

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 214**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2002 E 10184533 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2333061**

54 Título: **Administración de ARNbc a artrópodos**

30 Prioridad:

06.07.2001 AU PR621501

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.01.2018

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (100.0%)**

Black Mountain Science and Innovation Park,

Clunies Ross Street

Acton ACT 2601, AU

72 Inventor/es:

WHYARD, STEVEN;

CAMERON, FIONA HELEN;

MOGHADDAM, MINOO y

LOCKETT, TREVOR, J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 650 214 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Administración de ARNbc a artrópodos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente a ARNbc y a su uso en el silenciamiento génico. Además, la presente invención se refiere a métodos de administrar el ARNbc a insectos nocivos.

10 **Antecedentes de la invención**

La interferencia del ARN (ARNi) se considera como una defensa adaptativa de origen natural en al menos algunos organismos contra virus y la producción de transcritos anómalos, tales como los producidos por la movilidad del transposón (Bosher and Labouesse, 2000; Waterhouse *et al.*, 2001).

15 El proceso real por el cual el ARNbc media en la degradación del ARN diana no se entiende completamente, pero la maquinaria celular implicada se está identificando gradualmente. Se han observado ARNbc de longitud completa que se han degradado progresivamente a ARNbc de 21 nucleótidos, mediante una enzima denominada Dicer-1 (Elbashir *et al.*, 2001). Se cree que las proteínas Dicer-1 junto con sus ARNbc de 21 mer asociados, localiza ARN monocatenarios con identidad de secuencias y promueve la escisión de dianas de ARN monocatenario (Waterhouse *et al.*, 2001).

20 El intestino de *C. elegans* es un tubo sencillo constituido solo por 20 células (White, 1988). Para *C. elegans*, los ARNbc han de microinyectarse en los tejidos de las gónadas de gusanos adultos, pero se han desarrollado métodos más simples que evitan el tedioso método de la microinyección. Los nematodos se alimentan de bacterias *Escherichia coli* que expresan simultáneamente ARN de sentido directo y de sentido contrario que pueden adquirir ARNbc. De manera interesante, el ARNbc ingerido puede a continuación diseminarse desde el intestino para dirigirse a casi en todos los tejidos del nematodo (Timmons y Fire, 1998). Alternativamente, los gusanos pueden sumergirse en soluciones de ARNbc tanto con liposomas como con ARN puro (Tabara *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2001).

25 Los intestinos de los artrópodos comprenden muchos tipos diferentes de células, y son muy variables, ya que se han adaptado a las necesidades de cada especie y a sus únicas selecciones de dieta. La distancia evolutiva entre nematodos e insectos es considerable, y no existen motivos para suponer que, aunque la alimentación de ARNbc a *C. elegans* sea satisfactoria, pudiera ser una técnica fácilmente transferible a insectos. La presencia de barreras específicas en intestinos de insectos, tales como la membrana peritrófica, podría limitar o evitar también la absorción directa del ARNbc administrado por vía oral. El intestino medio de un artrópodo es el sitio primario de captación de nutrientes, y los ambientes internos del intestino medio de diferentes artrópodos pueden variar ampliamente. Por ejemplo, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* tiene una luz del intestino medio más bien ácida, aunque muchos insectos de la clase Lepidoptera (polillas y mariposas) tienen un ambiente del intestino medio muy básico, muy hostil.

40 El documento WO 01137654 sugiere un método que comprende poner en contacto insectos nocivos con ARNbc para reducir la expresión del ARNm de los insectos nocivos. Solamente se proporcionan resultados relativos a la inyección de ARNbc en larvas de *M. sexta*.

Sumario de la invención

50 En el presente documento se divulgan métodos en los que se suministra ARNbc a un insecto mediante un proceso que comprende alimentar el ARNbc al insecto.

También se divulgan en el presente documentos métodos en los que el ARNbc se recibe en una composición que comprende un agente estimulante de la transfección.

55 La presente invención se refiere a métodos en los que el ARNbc se administra mediante un proceso que comprende alimentar un organismo transgénico que expresa el ARNbc a un insecto. El organismo transgénico es una planta transgénica.

60 En particular, la presente invención se refiere a un método para reducir el nivel de un ARN diana y/o la producción de una proteína codificada mediante el ARN diana en una célula de un insecto nocivo que comprende alimentar al insecto con una planta transgénica que produce ARNbc durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicho ARNbc, o un producto de degradación del mismo, reduzca específicamente el nivel del ARN diana y/o la producción de la proteína codificada por el ARN diana en una célula del insecto, donde el ARN o la proteína diana es importante para la supervivencia, desarrollo, y/o reproducción del insecto, donde la porción del ARNbc que es bicatenaria tiene de 21 a 23 pares de base de longitud, y donde el insecto se encuentra en un estado de desarrollo larvario cuando se administra el ARNbc.

Preferentemente, el ADNbc comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con al menos una parte de la secuencia del ARN diana, más preferentemente, el ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97 % de identidad con al menos una parte de la secuencia del ARN diana, e incluso más preferentemente, el ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 99 % de identidad con una parte de la secuencia del ARN diana.

El ARNbc tiene una región de autocomplementariedad que le permite asumir una conformación bicatenaria en un insecto hospedador. Preferentemente, la región de autocomplementariedad corresponde a al menos aproximadamente 20 a aproximadamente 23 nucleótidos contiguos del ARN diana, más preferentemente, la secuencia de longitud completa del ARN diana.

El insecto puede ser cualquier especie. Preferentemente, el insecto es de importancia económica, tal como, por ejemplo, una plaga doméstica, una plaga agrícola, o un insecto que produce una sustancia o compuesto útil, tal como, por ejemplo, seda, una sustancia comestible (por ejemplo, miel) o una sustancia o compuesto medicinal (por ejemplo, una toxina o un veneno).

El insecto está en un estadio de desarrollo de larva cuando se administra el ARNbc. La presente invención abarca claramente determinar el efecto del ARNbc sobre el fenotipo de un insecto en un estadio de desarrollo posterior incluso cuando se administra el ARNbc en un estadio de desarrollo anterior.

Preferentemente, el ARN es ARNm.

En una realización adicional, la molécula de ARNbc se diseña basándose en la secuencia de nucleótidos de un EST que se ha derivado del ARNm aislado del insecto.

También se divulga en el presente documento una composición que comprende ARNbc y un agente promotor de la transfección, en el que dicho ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de un ARN diana, en el que dicho ARN diana es un ARN de insecto de origen natural, que codifica una proteína implicada en, y más preferentemente esencial para, el desarrollo del artrópodo, la función neural, la reproducción o la digestión.

Se divulga en el presente documento un método para controlar una plaga de insectos que comprende administrar al insecto ARNbc mediante un proceso que comprende alimentar al insecto con dicha planta transgénica que produce dicho ARNbc durante un tiempo y en unas condiciones suficientes para dicho ARNbc, uno de sus productos de degradación, para reducir específicamente el nivel de un ARN diana y/o la producción de una proteína codificada por el ARN diana en una célula del insecto, en el que el ARN diana o la proteína es importante para la supervivencia, el desarrollo y/o la reproducción del insecto.

Preferentemente, la proteína diana es esencial para el desarrollo, la función neural, la reproducción o la digestión del insecto.

Los insectos beneficiosos pueden protegerse del ataque de parásitos/patógenos mediante la administración de composiciones que contienen ARNbc adecuados. Colonias de insectos, en particular aquellas tales como abejas, gusanos de la seda, o incluso, depósitos de insectos de laboratorios, pueden protegerse de plagas parásitas o predatorias (por ejemplo, nematodos, ácaros), o patógenos víricos y microbianos.

Anteriormente, las técnicas de ARNbc han implicado el uso de construcciones en las que el ARNbc se aproxima a la longitud del marco de lectura abierto de un ARN o una de sus porciones sustanciales. Los presentes inventores han encontrado que no se requieren dichas construcciones de ARNbc largo a fin de obtener la interferencia del ARN. De forma sorprendente, los presentes inventores han encontrado que el ARNbc tiene como poco 21 nucleótidos que son capaces de silenciar el gen. Además, los presentes inventores han encontrado también, de forma sorprendente que el ARNbc que se había procesado y degradado parcialmente anteriormente en un organismo puede facilitar todavía la ARNi en otro insecto.

Por tanto, en otro aspecto, también se divulga en el presente documento un organismo transgénico que comprende un(os) ácido(s) nucleico(s) heterólogo(s) que se transcribe para producir un ARNbc, en el que la porción del ARNbc que es bicatenario tiene aproximadamente 21 a aproximadamente 23 pares de bases de longitud.

Preferentemente, el ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con al menos una porción de un ARN diana seleccionado entre el grupo que consiste en: un ARN de insecto de origen natural, un ARN de origen natural de un organismo que es un patógeno transportado por un insecto, un ARN de origen natural de un virus que infecta un insecto, una copia de ARN de un virus de ADN de origen natural que infecta un insecto, y un ARN de origen natural de una bacteria que infecta un insecto.

El organismo transgénico es una planta, y el ARNbc es preferentemente al menos un 90 % idéntico a al menos una porción de un ARN expresado en un insecto que se alimenta en la planta.

Preferentemente, el ARNbc se produce como un único marco de lectura abierto en el organismo transgénico, donde las secuencias de sentido directo y las secuencias de sentido contrario están flanqueadas por una secuencia sin relacionar que permite a las secuencias de sentido directo y de sentido contrario hibridarse para formar la molécula de ARNbc, formando la secuencia sin relacionar una estructura de tipo bucle.

5 Como será evidente, las características preferidas y las características de un aspecto de la invención pueden ser aplicables a muchos aspectos diferentes de la invención.

