/ml de proteína BBMV.

Para determinar la cinética de unión, se generó una curva de saturación. Brevemente, BBMV (150 µg/ml) se incubaron durante 1 hr. a 28 °C con concentraciones en aumento de la toxina ¹²⁵I Cry1Ab, que oscilaron entre 0,01 y 10 nM. Se determinó la unión total por muestreo de 150 µl de cada concentración por triplicado, centrifugación de la muestra y recuento según lo descrito con anterioridad. Se determinó la unión no específica de este modo, con la adición de 1.000 nM de la toxina Cry1Ab no radiactiva tripsinizada homóloga agregada a la mezcla de reacción

para saturar todos los sitios de unión al receptor no específicos. Se calculó la unión específica como la diferencia entre la unión total y la unión no específica.

Los ensayos de unión por competición homóloga (Cry1Ab) y heteróloga (DIG-3) se llevaron a cabo utilizando 150 µg/ml de proteína BBMV y 0,5 nM de la proteína Cry1Ab radioetiquetada con ^{125}I . Cry1Ab y DIG-3 (SEC ID NO:2) se activaron con tripsina y se utilizaron como proteínas competidoras. La concentración de la toxina Cry1Ab o DIG-3 no radioetiquetada competitiva agregada a la mezcla de reacción osciló entre 0,03 y 1.000 nM y se agregaron al mismo tiempo que el ligando radiactivo, para asegurar una competición de unión verdadera. Se llevaron a cabo incubaciones durante 1 hr. a 28 °C y la cantidad de proteína ^{125}I Cry1Ab unida a su toxina receptora se midió según lo descrito anteriormente con sustracción de la unión no específica. Se determinó un cien por ciento de unión total en ausencia de cualquier ligando competidor. Los resultados fueron graficados en un gráfico semilogarítmico como el porcentaje total de unión específica en comparación con la concentración de ligando competitivo agregado.

Ejemplo 4 – Síntesis de Resultados

La Figura 1 muestra el porcentaje de unión específica de ^{125}I Cry1Ab (0,5 nM) en BBMV de *Ostrinia nubilalis* en comparación con la competición por Cry1Ab (●) homóloga y DIG-3 heteróloga (■) sin etiquetar. La curva de desplazamiento para la competición homóloga por Cry1Ab da como resultado una curva con forma sigmoidal que muestra un 50% de desplazamiento del radioligando a aproximadamente 0,5 nM de Cry1Ab. DIG-3 no desplaza ninguna unión de ^{125}I Cry1Ab de su sitio de unión en concentraciones de 100 nM o inferiores (200 veces superior a la concentración de ^{125}I Cry1Ab en el ensayo). Solamente a 300 nM podemos observar alrededor del 25% desplazamiento de la unión de ^{125}I Cry1Ab por DIG-3. Estos resultados muestran que DIG-3 no compite eficazmente por la unión de Cry1Ab a los sitios receptores situados en BBMV de *Ostrinia nubilalis*.

Listado de Referencia

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

10 Luo,K., Banks,D., y Adang,M.J. (1999). Toxicity, binding, and permeability analyses of four bacillus thuringiensis cry1 delta-endotoxins using brush border membrane vesicles of spodoptera exigua and spodoptera frugiperda. Appl. Environ. Microbiol. 65, 457-464.

Palmer, M., Buchkremer, M, Valeva, A, y Bhakdi, S. Cysteine-specific radioiodination of proteins with fluorescein maleimide. Analytical Biochemistry 253, 175-179. 1997.

Tipo Ref: Boletín (Completo)

15 Sambrook,J. y Russell,D.W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory).

Schlenz, M. L., Babcock, J. M., y Storer, N. P. Response of Cry1F-resistant and Susceptible European Corn Borer and Fall Armyworm Colonies to Cry1A.105 and Cry12Ab2. DAI 0830, 2008. Indianapolis, Dow AgroSciences. Derbi Report.

20 Sheets, J. J. y Storer, N. P. Analysis of Cry1Ac Binding to Proteins in Brush Border Membrane Vesicles of Corn Earworm Larvae (*Heliothis zea*). Interactions with Cry1F Proteins and Its Implication for Resistance in the Field. DAI-0417, 1-26. 2001. Indianapolis, Dow AgroSciences.

25 Tabashnik,B.E., Liu,Y.B., Finson,N., Masson,L., y Heckel,D.G. (1997). One gene in diamondback moth confers resistance to four Bacillus thuringiensis toxins. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94, 1640-1644.

Tabashnik,B.E., Malvar,T., Liu,Y.B., Finson,N., Borthakur,D., Shin,B.S., Park,S.H., Masson,L., de Maagd,R.A., y Bosch,D. (1996). Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2839-2844.

5 Tabashnik,B.E., Roush,R.T., Earle,E.D., y Shelton,A.M. (2000). Resistance to Bt toxins. *Science* 287, 42.

Wolfersberger,M.G. (1993). Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Arch. Insect Biochem. Physiol* 24, 139-147.

10 Xu,X., Yu,L., y Wu,Y. (2005). Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac {delta}-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl Environ Microbiol* 71, 948-954.

15

Revisión efectuada por Rafael Baracaldo
COLO 10975 841 210 9 - Id. 261336

20

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> DOW AGROSCIENCES LLC
Meade, Thomas
Narva, Kenneth E.
Storer, Nicholas P.
Sheets, Joel J.
Woosley, Aaron T.
Burton, Stephanie
- <120> USO DE PROTEÍNA CRISTAL INSECTICIDA DIG3 EN COMBINACIÓN CON Cry1Ab PARA GESTIÓN DE RESISTENCIA EN TALADRADOR EUROPEO DE MAÍZ
- <130> DAS-P0217
- <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1155
- <212> PRT
- <213> Bacillus thuringiensis
- <400> 1

Met Asp Asn Asn Pro Asn Ile Asn Glu Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu
1 5 10 15

Ser Asn Pro Glu Val Glu Val Leu Gly Gly Glu Arg Ile Glu Thr Gly
20 25 30

Tyr Thr Pro Ile Asp Ile Ser Leu Ser Leu Thr Gln Phe Leu Leu Ser
35 40 45

Glu Phe Val Pro Gly Ala Gly Phe Val Leu Gly Leu Val Asp Ile Ile
50 55 60

Trp Gly Ile Phe Gly Pro Ser Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile
65 70 75 80

Glu Gln Leu Ile Asn Gln Arg Ile Glu Glu Phe Ala Arg Asn Gln Ala
85 90 95

Ile Ser Arg Leu Glu Gly Leu Ser Asn Leu Tyr Gln Ile Tyr Ala Glu
100 105 110

Ser Phe Arg Glu Trp Glu Ala Asp Pro Thr Asn Pro Ala Leu Arg Glu
115 120 125

Glu Met Arg Ile Gln Phe Asn Asp Met Asn Ser Ala Leu Thr Thr Ala
130 135 140

Ile Pro Leu Phe Ala Val Gln Asn Tyr Gln Val Pro Leu Leu Ser Val
145 150 155 160

Tyr Val Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ser Val Leu Arg Asp Val Ser
165 170 175

Val Phe Gly Gln Arg Trp Gly Phe Asp Ala Ala Thr Ile Asn Ser Arg
180 185 190

Tyr Asn Asp Leu Thr Arg Leu Ile Gly Asn Tyr Thr Asp Tyr Ala Val
195 200 205

Arg Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Glu Arg Val Trp Gly Pro Asp Ser Arg
210 215 220

Asp Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe Arg Arg Glu Leu Thr Leu Thr Val
225 230 235 240

Leu Asp Ile Val Ala Leu Phe Pro Asn Tyr Asp Ser Arg Arg Tyr Pro
245 250 255

Ile Arg Thr Val Ser Gln Leu Thr Arg Glu Ile Tyr Thr Asn Pro Val
260 265 270

Leu Glu Asn Phe Asp Gly Ser Phe Arg Gly Ser Ala Gln Gly Ile Glu
275 280 285

Arg Ser Ile Arg Ser Pro His Leu Met Asp Ile Leu Asn Ser Ile Thr
290 295 300

Ile Tyr Thr Asp Ala His Arg Gly Tyr Tyr Tyr Trp Ser Gly His Gln
305 310 315 320

Ile Met Ala Ser Pro Val Gly Phe Ser Gly Pro Glu Phe Thr Phe Pro
325 330 335

Leu Tyr Gly Thr Met Gly Asn Ala Ala Pro Gln Gln Arg Ile Val Ala
340 345 350

Gln Leu Gly Gln Gly Val Tyr Arg Thr Leu Ser Ser Thr Leu Tyr Arg
355 360 365

Arg Pro Phe Asn Ile Gly Ile Asn Asn Gln Gln Leu Ser Val Leu Asp
370 375 380

Gly Thr Glu Phe Ala Tyr Gly Thr Ser Ser Asn Leu Pro Ser Ala Val
385 390 395 400

Tyr Arg Lys Ser Gly Thr Val Asp Ser Leu Asp Glu Ile Pro Pro Gln
405 410 415

Asn Asn Asn Val Pro Pro Arg Gln Gly Phe Ser His Arg Leu Ser His
420 425 430

Val Ser Met Phe Arg Ser Gly Phe Ser Asn Ser Ser Val Ser Ile Ile
435 440 445

Arg Ala Pro Met Phe Ser Trp Ile His Arg Ser Ala Glu Phe Asn Asn
450 455 460

Ile Ile Pro Ser Ser Gln Ile Thr Gln Ile Pro Leu Thr Lys Ser Thr
465 470 475 480

Asn Leu Gly Ser Gly Thr Ser Val Val Lys Gly Pro Gly Phe Thr Gly
485 490 495

Gly Asp Ile Leu Arg Arg Thr Ser Pro Gly Gln Ile Ser Thr Leu Arg
500 505 510

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

Leu Gly Val Trp Val Ile Phe Lys Ile Lys Thr Gln Asp Gly His Ala
 820 825 830
 Arg Leu Gly Asn Leu Glu Phe Leu Glu Glu Lys Pro Leu Val Gly Glu
 835 840 845
 Ala Leu Ala Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg
 850 855 860
 Glu Lys Leu Glu Trp Glu Thr Asn Ile Val Tyr Lys Glu Ala Lys Glu
 865 870 875 880
 Ser Val Asp Ala Leu Phe Val Asn Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala
 885 890 895
 Asp Thr Asn Ile Ala Met Ile His Ala Ala Asp Lys Arg Val His Ser
 900 905
 Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Ser Val Ile Pro Gly Val Asn
 915 920 925
 Ala Ala Ile Phe Glu Glu Leu Glu Gly Arg Ile Phe Thr Ala Phe Ser
 930 935 940
 Leu Tyr Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly
 945 950 955 960
 Leu Ser Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Asp Val Glu Glu Gln Asn
 965 970 975
 Asn His Arg Ser Val Leu Val Val Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val Ser
 980 985 990
 Gln Glu Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg Val Thr
 995 1000 1005
 Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile His Glu
 1010 1015 1020
 Ile Glu Asn Asn Thr Asp Glu Leu Lys Phe Ser Asn Cys Val Glu
 1025 1030 1035
 Glu Glu Val Tyr Pro Asn Asn Thr Val Thr Cys Asn Asp Tyr Thr
 1040 1045 1050
 Ala Thr Gln Glu Glu Tyr Glu Gly Thr Tyr Thr Ser Arg Asn Arg
 1055 1060 1065
 Gly Tyr Asp Gly Ala Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Val Pro Ala Asp
 1070 1075 1080
 Tyr Ala Ser Ala Tyr Glu Glu Lys Ala Tyr Thr Asp Gly Arg Arg
 1085 1090 1095
 Asp Asn Pro Cys Glu Ser Asn Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Thr Pro
 1100 1105 1110