10 En la totalidad de la presente memoria descriptiva, se entenderá que la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un elemento, entero o etapa o grupo de elementos, enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa o grupo de elementos, enteros o etapas.

15 Cualquier discusión de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente a fines de proporcionar un contexto para la presente invención. No se debe tomar como un reconocimiento que algunas o todas estas materias forman parte de la base de la técnica anterior o eran un conocimiento general común en el campo relevante de la presente invención ya que existían antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

20 La invención se describirá a partir de ahora en el presente documento por medio de las siguientes Figuras y Ejemplos no limitantes.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1. Detección mediante la PCR del plásmido phspGUS[i/r] en insectos a los que se ha inyectado el plásmido como embriones tardíos. En las 7 hileras más a la izquierda, la presencia del transgén GUS en las moscas es evidente debido a la producción del producto de la PCR de 1 kb en todos los estadios de desarrollo. No hubo producto de la PCR en moscas silvestres, no transgénicas (wt). En el lado a la derecha del gel, solo L1 (larvas en el 1^{er} estadio) muestra evidencias del plásmido inyectado como se ha indicado por el producto de la PCR simple de 500 pb.

35 Figura 2. Silenciamiento del gen en larvas y adultos de *D. melanogaster* tras la alimentación de ARNbc a neonatos. Se sumergieron larvas de neonatos en una composición que comprendió un agente promotor de la transfección y ARNbc de GUS, y se evaluaron individuos o bien como larvas en el 2^o estadio (panel superior) o bien como adultos (panel inferior). Se evaluaron un total de 40 individuos para cada grupo. Cada transferencia representa un nivel de individuo de silenciamiento del gen GUS, con respecto a los controles sin tratar

40 Figura 3. Actividad GUS reducida tras la inmersión de las larvas de neonatos en una composición que comprende un agente promotor de la transfección y diferentes concentraciones de ARNbc. Cada transferencia representa la actividad GUS de un individuo adulto de mosca, como un porcentaje como un porcentaje de controles GUS sin tratar. Se evaluaron un total de 20 moscas para cada concentración de ARNbc.

45 Figura 4. Eficacia de diferentes agentes de promoción de la transfección sobre la administración oral de ARNbc a larvas de neonatos de *D. melanogaster*. Se sumergieron un total de 20 larvas en diferentes agentes de promoción de la transfección que contenían 1 ug/ul de ARNbc, y se evaluó la actividad GUS en larvas del 2^o estadio.

50 Figura 5. Silenciamiento del gen en larvas de *D. melanogaster* tras alimentar a neonatos con ARNbc sin la presencia de espermidina en la mezcla de ARN. Se sumergieron larvas de neonatos en una composición que comprendía un agente promotor de la transfección y ARNbc de GUS, y se evaluaron los individuos como larvas del 2^o estadio. Se evaluaron un total de 25 individuos, representando cada transferencia el silenciamiento del gen GUS del nivel de un individuo, con respecto a los controles sin tratar.

55 Figura 6. Silenciamiento del gen GUS en *D. melanogaster* alimentada con extractos de ARN derivados de adultos de *D. melanogaster* a los que se había inyectado el plásmido de expresión del ARNbc phspGUS[i/r] como embriones. El panel superior ilustra el intervalo de silenciamiento del gen en larvas del 3^{er} estadio alimentadas previamente con el ARN extraído, y el panel inferior muestra el intervalo de silenciamiento del gen observado en moscas adultas. Cada transferencia representa un único insecto individual. Se evaluaron un total de 20 individuos para cada grupo.

60 Descripción detallada de la invención

Técnicas generales

65 Salvo que se indique otra cosa, las técnicas de ADN recombinante utilizadas en la presente invención son procedimientos normalizados bien conocidos por los expertos en la materia. Dichas técnicas se describen y explican

a través de la literatura en fuentes como, J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volúmenes Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editores), DNA Cloning: A Practical Approach, Volúmenes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), y F.M. Ausubel et al. (Editores), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, incluyendo todas las actualizaciones hasta el momento).

Los métodos normalizados para la producción de insectos transgénicos se detallan en "Insect Transgenesis - Methods and Applications" (Ed. A.M. Handler y A.A. James, CRC Press, Londres, 2000).

ARNbc

Tal como se usa en el presente documento "ARNbc" o "ARNi" se refiere a una estructura de polirribonucleótido formada tanto mediante una hebra de ARN autocomplementaria como al menos dos hebras de ARN complementarias. El grado de complementariedad, en otras palabras, el % de identidad, no tiene que ser necesariamente el 100 %. Más bien, debe ser suficiente para permitir la formación de una estructura bicatenaria en las condiciones empleadas.

Preferentemente, el % de identidad de un polirribonucleótido se determina mediante GAP (Needleman y Wunsch, 1970) (programa GCG) usando los escenarios por defecto, en el que la secuencia citada tiene al menos de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos aproximadamente 21 nucleótidos. En otra realización, la secuencia citada tiene al menos 150 nucleótidos de longitud, y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 150 nucleótidos. En una realización adicional, la secuencia citada tiene al menos 300 nucleótidos de longitud y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre una región de al menos 300 nucleótidos. En otra realización más, la secuencia citada corresponde a la longitud completa del ARN diana y el análisis GAP alinea las dos secuencias sobre la longitud completa del ARN diana.

El diseño y la producción de moléculas de ARNbc adecuadas para la presente invención esta también comprendido en la capacidad de una persona experta en la materia, considerando concretamente Dougherty y Parks (1995), Waterhouse et al. (1998), Elbashir et al. (2001), documentos WO 99/32619, WO 99/53050 y WO 99/49029.

De forma conveniente, se puede producir el ARNbc a partir de un marco de lectura abierto en una célula hospedadora recombinante en el que las secuencias de sentido directo y las secuencias de sentido contrario están flanqueadas por una secuencia no relacionada que permite a las secuencias de sentido directo y de sentido contrario hibridarse para formar la molécula de ARNbc, formando la secuencia sin relacionar una estructura de tipo bucle.

Las dos hebras se pueden expresar también por separado como dos transcritos, codificando uno la hebra de sentido directo y codificando el otro la hebra de sentido contrario.

Puede iniciarse la formación del duplete de ARN tanto en el interior como en el exterior de la célula. El ARNbc puede ser parcial o completamente bicatenario.

El ARNbc expresado en la planta transgénica no necesita ser de longitud completa con respecto tanto a su producto de transcripción primario como al ARN procesado completamente. Generalmente, se puede usar una mayor identidad para compensar el uso de una secuencia más corta. Además, el ARNbc puede comprender regiones monocatenarias así como, por ejemplo, el ARNbc puede ser parcial o completamente bicatenario. La región bicatenaria del ARNbc puede tener una longitud de al menos aproximadamente 21 a aproximadamente 23 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 21 a 50 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 pares de bases, opcionalmente una secuencia de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 y opcionalmente una secuencia de aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 o más pares de bases, hasta la molécula que es bicatenaria para su longitud completa que corresponde en tamaño a una molécula de ARN diana de longitud completa.

Tal como se usa en el presente documento, el término "reduce específicamente el nivel de un ARN diana y/o la producción de una proteína diana codificada por el ARN" y sus variaciones, se refiere a la secuencia de una porción de una hebra del ARNbc que es suficientemente idéntica al ARN diana de tal manera que la presencia del ARNbc en una célula reduce el nivel en estado estacionario y/o la producción de dicho ARN. En muchos casos, el ARN diana será ARNm, y la presencia del ARNbc en una célula que produce el ARNm dará como resultado una reducción en la producción de dicha proteína. Preferentemente, esta acumulación o producción se reduce al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 50 %, incluso más preferentemente al menos un 75 %, incluso además más preferentemente al menos un 95 % y lo más preferentemente 100 % cuando se compara con una célula natural.

Las consecuencias de la inhibición pueden confirmarse mediante el examen de las propiedades externas de la

célula u organismo o mediante técnicas bioquímicas tales como, pero no de forma limitativa, hibridación Northern, transcripción inversa, control de la expresión génica con una micromatriz, unión de anticuerpos, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), transferencia Western, radioinmunoensayo (RIA), y otros inmunoensayos.

5

Agente promotor de la transfección

Los agentes promotores de la transfección utilizados para facilitar la captación de ácidos nucleicos en células vivas son bien conocidos en la técnica. Los reactivos que potencian la transfección incluyen familias químicas de los tipos; policationes, dendrímeros, DEAE Dextrano, copolímeros en bloque y lípidos catiónicos. Como se divulga en el presente documento, el agente promotor de la transfección es un compuesto (o formulación) que contiene lípidos, que proporciona una región hidrófila cargada positivamente y una región hidrófoba acil grasa que permite el autoensamblaje en solución acuosa en vesículas conocidas generalmente como micelas o liposomas, así como lipopoliaminas.

10

15

La formulación de polinucleótidos encapsulados en compuestos que contienen lípidos es conocida en la técnica y se describe en, por ejemplo, "Liposomes: from physical structure to therapeutic applications" (Ed. C.G. Knight. Elsevier Press, 1981).