Leu Pro Ala Gly Tyr Val Thr Lys Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu
1115 1120 1125

Thr Asp Lys Val Trp Ile Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe
1130 1135 1140

Ile Val Asp Ser Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
1145 1150 1155

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

Met Thr Ser Asn Arg Lys Asn Glu Asn Glu Ile Ile Asn Ala Leu Ser
1 5 10 15

Ile Pro Thr Val Ser Asn Pro Ser Thr Gln Met Asn Leu Ser Pro Asp
20 25 30

Ala Arg Ile Glu Asp Ser Leu Cys Val Ala Glu Val Asn Asn Ile Asp
35 40 45

Pro Phe Val Ser Ala Ser Thr Val Gln Thr Gly Ile Asn Ile Ala Gly
50 55 60

Arg Ile Leu Gly Val Leu Gly Val Pro Phe Ala Gly Gln Leu Ala Ser
65 70 75 80

Phe Tyr Ser Phe Leu Val Gly Glu Leu Trp Pro Ser Gly Arg Asp Pro
85 90 95

Trp Glu Ile Phe Leu Glu His Val Glu Gln Leu Ile Arg Gln Gln Val
100 105 110

Thr Glu Asn Thr Arg Asn Thr Ala Ile Ala Arg Leu Glu Gly Leu Gly
115 120 125

Arg Gly Tyr Arg Ser Tyr Gln Gln Ala Leu Glu Thr Trp Leu Asp Asn
130 135 140

Arg Asn Asp Ala Arg Ser Arg Ser Ile Ile Leu Glu Arg Tyr Val Ala
145 150 155 160

Leu Glu Leu Asp Ile Thr Thr Ala Ile Pro Leu Phe Arg Ile Arg Asn
165 170 175

Gln Glu Val Pro Leu Leu Met Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His
180 185 190

Leu Leu Leu Leu Arg Asp Ala Ser Leu Phe Gly Ser Glu Trp Gly Thr
195 200 205

Ala Ser Ser Asp Val Asn Gln Tyr Tyr Gln Glu Gln Ile Arg Tyr Thr
210 215 220

Glu Glu Tyr Ser Asn His Cys Val Gln Trp Tyr Asn Thr Gly Leu Asn
 225 230 235 240
 Asn Leu Arg Gly Thr Asn Ala Glu Ser Trp Val Arg Tyr Asn Gln Phe
 245 250 255
 Arg Arg Asp Leu Thr Leu Gly Val Leu Asp Leu Val Ala Leu Phe Pro
 260 265 270
 Ser Tyr Asp Thr Arg Thr Tyr Pro Ile Asn Thr Ser Ala Gln Leu Thr
 275 280 285
 Arg Glu Val Tyr Thr Asp Ala Ile Gly Thr Val His Pro Ser Gln Ala
 290 295 300
 Phe Ala Ser Thr Thr Trp Phe Asn Asn Asn Ala Pro Ser Phe Ser Ala
 305 310 315 320
 Ile Glu Ala Ala Val Ile Arg Pro Pro His Leu Leu Asp Phe Pro Glu
 325 330 335
 Gln Leu Thr Ile Tyr Ser Thr Leu Ser Arg Trp Ser Asn Thr Gln Phe
 340 345 350
 Met Asn Ile Trp Ala Gly His Arg Leu Glu Ser Arg Pro Ile Ala Gly
 355 360 365
 Ser Leu Asn Thr Ser Thr Gln Gly Ser Thr Asn Thr Ser Ile Asn Pro
 370 375 380
 Val Thr Leu Gln Phe Thr Ser Arg Asp Ile Tyr Arg Thr Glu Ser Leu
 385 390 395 400
 Ala Gly Leu Asn Ile Phe Ile Thr Gln Pro Val Asn Gly Val Pro Trp
 405 410 415
 Val Arg Phe Asn Trp Arg Asn Pro Leu Asn Ser Leu Arg Gly Ser Leu
 420 425 430
 Leu Tyr Thr Ile Gly Tyr Thr Gly Val Gly Thr Gln Leu Gln Asp Ser
 435 440 445
 Glu Thr Glu Leu Pro Pro Glu Thr Thr Glu Arg Pro Asn Tyr Glu Ser
 450 455 460
 Tyr Ser His Arg Leu Ser His Ile Gly Leu Ile Ser Ser Ser His Val
 465 470 475 480
 Arg Ala Leu Val Tyr Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Asp Arg Thr Asn
 485 490 495
 Thr Ile Gly Pro Asn Arg Ile Thr Gln Ile Pro Ala Val Lys Gly Arg
 500 505 510
 Phe Leu Phe Asn Gly Ser Val Ile Ser Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly
 515 520 525

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

Ser Leu Trp Pro Leu Ser Val Glu Ser Pro Ile Gly Arg Cys Gly Glu
 835 840 845
 Pro Asn Arg Cys Ala Pro His Phe Gly Trp Asn Pro Asp Leu Asp Cys
 850 855 860
 Ser Cys Arg Asp Arg Glu Lys Cys Ala His His Ser His His Phe Thr
 865 870 875 880
 Leu Asp Ile Asp Val Gly Cys Thr Asp Leu Gln Glu Asp Leu Gly Val
 885 890 895
 Trp Val Val Phe Lys Ile Lys Thr Gln Glu Gly Tyr Ala Arg Leu Gly
 900 905 910
 Asn Leu Glu Phe Ile Glu Glu Lys Pro Leu Ile Gly Glu Ala Leu Ser
 915 920 925
 Arg Val Lys Arg Ala Glu Lys Lys Trp Arg Asp Lys Arg Glu Lys Leu
 930 935 940
 Gln Val Glu Thr Lys Arg Val Tyr Ile Asp Ala Lys Glu Ala Val Asp
 945 950 955 960
 Ala Leu Phe Val Asp Ser Gln Tyr Asp Arg Leu Gln Ala Asp Thr Asn
 965 970 975
 Ile Gly Met Ile His Ala Ala Asp Arg Leu Val His Arg Ile His Glu
 980 985 990
 Ala Tyr Leu Pro Glu Leu Pro Phe Ile Pro Gly Ile Asn Val Val Ile
 995 1000 1005
 Phe Glu Glu Leu Glu Asn Arg Ile Ser Thr Ala Phe Ser Leu Tyr
 1010 1015 1020
 Asp Ala Arg Asn Val Ile Lys Asn Gly Asp Phe Asn Asn Gly Leu
 1025 1030 1035
 Thr Cys Trp Asn Val Lys Gly His Val Glu Val Gln Gln Leu Asn
 1040 1045 1050
 Asn His Arg Ser Val Leu Val Ile Pro Glu Trp Glu Ala Glu Val
 1055 1060 1065
 Ser Gln Lys Val Arg Val Cys Pro Gly Arg Gly Tyr Ile Leu Arg
 1070 1075 1080
 Val Thr Ala Tyr Lys Glu Gly Tyr Gly Glu Gly Cys Val Thr Ile
 1085 1090 1095
 His Glu Val Asp Asn Asn Thr Asp Gln Leu Lys Phe Ser Asn Cys
 1100 1105 1110
 Glu Lys Gly Gln Val Tyr Pro Gly Asn Thr Ile Ala Cys Asn Asp
 1115 1120 1125

Tyr Asn Lys Asn His Gly Ala Asn Ala Cys Ser Ser Arg Asn Arg
 1130 1135 1140
 Gly Tyr Asp Glu Phe Tyr Gly Asn Thr Pro Ala Asp Tyr Ser Ala
 1145 1150 1155
 Asn Gln Lys Glu Tyr Gly Gly Ala Tyr Thr Ser His Asn His Ala
 1160 1165 1170
 Tyr Gly Glu Ser Tyr Glu Ser Asn Ser Ser Ile Pro Ala Asp Tyr
 1175 1180 1185
 Ala Pro Val Tyr Glu Glu Glu Ala Tyr Thr His Gly Arg Arg Gly
 1190 1195 1200
 Asn Ser Cys Glu Tyr Asn Arg Gly Tyr Thr Pro Leu Pro Ala Gly
 1205 1210 1215
 Tyr Val Thr Ala Glu Leu Glu Tyr Phe Pro Glu Thr Asp Thr Val
 1220 1225 1230
 Trp Val Glu Ile Gly Glu Thr Glu Gly Thr Phe Ile Val Asp Asn
 1235 1240 1245
 Val Glu Leu Leu Leu Met Glu Glu
 1250 1255

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD 2014 3 5	
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		Recorrido: 4	
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-47170-	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 1 ARCHIVO: 1 EN FORMATO PDF, EL CUAL FUE PROCESADO. EL CD SE ENCUENTRA EN EL FOLIO 44
--

REIVINDICACIONES

Habiendo así especialmente descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma cómo la misma ha de ser llevada a la práctica se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

5

1. Una planta transgénica que comprende un polinucleótido cry1AB que codifica una proteína insecticida Cry1Ab, y un polinucleótido DIG-3 que codifica una proteína insecticida, donde dicho polinucleótido DIG-3 se hibrida a 42°C en 1X SSC con el complemento de un polinucleótido que codifica una toxina núcleo de SEQ ID

10 NO:2.

2. La planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 1, dicha planta comprende además ADN que codifica una tercera proteína insecticida, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en Cry1Fa, Cry1Be, y Cry2Aa.

3. La planta transgénica de acuerdo con la reivindicación 2, , dicha planta
15 comprende además ADN que codifica una cuarta proteína insecticida, preferentemente seleccionada del grupo que consiste en Cry1Be y Cry2Aa donde la tercera proteína insecticida es la proteína Cry1Fa.

4. La semilla de una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

20 5. Un campo de plantas que comprende plantas refugio no Bt y una pluralidad de plantas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dichas plantas refugio comprenden menos del 40% de todas las plantas de cultivo en dicho campo.

25 6. El campo de plantas de acuerdo con la reivindicación 5, donde dichas plantas refugio comprenden menos del 30% de todas las plantas de cultivo en dicho campo.

7. El campo de plantas de acuerdo con la reivindicación 5, donde dichas plantas refugio comprenden menos del 20% de todas las plantas de cultivo en dicho campo.

8. El campo de plantas de acuerdo con la reivindicación 5, donde dichas plantas refugio comprenden menos del 10% de todas las plantas de cultivo en dicho campo.

5 9. El campo de plantas de acuerdo con la reivindicación 5, donde dichas plantas refugio comprenden menos del 5% de todas las plantas de cultivo en dicho campo.

10. El campo de plantas de acuerdo con la reivindicación 5, donde dichas plantas refugio están en bloques o franjas.

10 11. Una mezcla de semillas que comprende semillas refugio de plantas refugio no Bt, y una pluralidad de semillas de acuerdo con la reivindicación 4, donde dichas semillas refugio comprenden menos de 40% de todas las semillas en la mezcla.