20

Tal como se usa en los siguientes ejemplos comparativos;

1) Cellfectin se refiere a una formulación en liposomas 1:1.5 (M/M) del lípido catiónico N, N^I, N^{II}, N^{III}-tetrametil-N, N^I, N^{II}, N^{III}-tetrapalmitilespermina (TM-TPS) y dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada con membrana;

25

2) Lipofectina se refiere a una formulación en liposomas 1:1 (p/p) del lípido catiónico cloruro de N-[1-(2, 3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE);

3) Lipofectamina se refiere a una formulación en liposomas 3:1 (p/p) del lípido policationico trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminacarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA) y el lípido neutro dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) en agua filtrada con membrana;

30

4) DMRIE-C se refiere a una formulación en liposomas 1:1 (M/M) del lípido catiónico DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietil amonio) y colesterol en agua filtrada con membrana;

5) DOTAP se refiere al lípido catiónico metilsulfato de (N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetil-amonio);

6) CS096: K3C10TChol (un grupo de cabeza de trilisina con forma de T con un separador alifático C10 unido a un dominio hidrófobo de colesterol mediante una molécula Tris);

35

7) CS102: K3C10TL3 (trilisina con forma de T con un separador alifático C10 unido a tres ácidos grasos alifáticos (C12) mediante una molécula Tris);

8) CS129: K3C7TS3 (trilisina con forma de T con un separador alifático C7 unido a tres ácidos grasos alifáticos (C18) mediante una molécula Tris);

40

9) CS078: K2C10TL3 (dilisina con un separador alifático C10 unido a tres ácidos grasos alifáticos (C12) mediante una molécula Tris);

10) CS051: K3GTL3 (trilisina con un separador de glicina más corto unido a tres ácidos grasos alifáticos (C12) mediante una molécula Tris);

45

11) CS027: KATP3 (monolisina con un separador de alanina corto unido a tres a tres ácidos grasos alifáticos (C16) mediante una molécula Tris);

12) CS041: K3ATL2 (trilisina con un separador de alanina corto unido a dos ácidos grasos alifáticos (C16) mediante una molécula Tris);

13) CS042: K3ATL3 (trilisina con un separador de alanina corto unido a tres ácidos grasos alifáticos (C16) mediante una molécula Tris);

50

14) CS060: K3C6TL3 (trilisina con un separador alifático C6 unido a tres ácidos grasos alifáticos (C16) mediante una molécula Tris);

15) CS039: K3ATM3 (trilisina con un separador de alanina corto unido a tres ácidos grasos alifáticos (C16) mediante una molécula Tris);

16) CS015: K3ATP3 (trilisina con un separador de alanina corto unido a tres ácidos grasos alifáticos (C16) mediante una molécula Tris).

55

Hubo alguna variación en la eficacia de los reactivos de transfección ensayados en las especies de artrópodos que se examinaron en el siguiente ejemplo comparativo.

Vehículos agrícolamente aceptables

60

Se conocen en la técnica composiciones agrícolamente adecuadas y/o ambientalmente aceptables para el control de artrópodos. Las composiciones agrícolas para el control de plagas de artrópodos de plantas y/o animales son preferentemente adecuadas para el uso agrícola para la dispersión en los campos. Preferentemente, las composiciones para el control de otras plagas de artrópodos deben ser ambientalmente aceptables.

65

Los vehículos agrícolamente aceptables se denominan también en el presente documento un "excipiente". Un

excipiente puede ser cualquier material que el animal, planta o entorno que se va a tratar puede tolerar. Además, el excipiente debe ser tal que la composición de la presente invención sea todavía capaz de producir el silenciamiento génico. Los Ejemplos de dichos excipientes incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, dextrosa u otras soluciones de agar, solución de Hank, y otras soluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas, tampón fosfato, tampón bicarbonato y tampón Tris. Además, la composición puede incluir compuestos que aumentan la vida media de una composición. Dichos compuestos son bien conocidos por las personas expertas en la materia.

Las composiciones de la invención pueden comprender también, agentes seleccionados entre; pesticidas convencionales, estimulantes del gusto, agentes espesantes, agentes de cribado del UV, abrillantadores ópticos, dispersantes, agentes de flujo, agentes de propagación y agentes adherentes. Preferentemente, la composición se formula de tal manera que persista en el entorno durante un lapso de tiempo adecuado para permitir que esta se ingiera por un artrópodo diana o se ponga en contacto con el artrópodo diana.

Artrópodos

El artrópodo es cualquier organismo clasificado en el grupo taxonómico..

Los ejemplos de la clase Insecta incluyen, pero no de forma limitativa, miembros de los órdenes Coleoptera (e.g. Anobium, Ceutorhynchus, Rhynchophorus, Cospopolites, Lissorhoptrus, Meligethes, Hypothenemus, Hylesinus, Acalymma, Lema, Psylliodes, Leptinotarsa, Gonocephalum, Agriotes, Dermolepida, Heteronychus, Phaedon, Tribolium, Sitophilus, Diabrotica, Anthonomus o Anthrenus spp.), Lepidoptera (por ejemplo, Ephestia, Mamestra, Earias, Pectinophora, Ostrinia, Trichoplusia, Pieris, Laphygma, Agrotis, Amathes, Wiseana, Tryporyza, Diatraea, Sporganothis, Cydia, Archips, Plutella, Chilo, Heliothis, Helicoverpa (especialmente Helicoverpa armigera), Spodoptera o Tineola ssp.), Diptera (por ejemplo, Musca, Aedes, Anopheles, Culex, Glossina, Simulium, Stomoxys, Haematobia, Tabanus, Hydrotaea, Lucilia, Chrysomia, Callitroga, Dermatobia, Gasterophilus, Hypoderma, Hylemyia, Atherigona, Chlorops, Phytomyza, Ceratitis, Liriomyza, y Melophagus spp.), Phthiraptera, Hemiptera (por ejemplo, Aphis, Bemisia, Phorodon, Aeneoplamia, Empoasca, Parkinsiella, Pyrilla, Aonidiella, Coccus, Pseudococcus, Helopeltis, Lygus, Dysdercus, Oxycarenus, Nezara, Aleurodes, Triatoma, Rhodnius, Psylla, Myzus, Megoura, Phylloxera, Adelyes, Niloparvata, Nephrotettix o Cimex spp.), Orthoptera (por ejemplo, Locusta, Gryllus, Schistocerca o Acheta spp.), Dictyoptera (por ejemplo, Blattella, Periplaneta o Blatta spp.), Hymenoptera (por ejemplo, Athalia, Cephus, Atta, Lasius, Solenopsis o Monomorium spp.), Isoptera (por ejemplo, Odontotermes y Reticulitermes spp.), Siphonaptera (por ejemplo, Ctenocephalides o Pulex spp.), Thysanura (por ejemplo, Lepisma spp.), Dermaptera (por ejemplo, Forficula spp.) y Psocoptera (por ejemplo, Peripsocus spp.) y Thysanoptera (por ejemplo, Thrips tabaci). En una realización, el insecto no es Drosophila sp.

Vectores recombinantes

Los polinucleótidos que codifican el ARNbc útil para los métodos y/o composiciones de la presente invención se pueden insertar en un vector recombinante. El vector puede ser tanto ARN como ADN, ya sea procariota o eucariota, y normalmente es un virus o un plásmido.

Un tipo de vector recombinante comprende un polinucleótido que codifica un ARNbc unido operativamente a un vector de expresión. De forma alternativa, las dos hebras del ARNbc están codificadas por marcos de lectura abiertos separados. La frase unido operativamente se refiere a la inserción de una molécula de polinucleótido en un vector de expresión de una manera tal que la molécula pueda expresarse cuando se transforma en una célula hospedadora. Tal como se usa en el presente documento, un vector de expresión es un vector de ADN o de ARN que es capaz de transformar una célula hospedadora y de efectuar la expresión de una(s) molécula(s) de polinucleótido(s) especificada(s). Preferentemente, el vector de expresión es también capaz de replicarse en la célula hospedadora. Los vectores de expresión pueden ser tanto procariotas como eucariotas, y son normalmente virus o plásmidos. Los vectores de expresión de divulgados en el presente documento incluyen algunos vectores (es decir, expresión génica directa) en células recombinantes de la presente invención, incluyendo en células bacterianas, fúngicas, de endoparásitos, artrópodos, otros animales, y vegetales.

En particular, los vectores de expresión de la presente invención contienen secuencias reguladoras tales como secuencias control de la transcripción, orígenes de replicación, y otras secuencias reguladoras que son compatibles con la célula recombinante y que controlan la expresión del polinucleótido que codifica un ARNbc o una de sus hebras. En particular, las moléculas recombinantes de la presente invención incluyen secuencias control de la transcripción. Las secuencias control de la transcripción son secuencias que controlan el inicio, el alargamiento, y la terminación de la transcripción. Las secuencias control de la transcripción particularmente importantes son aquellas que controlan el inicio de la transcripción, tales como secuencias promotoras, potenciadoras, operadoras y represoras. Las secuencias control de la transcripción adecuadas incluyen cualquier secuencia control de la transcripción que pueda funcionar en al menos una de las células recombinantes de la presente invención. Los expertos en la materia conocen varias secuencias control de la transcripción. Las secuencias control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores y potenciadores específicos de tejidos.

Un vector de expresión divulgado en el presente documento puede ser un baculovirus. Por "baculovirus" se entiende

5 cualquier virus de la familia Baculoviridae, tal como un virus de la polihedrosis nuclear (VPN). Los baculovirus son un grupo grande de virus relacionados evolutivamente, que infecta solo artrópodos; a su vez, algunos baculovirus infectan solo insectos que son plagas de cultivos agrícolas y forestales comercialmente importantes, mientras que se sabe que otros infectan específicamente otras plagas de insectos. Debido a que los baculovirus infectan solo artrópodos, representan poco o ningún riesgo es seres humanos, plantas, o el medio ambiente.