12. La mezcla de semillas de acuerdo con la reivindicación 11, donde dichas semillas refugio comprenden menos del 30% de todas las semillas en la mezcla.

15 13. La mezcla de semillas de acuerdo con la reivindicación 11, donde dichas semillas refugio comprenden menos del 20% de todas las semillas en la mezcla.

14. La mezcla de semillas de acuerdo con la reivindicación 11, donde dichas semillas refugio comprenden menos del 10% de todas las semillas en la mezcla.

15 15. La mezcla de semillas de acuerdo con la reivindicación 11, donde dichas semillas refugio comprenden menos del 5% de todas las semillas en la mezcla.

20 16. Un método para gestionar el desarrollo de resistencia a una proteína *Cry* por un insecto, y dicho método comprende plantar semillas para producir un campo de plantas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-10.

17. Un campo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-10, donde dichas plantas ocupan más de 4,046 hectáreas (10 acres).

25 18. Una planta de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha planta se selecciona del grupo que consiste en maíz, soja y algodón.

19. La planta de acuerdo con la reivindicación 18, donde dicha planta es una planta de maíz.

20. Una célula vegetal no totipotente que comprende un polinucleótido cry1Ab que codifica una proteína insecticida Cry1Ab, y un polinucleótido de DIG-3 que codifica una proteína insecticida DIG-3, donde dicho polinucleótido hibrida a 42°C en 1X SSC con el complemento de un polinucleótido que codifica una toxina de núcleo de SEQ ID NO:2.

21. Un método para controlar un insector taladrador de maíz, donde dicho método comprende poner en contacto dicho insecto o el ambiente de dicho insecto con una cantidad efectiva de una composición que contiene una proteína insecticida Cry1Ab y contiene además una proteína insecticida DIG-3.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 22 donde dicha composición es una pluralidad de células vegetales.

23. Un método para producir la composición de la reivindicación 22, donde dicho método comprende reproducir dichas células.

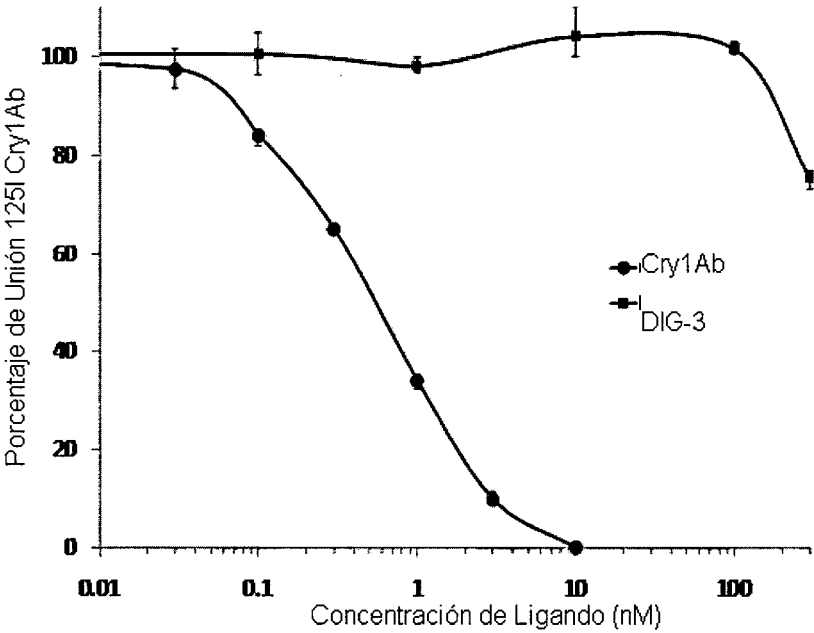
Resumen

La presente invención incluye métodos y plantas para controlar al taladrador europeo del maíz, dichas plantas comprenden una proteína insecticida Cry1Ab y una proteína insecticida DIG-3 para retardar o prevenir el desarrollo de resistencia por el

5 insecto.

5

Figura 1.



CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO WISKI
CARRERA 4ª N° 72-35
BOGOTÁ, S. COLOMBIA

REPRESENTACION, RATIFICACION Y PODER

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

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, 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 →

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.

51

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, 1998

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

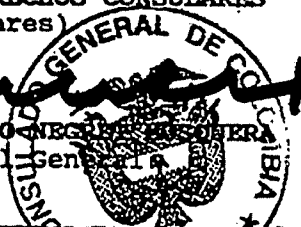
Chicago, FEB 20 1998

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. WERTSCHER, quien en su carácter de REPRESENTANTE LEGAL de la citada compañía confiere el poder precedente, es su representante legal en este país.

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

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


CARLOS ALFONSO NEGRET
Cónsul General de Colombia



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

Carlos
221220
Dejust
Cuya firma aparece en el
documento desempeña
funciones indicadas

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1998 MAR 11 A. II: 55

md
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTÁ D.C.

Bernarda R. de Mortines
Traductora e Interprete Oficial
Resolución 653 Minjusticia 1991

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 Brewer
Deputy

* CHICAGO

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 documento en representación de la Sociedad/compañía denominada Dow AgroSciences LLC

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:
CERTIFICADO DE CONSTITUCION, FECHADO 1 JULIO 1997
CERTIFICADO DE MODIFICACION, FECHADO 1 OCT. 1997
RESOLUCION JUNTA DIRECTIVA, FECHADO 23 OCT. 1997
CONSENTIMIENTO ESCRITO DE LA JUNTA, 1 JULIO 1997

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que Dow AgroSciences LLC
es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de 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 América.

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

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

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

Ciudad INDIANAPOLIS

Estado INDIANA

Hoy 6 FEB. de 19 98

Notario Público Notary Public

* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)

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

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

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 6th day of February 19 98
appeared before me
Kenneth L. Loertscher

who(m) I know personally and who(m) signed this document as representative(s) of the Dow AgroSciences LLC Limited Liability Company, named Dow AgroSciences LLC Company.

I Certify:

1. That I have seen the following documents:

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

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That Dow AgroSciences LLC
Limited Liability
is a 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 Limited Liability 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 Company, Limited liability company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Kenneth L. Loertscher
Assistant Secretary and General Patent Counsel
is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City Indianapolis

State Indiana

This 6th day of Feb. 19 98

Lydia S. Owens

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

* Documents must be identified with date and origin.

Dow Agrosciences LLC

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 incluído 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.)

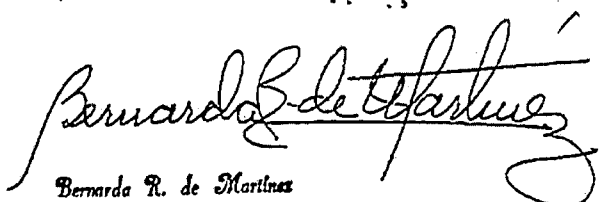
(al dorso), Legalización de la firma que antecede expedida el MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES bajo el No. 221220, de fecha 11 de marzo de 1998 y firmada por el Jefe de Legalizaciones.

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 653 Minjusticia 1994

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

[Signature]

IDENTIFICADOS CON C.C. No.(s)

ES(SON) AUTENTICA(S)

SANTAFE DE BOGOTA, 17 MAR 1998



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

98 MAR 18 AM 11:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

[Signature]

022686

COPIA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESEMPLEO
LAS FUNCIONES INDICADAS

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.comEDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIATELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 370-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

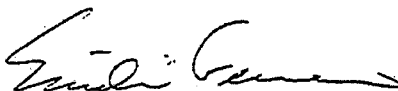
E. S. D.

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. **22 OCT 2009**
 Ante mi ASPARO QUINTERO ASUAJO
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Comparecieron *Emilio Fajardo*
Williamson y Luz Clemencia
Sobres de Poes
 Quien(es) escribió(eron) la(s) C.C.
CC 438019 TP 31929
CC 35456344 TP 23555
 Y declaró(eron) que la(s) firma(s) que se reconocen
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Fajardo
Luz Clemencia Sobres



ASSIGNMENT BY INVENTORS

THIS ASSIGNMENT, effective as of the 5th day of August 2011, by Thomas Meade; Kenneth Narva; Nicholas P. Storer; Joel J. Sheets; Aaron T. Woosley; and Stephanie L. Burton (hereinafter referred to as Assignors), residing at 1141 Huntington Woods Pointe, Zionsville, Indiana 46077; 4372 Creekside Pass, Zionsville, Indiana 46077; 10703 Lexington Street, Kensington, Maryland 20895; 10005 Oak Ridge Drive, Zionsville, Indiana 46077; 8906 Tanner Way, Fishers, Indiana 46038; and 6820 Bluffgrove Drive, Indianapolis, Indiana 46278, respectively;

WHEREAS, Assignors have invented certain new and useful improvements in USE OF DIG3 INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEIN IN COMBINATION WITH Cry1Ab FOR MANAGEMENT OF RESISTANCE IN EUROPEAN CORNBORER, set forth in a Provisional application for Letters Patent of the United States, already filed on August 5, 2011 as U.S. Application No. 61/515,553; and

WHEREAS, Dow AgroSciences LLC, a Limited Liability Company organized under and pursuant to the laws of Delaware having its principal place of business at 9330 Zionsville Road, Indianapolis, Indiana 46268 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Application for Letters Patent of the United States, and in and to any Letters Patent of the United States to be obtained therefore and thereon.

NOW, for good and valuable consideration and/or the remuneration received for my/our work and/or other good and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignors have sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and application for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said application, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefor and thereon, and reissues, reexaminations and

extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the same to be held and enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignors, had this sale and assignment not been made.

AND for the same consideration, Assignors hereby represent and warrant to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignors are the sole and lawful owners of the entire right, title and interest in and to the said inventions and application for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignors have good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

AND for the same consideration, Assignors hereby covenant and agree to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignors will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Provisional application for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

AND Assignors hereby request the Commissioner of Patent and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters

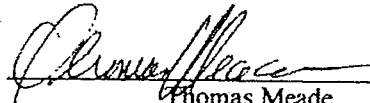
Patent to be issued thereon, for the sole use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

AND Assignors hereby grant the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for recordation of this document:

DOW AGROSCIENCES LLC

All practitioners at Customer Number 25212

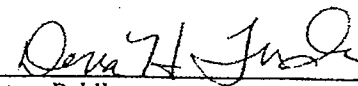
AND Assignors acknowledge an obligation of assignment of this invention to Assignee at the time the invention was made.

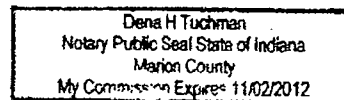

Thomas Meade

Date: March 5, 2012

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of March, 2012, before me
personally came Thomas Meade, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.