10 Ejemplos de virus de ADN adecuados, además de los Baculoviridae están los virus entomopox (VPE), tales como VPE de *Melolontha melonotha*, VPE de *Amsacta moorei*, VPE de *Locusta migratoria*, VPE de *Melanoplus sanguinipes*, VPE de *Schistocerca gregaria*, VPE de *Aedes aegypti*, y VPE de *Chironomus luridus*. Otros virus de ADN adecuados son los virus de la granulosis (VG). Los virus de ARN adecuados incluyen togavirus, flavivirus, picornavirus, virus de la polihedrosis citoplásmica (VPC) y similares. La subfamilia de virus de ADN bicatenarios Eubaculovirinae incluye dos géneros VPN y VG, que son particularmente útiles para el control biológico debido a que pueden producir cuerpos de oclusión en su ciclo de vida. Los ejemplos de VG incluyen VG de *Cydia pomonella* (VG de la polilla de la manzana), VG de *Pieris brassicae*, VG de *Trichoplusia ni*, VG de *Artogeia rapae*, y VG de *Plodia interpunctella* (polilla india de la harina).

20 Los baculovirus adecuados para llevar a la práctica los métodos divulgados en el presente documento pueden estar ocluidos o no ocluidos. Los virus de la polihedrosis nuclear ("VPN") son un subgrupo de baculovirus, que están "ocluídos". Estos es, un rasgo característico del grupo VPN es que muchos viriones están incluidos en una matriz de proteína cristalina denominada "cuerpo de oclusión" Los ejemplos de VPN incluyen VPN de *Lymantria dispar* (VPN de polilla gitana), VPN de *Autographa californica*, *Anagrapha falcifera* (VPN oruga del apio NPV), VPN de *Spodoptera littoralis*, VPN de *Spodoptera frugiperda*, VPN de *Heliothis armigera*, VPN de *Mamestra brassicae*, VPN de *Choristoneura fumiferana*, VPN de *Trichoplusia ni*, VPN de *Helicoverpa zea*, y VPN de *Rachiplusia ou*. Para uso de campo, son a menudo preferibles los virus ocluidos debido a su mayor estabilidad ya que la polihedrina vírica reviste proporciona protección para las nucleocápsidas infecciosas encerradas.

30 Entre los ilustrativos, los baculovirus útiles están aquellos aislados de *Anagrapha falcifera*, *Anticarsia gemmatalis*, *Buzura suppressoria*, *Cydia pomonella*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis armigera*, *Manestia brassicae*, *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua*, *Spodoptera littoralis*, y *Spodoptera litura*. Un baculovirus de "VPN" particularmente útil es VPNAc, que es un virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*. *Autographa californica* es de particular interés debido a que varias especies nocivas de los géneros *Spodoptera*, *Trichoplusia* y *Heliothis* son susceptibles a este virus.

35 Plantas transgénicas

El término "planta" se refiere a plantas completas, órganos de plantas (por ejemplo, hojas, raíces de tallos, etc.) semillas, células vegetales y similares. Las plantas contempladas para el uso en la práctica de la presente invención incluyen plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las plantas dicotiledóneas ilustrativas incluyen algodón, semillas oleaginosas y otras brasicacea, tomate, tabaco, patata, guisante y soja. Las plantas monocotiledóneas ilustrativas incluyen trigo, maíz, cebada, arroz, y sorgo. La elección de las especies de plantas se determina por el uso previsto de la planta o de sus partes y por la manejabilidad de las especies de plantas para la transformación.

45 Las plantas transgénicas, como se definen en el contexto de la presente invención incluyen plantas (así como partes y células de dichas plantas) y su progenie que se han modificado genéticamente utilizando técnicas de ADN recombinante para producir al menos un ARNbc útil para los métodos de la presente invención en la planta u órgano de la planta deseado.

50 Un polinucleótido que codifica un ARNbc, o dos polinucleótidos diferentes que codifican hebras individuales de ARNbc, pueden expresarse constitutivamente en las plantas transgénicas durante todos los estadios de desarrollo. Dependiendo del uso de la planta u órganos de la planta, el ARNbc puede producirse de una manera específica del estadio. Además, dependiendo del uso, los polinucleótidos pueden expresarse específicamente en tejidos o inducirse en condiciones ambientales específicas tales como, por ejemplo, heridas por plagas de artrópodos.

55 Las secuencias reguladoras que se conocen o se encuentra que producen la expresión de un(os) polinucleótido(s) que codifican un ARNbc de interés en plantas se pueden usar en la presente invención. La elección de las secuencias reguladoras usadas depende del cultivo diana y/o del órgano diana de interés y del modo de expresión deseado (por ejemplo, inducido de forma constitutiva o específico de tejido). Dichas secuencias reguladoras pueden obtenerse a partir de plantas o de virus vegetales, o se pueden sintetizar químicamente. Dichas secuencias reguladoras son bien conocidas por los expertos en la materia.

60 Otras secuencias reguladoras tales como secuencias terminadoras y señales de poliadenilación incluyen cualquiera de dichas secuencias funcionando como tales en plantas, la elección de las cuales será conocida y estará orientada por el técnico experto. Un ejemplo de dichas secuencias es la región 3' flanqueante del gen de la nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*.

65 Algunas técnicas están disponibles para la introducción de una construcción de expresión que contiene un(os)

polinucleótido(s) que codifican un ARNbc de interés en las plantas diana. Dichas técnicas incluyen, pero no de forma limitativa, la transformación de protoplastos utilizando el método del calcio/poli-etilenglicol, la electroporación y la microinyección o el bombardeo de partículas (revestidas). Además de estos métodos directos, así denominados, de transformación del ADN, están ampliamente disponibles sistemas de transformación que implican vectores, tales como vectores víricos y bacterianos (procedentes, por ejemplo, del género *Agrobacterium*). Tras la selección y/o el cribado, los protoplastos, células o partes de plantas que se han transformado pueden regenerarse en plantas completas, utilizando los métodos conocidos en la materia. La elección de las técnicas de transformación y/o regeneración no es crítica para la presente invención.

10 Ejemplos

Métodos

ARN de GUS en plásmidos de transcripción in vitro

15 Se usaron métodos de clonación de genes normalizados (Sambrook *et al.*, 1989) para realizar las construcciones génicas. El gen GUS que codifica la enzima bacteriana β -glucuronidasa se amplificó mediante la PCR a partir del plásmido pBacPAK8-GUS (Clonetech) usando los cebadores EcoGusF (GAATTCATGGTCCGTCCTGTAGAAACC) (SEQ ID NO: 1) y EcoGusR (GAATCCCCACCGAGGCTGTAGC) (SEQ ID NO: 2). El producto de la PCR de 1,87 kb se subclonó en el plásmido pGEM3Zf(+) en el sitio EcoR I utilizando los enlazadores EcoR I sobre los cebadores, creando dos plásmidos: pGEM3Z-GUS[s] (orientación de sentido directo del gen GUS, con respecto al promotor T7); y pGEM3Z-GUS[a/s] (orientación de sentido contrario del gen GUS, con respecto al promotor T7). Ambos plásmidos se digirieron con la endonucleasa de restricción EcoRV, seguido por la religadura del plásmido, para eliminar los 213 pb del ORF de GUS. Esto garantizó que no se produciría enzima GUS funcional si se traducía el ARN de sentido directo de GUS. Los plásmidos resultantes, denominados pGEM3Z- Δ GUS[s] y pGEM3Z- Δ GUS[a/s], se usaron para la transcripción *in vitro* de los ARN de sentido directo y sentido contrario de GUS.

ARN de GUS en las construcciones de expresión in vivo

30 Se consiguió la expresión *in vivo* del ARN de sentido directo, sentido contrario y de repetición invertida en embriones de *D. melanogaster* preparando tres plásmidos que expresaban el ARN bajo el control del promotor de choque térmico hsp70 de *D. melanogaster*. Se amplificaron un fragmento de 1 kb que contenía el promotor hsp70, un sitio pequeño de clonación múltiple, y la señal de poliadenilación del choque térmico utilizando la PCR a partir del plásmido pCaSpeR-hs (Thummel *et al.*, 1988) utilizando los cebadores de hsp70F (GAATTCTAGAATCCCCAAAACAACTGG) (SEQ ID NO: 3) y de hst70R (GGATCTGACCGTCCATCGCAATAAAATGAGCC) (SEQ ID NO: 4).

40 El producto de la PCR de 1 kb se clonó en pGEM-T-Easy, dando como resultado en el plásmido pGEM-Dmhsp70. El gen GUS se escindió del plásmido pGEM3Z-GUS[s] utilizando la endonucleasa de restricción EcoRI, y se ligó en el plásmido pGEM-Dmhsp70, linealizado previamente con EcoRI. Esta ligadura dio como resultado dos plásmidos, phspGUS[s], con el gen GUS en la orientación de sentido directo con respecto al promotor, y phspGUS[a/s], con el gen GUS en la orientación de sentido contrario. Se preparó un tercer plásmido pHSP70GUS[i/r], que expresaba un ARNbc de repetición invertida específico del marco de lectura abierto (ORF) del GUS, ligando un fragmento de ADN de 558 pb, que representa el extremo 5' del gen GUS, al extremo 3' del ORF de GUS. La secuencia de codificación resultante, cuando se transcribe, podría producir un transcrito con secuencias complementarias en los extremos 5' y 3' que podrían plegarse hacia atrás sobre sí mismos para formar un ARNbc en horquilla, con una secuencia bicatenaria de 558 bases.

vATPasa de H. armigera en plásmidos de transcripción in vitro

50 Se amplificó un segmento de 386 pb de un presunto gen de la vATPasa a partir de ADN genómico de *H. armigera* utilizando los dos cebadores de HaATP1f (CCGAAAATCCAATCTACGGACCC) (SEQ ID NO: 5) y HaATP1r (CGACGAATAACCTGGGCTGTTGC) (SEQ ID NO: 6). Los cebadores se basaron en la secuencia de ADN de un presunto gen de la vATPasa identificado a partir de un clon EST de *H. armigera* que mostró un 97 % de identidad de la secuencia con el gen de la vATPasa de *Heliothis virescens* (nº de registro del GenBank L16884). El producto de 386 pb se amplificó usando un termociclador Perkin Elmer 2400 utilizando las siguientes condiciones de la PCR: 1 ciclo de 95°C durante 5 min, 25 ciclos de 95°C x 30 s, 55°C x 30 s, 72°C x 30 s, y 1 ciclo de 72°C x 10 min., 25°C x 5 min. El producto de la PCR se ligó en el vector de clonación pGem-T-Easy (Promega) en ambas orientaciones con respecto al promotor T7, produciendo los plásmidos pGEMHaATPasa1 [s] y pGEMHaATPasa1 [a/s], que se usaron para producir los ARN de la vATPasa de sentido directo y sentido contrario transcritos *in vitro*.

Transformación de Drosophila

65 El gen GUS que codifica la enzima bacteriana β -glucuronidasa, se insertó en el vector de transformación del elemento P pCaSpeR-act, que colocó el gen GUS bajo el control del promotor act5c. A continuación se introdujo el gen GUS en la línea germinal de *Drosophila* mediante la transformación del elemento P (Spradling y Rubin, 1982).

Se retrocruzaron los transformantes a cepas equilibradoras de cromosomas para identificar en cual cromosoma se había insertado el transgén. Se llevaron a cabo los análisis de transferencia Southern de ADN de moscas G2 para determinar el número de copias del transgén en el depósito transgénico de GUS.

5 *Preparación de ARN bicatenario mediante transcripción in vitro*

10 Los plásmidos pGEM3Z-ΔGUS[s] y -ΔGUS [a/s] se linealizaron usando *Bam* HI. El ARN de sentido directo y de sentido contrario se preparó utilizando la ARN polimerasa T7 utilizando el Sistema de Producción de ARN a Gran Escala Promega's RiboMAX, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para producir el ARNbc, se mezclaron los ARN de sentido directo y de sentido contrario se mezclaron en cantidades equimolares y se hibridaron durante 10 minutos a 37°C. Se extrajo el ARN con fenol/cloroformo y a continuación, cloroformo, precipitado con etanol, y se volvió a suspender en Tris-HCl 10 mM, pH 9. Se confirmó la formación de ARNbc resolviendo los ARN hibridados y no hibridados en un gel de agarosa al 1,0 % en TBE (Tris-borato90 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0).

15 Para producir el ARNbc de la vATPasa, los *plásmidos* pGEMHaATPasa1 [s] y pGEMHaATPasa1[a/s] se linealizaron con *Bam* HI y se produjeron ARN de sentido directo, sentido contrario, y bicatenario, como se ha descrito anteriormente.

20 *Inyecciones de embriones*

25 Embriones preblastodérmicos de *D. melanogaster* se microinyectaron con ADN o ARN de acuerdo con el método de Spradling y Rubin (1982) y se microinyectaron embriones de *H. armigera* como se ha descrito anteriormente (Pinkerton et al., 1996). Se inyectó a los embriones ARN de sentido directo, de sentido contrario, y se disolvió ARNbc en tampón de inyección (KCl 5 mM, PO₄ 0,1 mM, pH 6.8) a una concentración de 100 ng/ul. Se inyectaron aproximadamente 50 pg de ARN en cada embrión. Los embriones del control negativo se inyectaron simuladamente solo con tampón de inyección. Los embriones inyectados con ADN se inyectaron con aproximadamente 250 pg de ADN plásmido. Se dejó que los embriones se desarrollaran completamente durante 16 h, y o bien se congelaron inmediatamente para el uso en posteriores ensayos de GUS o bien se les permitió eclosionar y las larvas sobrevivientes se transfirieron a viales que contenían medio de cultivo. Las larvas individuales y los insectos adultos se recogieron y se congelaron inmediatamente a -80 °C.

Administración oral de ARNbc

35 Larvas del 1^{er} estadio (*Drosophila melanogaster* o *Helicoverpa armigera*) eclosionadas recientemente se transfirieron a placas de 96 pocillos en grupos de 10 - 25, y se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los ARNbc de sentido directo, sentido contrario e hibridados (0,05 - 2 ug) se mezclaron con 1 ul de agente promotor de la transfección, espermidina 0,5 mM o sulfato de protamina (0,5 mg/mg de ADN), en un volumen de 20 ul de PBS o sacarosa tamponada (sacarosa al 20 %, Tris 10 mM, pH 7,5). Después de 30 min, se añadió colorante alimentario rojo a la mezcla de agente promotor de la transfección-ARN y se añadió la mezcla a las larvas de neonatos. Las larvas permanecieron inmersas en las mezclas durante 1 h, y a continuación se transfirieron las larvas a medio de cría. Aproximadamente un 90 % de los individuos tratados de esta manera contenían colorante alimentario rojo en sus intestinos, indicando que la mayoría habían ingerido la mezcla.

45 *Condiciones de cría*

D. melanogaster se crío a 25°C en agar de levadura normalizado como medio de cultivo de *Drosophila* (Roberts y Standen, 1998). *H. armigera* se crío como se ha descrito anteriormente (Duve et al., 1997).

50 *Ensayo de GUS*

55 Los insectos se homogeneizaron en tampón de homogeneización (NaHPO₄ 50 mM, pH 7,0, β-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, lauril sarcosina de sodio al 0,1 %, Triton X-100 al 0,1 %), y se midió la actividad enzimática de GUS utilizando ácido 4-metilumbeliferil β-D-glucurónico como sustrato en ensayos fluorométricos como se ha descrito (Gallagher, 1992). Se llevaron a cabo los ensayos de proteínas utilizando el ensayo Bradford (Bradford, 1976). Se tiñeron los insectos diseccionados para la actividad de GUS utilizando ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucurónico (X-GlcU) como se ha descrito (Naleway, 1992).

Resultados

60 *Caracterización de la cepa transgénica de GUS*

65 Los análisis genéticos normalizados y los análisis de transferencia Southern confirmaron que el depósito transgénico de GUS de *D. melanogaster* contenía una única inserción de la construcción act5c-GUS, localizada en el cromosoma III (no se muestran los resultados). El gen GUS se expresó constitutivamente en todo el organismo, observándose la extensa actividad de GUS en la grasa corporal y las gónadas masculinas y femeninas (no se muestran los datos). Los ensayos fluorométricos de la enzima GUS confirmaron que todos los estadios de desarrollo

de los GUS transgénicos tuvieron al menos 18 veces más actividad de GUS que sus análogos no transformados (Tabla 1). *Silenciamiento del gen GUS en embriones de Drosophila utilizando ARN bicatenario transcrito e hibridado in vitro*

5 Tras la inyección del ARN en embriones preblastodérmicos, se permitió a los embriones desarrollarse durante 16 h, justo antes de la eclosión antes de que se evaluaran para la actividad de GUS. Los embriones se combinaron en grupos de 25 mientras que las larvas y los adultos se evaluaron individualmente para la actividad de GUS. Aunque no fue posible determinar que embriones individuales fueron los más afectados por las inyecciones de ARN, resultó evidente que las hebras de sentido directo y de sentido contrario tuvieron poco o ningún efecto sobre la actividad de GUS, mientras que aquellos embriones a los que se había inyectado ARNbc mostraron significativas reducciones en la actividad de GUS (Tabla 2). Los análisis de transferencia Northern del ARN procedentes de embriones inyectados simulados y embriones inyectados con ARNbc confirmaron que la reducción de la actividad de GUS estuvo correlacionada con la reducción de los transcritos de GUS en los embriones inyectados con ARNbc (no se muestran los resultados). De forma interesante, el silenciamiento de la expresión del gen GUS persistió a lo largo del desarrollo, dado que las larvas y los adultos que se habían tratado con ARNbc como los embriones mostraron todavía sustanciales reducciones en la actividad de GUS. Estos resultados confirmaron que la expresión del gen GUS podría reducirse eficazmente mediante la administración directa de ARNbc preparado *in vitro* en los embriones.

Tabla 1. Actividad de GUS en *D. melanogaster* transgénica y no transgénica

Estadio de desarrollo	Actividad de GUS (pmol MU/min/individual)		Veces de aumento en la actividad de GUS en embriones transgénicos
	No transgénicos	Transgénicos	
embriones	74 ± 20	1980 ± 152	27
Larva en el 3 ^{er} estadio	417 ± 34	7390 ± 780	18
adulto	574 ± 55	12620 ± 827	22

Tabla 2. Reducción en la actividad de GUS tras la inyección embrionaria de ARN a embriones de la cepa GUS de *D. melanogaster*. Los valores representan el porcentaje de disminución (± error estándar) de la actividad de GUS con respecto a los embriones inyectados simulados.

	Reducción en la actividad de GUS tras la administración de ARN (%)		
	Embriones ¹	Larvas ²	Adultos ²
ARN de sentido directo	2 ± 1	3 ± 2	5 ± 3
ARN de sentido contrario	9 ± 4	7 ± 5	15 ± 8
ARNbc	65 ± 14	41 ± 7	32 ± 5

¹ Los valores representan los resultados de 3 copias distintas, cada una de 25 embriones.

² Los valores representan los resultados de 3 copias distintas de 10 individuos cada una.