Notary Public



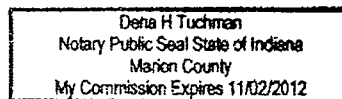
Kenneth Narva
Kenneth Narva

Date: March 5, 2012

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of March, 2012, before me
personally came Kenneth Narva, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Dena H. Tuchman
Notary Public



NSNicholas P. StorerDate: 2-22-2012

United States of America)

State of District of) ss.:County of Columbia)

On this 22nd day of February, 2012, before me personally came Nicholas P. Storer, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Catherine M. Seiden
Notary Public

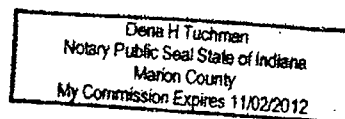
Joel J. Sheets
Joel J. Sheets

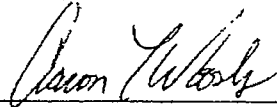
Date: 3-5-2012

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of March, 2012, before me
personally came Joel J. Sheets, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Dena H. Tuchman
Notary Public



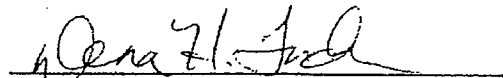
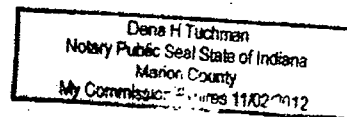


Aaron T. Woosley

Date: 3/5/2012

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 5th day of March, 2012, before me
personally came Aaron T. Woosley, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.


Notary Public

Stephanie L. Burton

Stephanie L. Burton

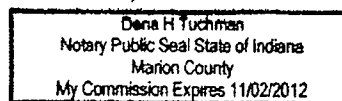
Date: 03/07/2012

United States of America)
State of Indiana) ss.:
County of Marion)

On this 7th day of March, 2012, before me
personally came Stephanie L. Burton, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Dana H. Tuchman

Notary Public



TRADUCCIÓN SIMPLE AL ESPAÑOL REALIZADA POR MELISSA AGUDELO MAGALHAES DEL SIGUIENTE DOCUMENTO, ESCRITO ORIGINALMENTE EN INGLÉS.

CESIÓN DE INVENTORES

LA PRESENTE CESIÓN, efectiva a partir del 5 de agosto del 2011, por parte de Thomas Meade; Kenneth Narva; Nicholas P. Storer; Joel J. Sheets; Aaron T. Woosley; y Stephanie L. Burton (conocidos en adelante como los Cedentes), domiciliados en 1141 Huntington Woods Pointe, Zionsville, Indiana 46077; 4372 Creekside Pass, Zionsville, Indiana 46077; 10703 Lexington Street, Kensington, Maryland 20895; 10005 Oak Ridge Drive, Zionsville, Indiana 46007; 8906 Tanner Way, Fishers, Indiana 46038; y 6829 Bluffgrove Drive, Indianápolis, Indiana 46278, respectivamente;

CONSIDERANDO QUE los Cedentes han inventado una serie de mejoras nuevas y útiles para el USO DE PROTEÍNA DE CRISTAL INSECTICIDA DIG3 COMBINADA CON Cry1Ab PARA GESTIÓN DE RESISTENCIA EN BARRENADOR EUROPEO, establecido en una solicitud provisional de Título de Patente de los Estados Unidos, presentadas el 5 de agosto de 2011 como Solicitud de EE.UU. No. 61/515,553; y

CONSIDERANDO QUE Dow AgroSciences LLC, una Compañía de Responsabilidad Limitada constituida conforme a las leyes de Delaware, cuya sede principal se encuentra ubicada en 9330 Zionsville Road, Indianápolis, Indiana 46268 (conocido en adelante como el Cesionario), está interesada en adquirir la totalidad de los derechos, títulos e intereses en relación a dichas invenciones y dicha Solicitud de Título Patente de los Estados Unidos, y en relación a todas y cada uno de los Títulos Patente de Estados Unidos que se obtengan a partir de y en relación a las mismas.

EN VIRTUD DE LO ANTERIOR, por contraprestación válida y onerosa y/o remuneración recibida por mi/nuestro trabajo y/o por otras contraprestaciones válidas y suficientes, cuyo recibo se reconoce por la presente, los Cedentes han vendido, cedido, transferido y pasado, y por la presente venden, ceden, transfieren y pasan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, la totalidad de los derechos, títulos e intereses relacionados a las invenciones anteriormente mencionadas y las solicitudes de Títulos de Patente, y en relación a todas y cada una de las divisiones, continuaciones y continuaciones parciales directas e indirectas de dicha solicitud, y todas y cada una de los Títulos de Patente de Estados Unidos y de todos los países extranjeros que se obtengan a partir de y en relación a las mismas,

2

y las reemisiones, reexaminaciones y extensiones de dichos Títulos Patente, así como todos los derechos de acuerdo a la Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, con los cuales también contará y gozará el Cesionario, para su propio uso y disfrute y para el uso y disfrute de sus sucesores, representante legales y cesionarios, durante todo el término o términos de las Patentes otorgadas y/o extendidas, de la misma manera y por el mismo tiempo que tendrían los Cedentes si no hubiesen ocurrido la presente venta y cesión.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes declaran y garantizan al Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios que, en el momento de ejecución y entrega del presente documento, a excepción de los derechos, títulos y/o intereses surgidos para el Cesionario conforme a la ley o que ya han sido transferidos al Cesionario, los Cedentes son los únicos y legítimos propietarios de la totalidad de los derechos, títulos e intereses relacionados a dichas invenciones y solicitud de Título de Patente mencionados anteriormente, y que las mismas se encuentran libres de gravámenes y que los Cedentes están en todo su derecho y están autorizados a vender y traspasar a las mismas de la manera establecida en este instrumento.