Silenciamiento del gen GUS en embriones de Drosophila utilizando ARNbc producido in vivo (comparativo)

30 Se inyectó a embriones de la cepa GUS con los plásmidos phspGUS[s], phspGUS[a/s], y phspGUS[i/r], y a continuación se les mantuvo en choque térmico 6 h después de la inyección. Los embriones se recogieron justo antes de eclosionar (desarrollo de 16 h) y se evaluaron para la actividad de GUS. Los embriones inyectados con phspGUS[s] no mostraron diferencias en la actividad de GUS, mientras que los embriones inyectados con phspGUS[a/s] mostraron una disminución del 12 % en la actividad de GUS con respecto a los controles inyectados simulados (Tabla 3). Los embriones inyectados con la construcción de expresión del ARN de repetición invertida, phspGUS[i/r], mostró una reducción sustancial (90 %) de la actividad de GUS. Los adultos que se desarrollaron a partir de embriones inyectados con el plásmido phspGUS[i/r] mostraron persistencia del fenotipo del silenciamiento génico, que tiene una reducción del 55 % en la actividad de GUS con respecto a los controles inyectados simulados. Los adultos derivados de inyecciones de plásmidos que expresaban el ARN de sentido directo o de sentido contrario no mostraron la persistencia del silenciamiento génico.

Tabla 3. Reducción en la actividad de GUS tras la inyección embrionaria de plásmidos de expresión de ARN a embriones de la cepa GUS de *D. melanogaster*. Los valores representan el porcentaje de disminución (± error estándar) de la actividad de GUS con respecto a los embriones inyectados simulados.

	Reducción en la actividad de GUS (%)	
	Embriones	Adultos
phspGUS[s]	1 ± 1	1 ± 2
phspGUS[a/s]	12 ± 2	2 ± 1
hspGUS[i/r]	90 ± 8	55 ± 6

El análisis de la PCR de diferentes estadios de desarrollo mostró que el plásmido inyectado podría no detectarse

más allá de las larvas del primer estadio (Figura 1), sugiriendo que el ADN inyectado se degradó rápidamente una vez que los insectos experimentaron la muda en las larvas del 2º estadio. La persistencia del silenciamiento génico a lo largo del desarrollo fue por tanto más probablemente debida a la persistencia del ARNbc, y no fue debida a la expresión sostenida del ARNbc del plásmido inyectado.

5 *Silenciamiento del gen GUS en Drosophila tras sumergir las larvas en ARNbc (comparativo)*

Las larvas de *Drosophila* alimentadas con ARNbc de GUS puros no mostraron cambios en la expresión del gen GUS (no se muestran los resultados). De forma similar, no se observó cambio en la actividad de GUS en larvas del 2º estadio o adultos cuando las larvas de neonatos se sumergieron en una mezcla de DMRIE-C que contenía ARN de sentido directo o de sentido contrario de GUS (no se muestran los resultados). A diferencia, un 15 % de neonatos sumergidos en el agente promotor de la transfección que contenían ARNbc de GUS desarrollados en moscas adultas desarrollaron >90 % de reducción en la actividad de GUS (Figura 2). Otro 35 % de las moscas supervivientes mostró una reducción intermedia (20-80 %) en la expresión de GUS. De forma similar, larvas en el 2º estadio derivadas de neonatos sumergidas en ARNbc mostraron un resultado similar, teniendo un 20 % >90 % de reducción en la actividad de GUS, y mostrando otro 40 % de las larvas una reducción de la actividad de GUS entre un 20 % y un 80 % de los niveles normales de actividad de GUS. Estos resultados indican que el ARNbc transcrito e hibridado *in vitro* puede alimentarse a neonatos y producir un extenso silenciamiento del gen en el cuerpo completo del gen diana. Este método de administración del ARNbc parece relativamente benigno, ya que no se observó que murieran o sufrieran larvas a partir del tratamiento del agente promotor de la transfección. El silenciamiento génico parece ser específico del gen, debido a que los insectos que mostraban actividad de GUS reducida parecieron sanos y no mostraron otro fenotipo observable.

Debido a que las larvas se sumergieron en la mezcla, es posible que la entrada de ARNbc pueda haberse producido tanto por ingestión, perfusión en la tráquea, o mediante absorción a través de la cutícula. Sin embargo, se observó un pequeño porcentaje (10 %) de larvas sobrevivientes que no tenían ningún colorante alimenticio en sus intestinos. Estos individuos no mostraron reducción en la actividad de GUS, lo que sugería que la ruta primaria de entrada para el ARNbc es mediante el canal alimentario (no se muestran los resultados).

La concentración de ARNbc alimentado a las larvas se correlacionó directamente con el número de individuos que presentó una fuerte supresión de la actividad de GUS. La concentración más inferior (0,25 ug/ul) del ARNbc ensayado, utilizando DMRIE-C, produjo 4/20 moscas que expresaron una reducción de la actividad de GUS mayor del 25 % (Figura 3). En contraste, la concentración más elevada de ARNbc ensayada (1,0 ug/ul) produjo 12/20 moscas con una reducción de la actividad de GUS mayor del 25 %. A esta dosis más elevada, el número más elevado de moscas (5/20) mostró una reducción en la actividad de GUS de más del 80 %. Aunque estos tamaños de muestras son pequeños (20 individuos/ tratamiento), indican que la extensión del silenciamiento génico puede ser dependiente de la dosis de ARNbc.

Lipofectamina, Cellfectin, y DMRIE-C (Life Technologies), produjeron cada uno individuos con un nivel medible de actividad de GUS reducida (Figura 4). DMRIE-C proporcionó el número más elevado de individuos con un extenso silenciamiento génico, teniendo un 25 % de las larvas eliminada más de un 75 % de la actividad de GUS. Dos individuos de 20 mostraron un 100 % de silenciamiento génico utilizando este agente promotor de la transfección. Las transfecciones con lipofectamina y Cellfectin dieron como resultado un 26-50 % de silenciamiento del gen GUS en el 35 % de las larvas ensayadas, lo que indica que estos agentes promotores de la transfección podrían servir también para administrar el ARNbc con *Drosophila* mediante ingestión.

Dado que la mayoría (aproximadamente no se muestra el 70 % de los resultados) de expresión del gen GUS se encuentra en el cuerpo graso y las gónadas, la señal de silenciamiento había de pasar obviamente más allá de los tejidos del intestino y diseminarse por todo el cuerpo. Este fenómeno de diseminación del silenciamiento génico no es probable que se observe en nematodos *C. elegans* alimentados con ARNbc. Sin embargo, es sorprendente observar el silenciamiento génico en el insecto tras este modo de administración del ARNbc, debido a que el intestino de *Drosophila* es física y psicológicamente más complejo que el de *C. elegans*. De forma más notable, *Drosophila* produce una membrana peritrópica en toda la longitud del intestino medio, que teóricamente reduciría o evitaría potencialmente la transmisión del ARNbc a las células del intestino medio.

La adición de un agente de condensación del ácido nucleico (espermidina o sulfato de protamina) a la mezcla de ARN se encontró que potenciaba la eficacia del ARNi en *Drosophila*. Sin añadir espermidina, solo el 20 % de las larvas tratadas expresó una reducción de la actividad de GUS mayor del 20 % y solo se observó un máximo de silenciamiento del 32 % de GUS (Figura 5). No solo el porcentaje de individuos con niveles significativos de silenciamiento del gen GUS aumenta usando espermidina, sino que el nivel máximo de silenciamiento del gen GUS aumento hasta el 100 % en algunos individuos (véase la Figura 2). Se observó un aumento similar de la ARNi si se usó sulfato de protamina en vez de espermidina (no se muestran los resultados).

Se encontró que la eficacia de la ARNi en *Drosophila* mejoraba ligeramente cuando se sustituyó el PBS con la sacarosa tamponada durante la mezcla del ARN con los agentes promotores de la transfección (Tabla 4). Aunque no se ha examinado adicionalmente, se espera que la sustitución de PBS con sacarosa aumentara la eficacia del

empaquetamiento del ARN en muchos de los agentes promotores de la transfección en cuestión.

Trevor Lockett y sus colaboradores proporcionaron amablemente una selección de agentes promotores de la transfección (CSIRO Molecular Science). Estos agentes promotores de la transfección se describen completamente en la patente "Delivery of Nucleic Acids" (PCT/AU95/00505, US 5.906.922). Se llevó a cabo una comparación de 11 de estos reactivos CSIRO con los 5 reactivos comercialmente disponibles, y muchos de los liposomas CSIRO eran más eficaces en la producción de un efecto de ARNi en *Drosophila* (Tabla 5). En particular, los liposomas CS096, CS102, y CS129 funcionaron mejor que el liposoma de mejor comportamiento comercialmente disponible, DMRIE-C. Todos los liposomas CSIRO ensayados produjeron un número mayor de individuos afectados por la ARNi que el liposoma de peor comportamiento comercialmente disponible, DOTAP. Estos resultados confirman que la administración optimizada de ARNbc a insectos puede conseguirse seleccionando agentes promotores de la transfección adecuados.

Tabla 4. El porcentaje de larvas en el 2^o estadio que muestran más de un 25 % de reducción de la actividad del gen GUS tras la inmersión en agentes promotores de la transfección que se mezclaron con ARN tanto en PBS como en soluciones de sacarosa tamponadas. Los valores representan la media y la desviación estándar de dos copias de 25 insectos.

Agente promotor de la transfección	PBS	Sacarosa tamponada
DMRIE-C	60 ± 7	72 ± 10
Lipofectamina	35 ± 6	49 ± 8
DOTAP	0 ± 0	5 ± 3

20 Silenciamiento de un gen endógeno en *H. armigera* (comparativo)

Se sumergieron neonatos de *H. armigera* en una composición que contenía un agente promotor de la transfección y ARNbc específico de un presunto gen de la ATPasa vacuolar. Varios genes de la vATPasa vacuolar están presentes en la clase Lepidoptera, algunos de los cuales se sabe que codifican subunidades de bombas de protones en las células del intestino medio. Estas bombas de protones son responsables de establecer y mantener el entorno del intestino medio de los lepidópteros a pH alto (aproximadamente pH 10).

Aunque sobrevivieron todas las larvas de *Drosophila* al tratamiento de inmersión, solo el 64 % de las larvas de *H. armigera* estaban vivas 24h tras la exposición al agente promotor de la transfección que con contiene ARN (Tabla 6). Un porcentaje similar de orugas (62 %) sobrevivió a un tratamiento que contenía un agente promotor de la transfección con ARNbc de GUS. Solo el 40 % de las larvas sumergidas en el agente promotor de la transfección mezcladas con el ARNbc de la vATPasa sobrevivieron las primeras 24 h. Además de una supervivencia ligeramente reducida después de las primeras 24 horas, se observó también un desarrollo retrasado para las larvas expuestas al ARNbc de la vATPasa.

De las larvas que sobrevivieron más de 24 h, el 85 % de las larvas del control alcanzó la pupación en el día 10. En contraste, solo un 40 % de las larvas que sobrevivieron tratadas con ARNbc de vATPasa puparon en el día 10. La mortalidad global de las larvas tratadas con el ARNbc de la vATPasa, con respecto a las tratadas como el agente promotor de la transfección fue del 52 %. Las larvas tratadas con el ARNbc de GUS no se vieron significativamente afectadas, ya que un 82 % pupó en el día 10. La administración oral del ARNbc de la vATPasa dio como resultado por tanto una supervivencia reducida y un desarrollo retrasado en larvas de *H. armigera*.

Tabla 5. Clasificación ordenada de los agentes promotores de la transfección de CSIRO y de los agentes promotores de la transfección comercialmente disponibles en su capacidad para inducir la ARNi del transgén GUS en *Drosophila*. Se determinó el porcentaje de larvas en el 2^o estadio que tienen una reducción de más del 25 % en la actividad de GUS después que se sumergieron las larvas de neonatos en el agente promotor de la transfección que contenía ARNbc de GUS en sacarosa tamponada. Los valores representan la media y la desviación estándar de dos experimentos con 15 insecto cada uno.

Clasificación	Agente promotor de la transfección	% de larvas en el 2 ^o estadio con una ARNi de GUS >25 %
1	CS096	70 ± 5
2	CS102	63 ± 14
2	CS129	63 ± 5
3	DMRIE-C	56 ± 14
4	CS078	46 ± 9
5	CS051	43 ± 14
5	CS027	43 ± 5
6	CS041	40 ± 9
7	Lipofectamina	36 ± 5
8	CS042	23 ± 5

Clasificación	Agente promotor de la transfección	% de larvas en el 2º estadio con una ARNi de GUS >25 %
9	Cellfectin	20 ± 9
9	CS060	20 ± 9
10	Lipofectina	16 ± 5
11	CS039	10 ± 5
11	CS015	10 ± 5
12	DOTAP	3 ± 5

* Se proporcionan los nombres completos de los agentes promotores de la transfección en la sección "Agente promotor de la transfección" de la Descripción Detallada. Lipofectina, Lipofectamina, Cellfectin, y DMRIE-C se obtuvieron de Life Technologies, mientras que DOTAP se obtuvo de Boehringer Mannheim.

5 Se sabe poco de la expresión del gen concreto de la vATPasa que se dirigía, diferente del que se expresa en tejidos del intestino (como se aisló de una biblioteca de EST específica de intestino). No se sabe actualmente si el gen de la vATPasa dirigido se expresa también en otra parte en el cuerpo, ni si la extensión del silenciamiento del gen era suficiente para reducir la mayoría de actividad de la vATPasa. Sin embargo, el ARNbc de GUS no produjo efectos perjudiciales sobre las orugas, lo que indica que el silenciamiento del gen mediado por el ARNbc de la vATPasa era suficientemente eficaz para producir un nivel significativo de mortalidad y morbilidad.

10 A diferencia de *D. melanogaster*, el uso de lipofectamina proporcionó la mejor ARNi (Tabla 7). Como con *Drosophila*, los tratamientos de ARN solo o ARN con espermidina fracasaron en proporcionar una ARNi observable.

15 Tabla 6. Efectos de la inmersión de larvas de *H. armigera* en el agente promotor de la transfección que contiene ARNbc. Los resultados representan la media y los errores estándar de tres experimentos separados que utilizan 20 larvas para cada tratamiento.

	% de larvas sobrevivientes a las 24 h ^a	% pupadas en el día 10 ^b	% de supervivencia de la edad adulta ^c
Agente promotor de la transfección solo	64 ± 5	85 ± 5	100
Agente promotor de la transfección + ARNbc de GUS	60 ± 6	82 ± 6	91
Agente promotor de la transfección + ARNbc de vATPasa	40 ± 12	40 ± 5	52

a - basado en tres experimentos que utilizan 20 insectos cada uno
 b - porcentaje basado en aquellos insectos que sobreviven más de 24 h después del tratamiento
 c - porcentaje de supervivencia con respecto a los controles tratados con el agente promotor de la transfección.

Alimentación con extractos de ARN procedentes de insectos que producen ARNbc

20 Se extrajo el ARN de un grupo de 100 moscas que se habían inyectado como embriones con el plásmido phspGUS[i/r]. Los embriones inyectados se habían sometido a un único choque térmico para producir ARNbc de GUS durante la embriogénesis media. Como no se podría detectar ADN plásmido en las larvas más allá del 1º estadio de desarrollo, no se esperaba que se transcribiera ARN adicional a partir del molde de ADN. El ARN extraído se inyectó en embriones a una concentración de 1 ug/ul y los embriones se evaluaron posteriormente para la actividad de GUS. La actividad de GUS se redujo en un 40 % en estos embriones, lo que indica que el ARNbc es extraíble y es todavía capaz de promover el silenciamiento génico cuando se vuelve a transferir a insectos no expuestos anteriormente. Los ARN obtenidos de moscas previamente inyectadas tanto con el plásmido phspGUS[s] (ARN de sentido directo) como con el plásmido phspGUS[a/s] (ARN de sentido contrario) se inyectaron también en embriones, y estos embriones no mostraron cambio en la actividad de GUS (no se muestran los resultados).

30 Tabla 7. Comparación de las eficacias de los agentes promotores de la transfección en la producción del desarrollo retrasado inducido por ARNi en *H. armigera*. Los valores representan el porcentaje de larvas que sobrevivieron las primeras 12 h después del tratamiento que alcanzó la población en el día 10. Se ensayaron seis copias de 10 larvas para cada una de las condiciones.

Mezcla de ARN	% de pupación en el día 10
Solo tampón	87 ± 5
ARN + tampón	84 ± 4
ARN + tampón+ espermidina	82 ± 6
ARN + tampón + espermidina + DOTAP	73 ± 7
ARN + tampón + espermidina + Lipofectina	69 ± 10

Mezcla de ARN	% de pupación en el día 10
ARN + tampón + espermidina + Lipofectamina	48 ± 16
ARN + tampón + espermidina + Cellfectin	54 ± 9
ARN + tampón + espermidina + DMRIE-C	53 ± 14
ARN+ tampón (sin espermidina) + Lipofectamina	58 ± 8

El ARN extraído de moscas inyectado previamente con el plásmido phspGUS[i/r] se mezcló a continuación con DMRIE-C y se alimentó a larvas de neonatos. Las larvas y los adultos desarrollados se evaluaron para la actividad de GUS, y un 30 % de las larvas en el 3^{er} estadio y un 20 % de los adultos mostraron entre 25 y 50 % de reducción en la actividad de GUS (Figura 6). Estos resultados indican que el ARNbc se puede alimentar a neonatos no solo como ARNbc de repetición inversa de longitud completa transcrito e hibridado *in vitro*, sino como ARNbc que se ha procesado en el insecto. Aunque no se determinó la proporción del ARNbc con respecto al ARN extraído, la cantidad del ARNbc extraído de los insectos era obviamente suficiente para promover el silenciamiento génico en los neonatos alimentados.

Discusión

Los presentes inventores han demostrado que el ARNbc se puede administrar a insectos. La alimentación directa de ARNbc puro, sin empaquetar fracasó en producir un fenotipo de la ARNi en *D. melanogaster* o *H. armigera*, indicando que los agentes promotores de la transfección eran necesarios para la transfección eficaz en estas especies. Sin embargo, se prevé que en insectos con un sistema digestivo simple, el ARNbc puede ser eficaz en la obtención del silenciamiento génico.

De forma notable, los mismos agentes promotores de la transfección fueron eficaces en la administración del ARNbc en *D. melanogaster* y *H. armigera*, a pesar de las diferencias de pH en los intestinos de estas dos especies.

Un hallazgo significativo era que el ARN bicatenario que se había procesado previamente en un insecto podría facilitar además la ARNi en otro insecto, incluso cuando el ARN se purificó a partir de sus proteínas asociadas. Se anticipa que el proceso de purificación eliminaría todas las proteínas asociadas al ARNbc, tal como las proteínas dice así denominadas, que se cree que median en la degradación del ARN diana. Suponiendo que la mayoría de los ARNbc purificados a partir de los insectos, e ingeridos posteriormente por los neonatos era de los oligonucleótidos de 21 y 22 mer procesados, parece que la unidad funcional eficaz en el último experimento es la de los oligonucleótidos cortos. Sin embargo, longitudes más largas de ARNbc son claramente eficaces una vez ingeridas, como se evidencia por la ingestión de los ARNbc de GUS y de la vATPasa transcritos *in vitro*.

Referencias

Allen, T.M. y Chonn, A. (1987) FEBS Lett. 223:42-46.