Y por la misma consideración, por medio de la presente los Cedentes aceptan y se comprometen con el Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, a firmar todos los papeles y documentos, a prestar todos los juramentos correspondientes y hacer todo lo necesario o exigido para obtener, mantener, hacer cumplir y defender a todas las Títulos de Patente y las solicitudes de Títulos de Patente para dichas invenciones, sin ningún cargo al cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios, toda vez que el apoderado del Cesionario, o el apoderado de sus sucesores, representantes legales y cesionarios indique: que algún procedimiento relacionado a dichas invenciones, o dicha solicitud Provisional de Títulos de Patente, o cualquier procedimiento relacionado a cualquier Título de Patente o solicitudes de Títulos de Patente para dichas invenciones en cualquier país, incluyendo mas no limitado a procedimientos de interferencia, es legítimo y deseable; o que una división, continuación o continuación parcial de cualquier solicitud de Título de Patente, o una reemisión, reexaminación o extensión de cualquier Título de Patente que se obtenga como resultado de las mismas es legítima y deseable.

Y por medio de la presente los Cedentes solicitan al Comisionado de Marcas y Patentes expedir dichos Títulos de Patente de los Estados Unidos al Cesionario, como Cesionario de dichas invenciones y de los Títulos de Patentes que se obtengan

como resultado de las mismas, para el uso y beneficio exclusivo del Cesionario, sus sucesores, representantes legales y cesionarios.

Y por medio de la presente los Cedentes autorizan a los siguientes individuos a adjuntar al presente documento de Cesión, cualquier tipo de identificación adicional que sea necesaria o deseable para cumplir con las normas de la Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos para el registro de este documento:

DOW AGROSCIENCES LLC

Todos los profesionales con el Número de Cliente 25212

Y los Cedentes reconocen una obligación de cesión de esta invención al Cesionario en el momento en que se realizó la invención.

(Firma ilegible)
Thomas Meade

Fecha: 5 de marzo de 2012

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 5 de marzo de 2012 compareció personalmente ante mí Thomas Meade, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(Firma ilegible)
Notario Público

Sello en tinta: Dena H Tuchman. Notario público del Estado de Indiana. Condado de Marion. Mi nombramiento vence el 02/11/2012

(Firma ilegible)
Kenneth Narva

Fecha: 5 de marzo de 2012

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 5 de marzo de 2012 compareció personalmente ante mí Kenneth Narva, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(Firma ilegible)
Notario Público

Sello en tinta: Dena H Tuchman. Notario público del Estado de Indiana. Condado de Marion. Mi nombramiento vence el 02/11/2012

(Firma ilegible)
Nicholas P. Storer

Fecha: 22/02/2012

Estados Unidos de América)
Distrito de) ss.:
Columbia)

Este día 22 de febrero del 2012 compareció personalmente ante mí Nicholas P. Storer, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(Firma ilegible)
Notario Público

Sello en tinta: CATHERINE M. SEYMOUR. NOTARIO PÚBLICO. VENC. 14-6-2015. DISTRITO DE COLUMBIA.

(Firma ilegible)
Joel J. Sheets

Fecha: 5/3/2012

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 5 de marzo del 2012 compareció personalmente ante mí Joel J. Sheets, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(Firma ilegible)
Notario Público

Sello en tinta: Dena H Tuchman. Notario público del Estado de Indiana. Condado de Marion. Mi nombramiento vence el 02/11/2012

(Firma ilegible)
Aaron T. Woosley

Fecha: 5/3/2012

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 5 de marzo del 2012 compareció personalmente ante mí Aaron T. Woosley, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(Firma ilegible)
Notario Público

Sello en tinta: Dena H Tuchman. Notario público del Estado de Indiana. Condado de Marion. Mi nombramiento vence el 02/11/2012

(Firma ilegible)
Stephanie L. Burton

8

Fecha: 7/3/2012

Estados Unidos de América)
Estado de Indiana) ss.:
Condado de Marion)

Este día 7 de marzo del 2012 compareció personalmente ante mí Stephanie L. Burton, a quien conozco como la persona descrita en y firmante del anterior instrumento, y quien reconoció haber firmado el mismo.

(Firma ilegible)
Notario Público

Sello en tinta: Dena H Tuchman. Notario público del Estado de Indiana. Condado de Marion. Mi nombramiento vence el 02/11/2012

COLO 10975 841 210 9
Id.261095

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0024518

Bogotá D.C., Marzo 04 de 2014 - 16:36:10

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	651483976	04/03/2014	10.040.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-047170-00000-0000

Fecha: 2014-03-05 16:08:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 74

CGO: 20975-844-210-5

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

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

Marzo 4 de 2014 - 16:36:17

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0024503

Bogotá D.C., Marzo 04 de 2014 - 16:36:10

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	651483976	04/03/2014	10.040.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
13 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	403.000.00
				\$403.000.00

SON: **CUATROCIENTOS TRES MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-047170- -00000-0000

Fecha: 2014-03-05 16:08:21 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 74

COLO: 20975-844-210-5

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

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

Marzo 4 de 2014 - 16:36:16

 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 61/515,553 (32) Fecha 2011/08/05 (33) País US (51) Int Cl: 01H 005/000 (71) Solicitante(s) DOW AGROSCIENCES LLC (72) Inventor(es) STEPHANIE L. BURTON Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2014/03/05 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2012/08/03 No. de solicitud PCT/US2012/049491 (87) Publicación internacional Fecha: 2013/02/14 N° publicación: WO 2013/022743 A1	
(54) Título: USO DE PROTEÍNA CRISTALINA INSECTICIDA DIG3 EN COMBINACIÓN CON Cry1Ab	

Resumen:

La presente invención incluye métodos y plantas para controlar al taladrador europeo del maíz, dichas plantas comprenden una proteina insecticida Cry1Ab y una proteina insecticida DIG-3 para retardar o prevenir el desarrollo de resistencia por el insecto.

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	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 ☐	

PI02-F08 (2009-11-18)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-047170-00000-0000

Fecha: 2014-03-05 16:08:21
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 74