Bosher, J.M., y Labouesse, M. (2000) Nature Cell Biol 2: E31-E36.

Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72: 248-54.

Cameron, F.H., Moghaddam, M.J., Bender, V.J., Whittaker, R.G., Mott, M., Lockett, T.J. (1999) Biochim. Biophys. Acta /Biomembranes. 1417: 37-50.

Dougherty, W.G. y Parks, T.D. (1995) Curr. Opin. Cell Biol. 7:399-405.

Duve, H., Johnsen, A.H., Maestro, J.L., Scott, A.G., Winstanley, D., Davey, M., East, P.D., Thorpe, A. (1997) Peptides 18: 1301-1309.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., y Tuschl, T. (2001) Nature 411: 494-498.

Gallagher, S. 1992 Quantitation of GUS activity by fluorometry. En: GUS Protocols (ed S. Gallagher). Academic Press Inc. San Diego.

Gawron-Burke, C. y Baum, J.A. 1991. Genetic manipulation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein genes in bacteria p. 237-263 In J.K. Setlow (ed.) Genetic engineering: principles and methods, vol 13 Plenum Press, New York.)

Maeda I., Kohara, Y., Yamamoto, M., y Sugimoto, A. (2001) Current Biology 11: 171-176.

Naleway, J. 1992 Histochemical, spectrophotometric, and fluorometric GUS substrates. En: GUS Protocols (ed S. Gallagher). Academic Press Inc. San Diego.

ES 2 650 214 T3

- Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (1970) J. Mol. Biol. 48:443-453.
- Pinkerton, A.C., O'Brochta, D., y Atkinson, P.W. (1996) Insect Molec. Biol. 5: 223-227.
- 5 Roberts, D.B. y Standen, G.N.(1998) The elements of Drosophila biology and genetics. En: Drosophila: A Practical Approach (ed. D.B. Roberts) Oxford University Press, Oxford.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Springs Harbor Laboratory, New York.
- 10 Spradling, A.C., y Rubin, G.M. (1982) Science 218: 341-347.
- Tabara, H., Grishok, A., y Mello, C.C. (1998) Science 282: 430-431.
- 15 Thummel, C.S., Boulet, A.M., Lipshitz, H.D. 1988. Gene 74: 445-456
- Timmons, L. y Fire, A. (1998) Nature 395: 854.
- Waterhouse, P.M., Graham, M.W., y Wang, M.-B. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 13959-13964.
- 20 Waterhouse, P.M., Wang, M.-B., Lough, T. (2001) Nature 411: 834-842.
- White, 1988. The anatomy. En: The nematode Caenorhabditis (W.B. Wood ed.) Cold Spring Harbor Press, NY
- 25 Wu, N.Z., Da, D., Rudoll, T.L., Needham, D., Whorton, A.R. and Dewhirst, M.W. (1993) Cancer Res. 53:3765-3770.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation
- <120> Administración de ARNbc
- <130> 500689
- 35 <150> AU PR 6215
- <151> 06-07-2001
- <160> 6
- 40 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 27
- 45 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador de PCR
- 50 <400> 1
- gaattcatgg tccgtcctgt agaaacc 27
- <210> 2
- <211> 24
- 55 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador de PCR
- 60 <400> 2
- gaattccccc accgaggctg tagc 24
- 65 <210> 3
- <211> 27

ES 2 650 214 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 3
gaattctaga atcccaaac aaactg 27

10 <210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador de PCR

20 <400> 4
ggatcctgac cgccatcgc aataaatga gcc 33

<210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador de PCR

30 <400> 5
ccgaaatcc aatctacgga ccc 23

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador de PCR

40 <400>6
cgacgaataa cctggctgt tgc 23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para reducir el nivel de un ARN diana y/o la producción de una proteína codificada por el ARN diana en una célula de un insecto nocivo, que comprende alimentar durante un tiempo al insecto nocivo con una planta transgénica que produce ARNbc y en unas condiciones que son suficientes para que dicho ARNbc, o un producto de degradación del mismo, reduzca específicamente el nivel del ARN diana y/o la producción de la proteína codificada por el ARN diana en una célula del insecto,
10 en donde el ARN diana o la proteína son importantes para la supervivencia, el desarrollo y/o la reproducción del insecto, en donde la porción del ARNbc que es bicatenario tiene de 21 a 23 pares de bases de longitud, y en donde el insecto está en una fase de desarrollo larval cuando se suministra el ARNbc.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el insecto se selecciona entre los siguientes órdenes: Coleoptera, Lepidoptera; Phthiraptera, Hemiptera, Orthoptera, Dictyoptera, Hymenoptera, Isoptera, Siphonaptera, Thysanura, Dermaptera, Psocoptera y Thysanoptera, o se selecciona entre los siguientes géneros: Musca, Aedes, Anopheles, Culex, Glossina, Simulium, Stomoxys, Haematobia, Tabanus, Hydrotaea, Lucilia, Chrysomia, Callitroga, Dermatobia, Gasterophilus, Hypoderma, Hylemyia, Atherigona, Chlorops, Phytomyza, Ceratitis, Liriomyza y Melophagus.
- 20 3 El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el insecto es del Orden Coleoptera.
- 4 El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el insecto es del Orden Lepidoptera.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ARNbc es una estructura de polinucleótido formada por una única hebra de ARN autocomplementaria.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ARNbc es una estructura de polinucleótido formada por dos hebras de ARN complementarias.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 %, preferentemente al menos un 99 % de identidad con al menos un parte de la secuencia del ARN diana.

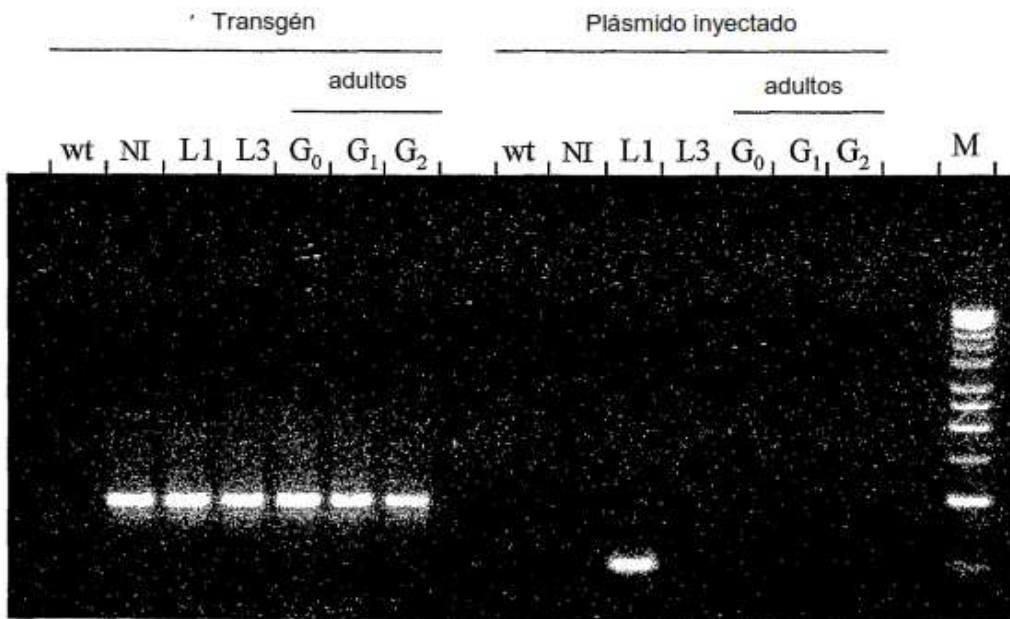


Figura 1

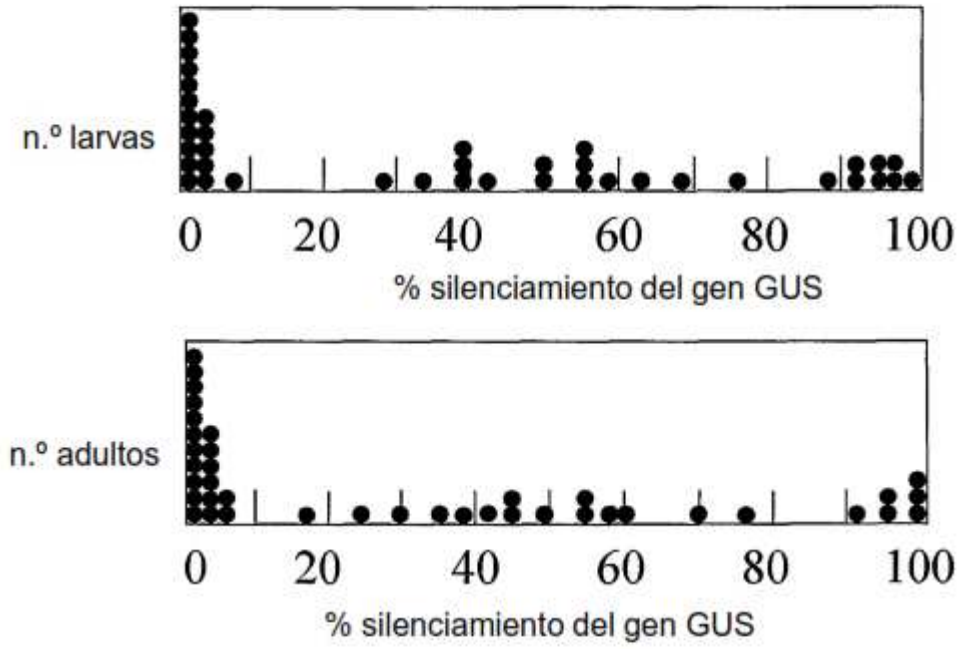


Figura 2

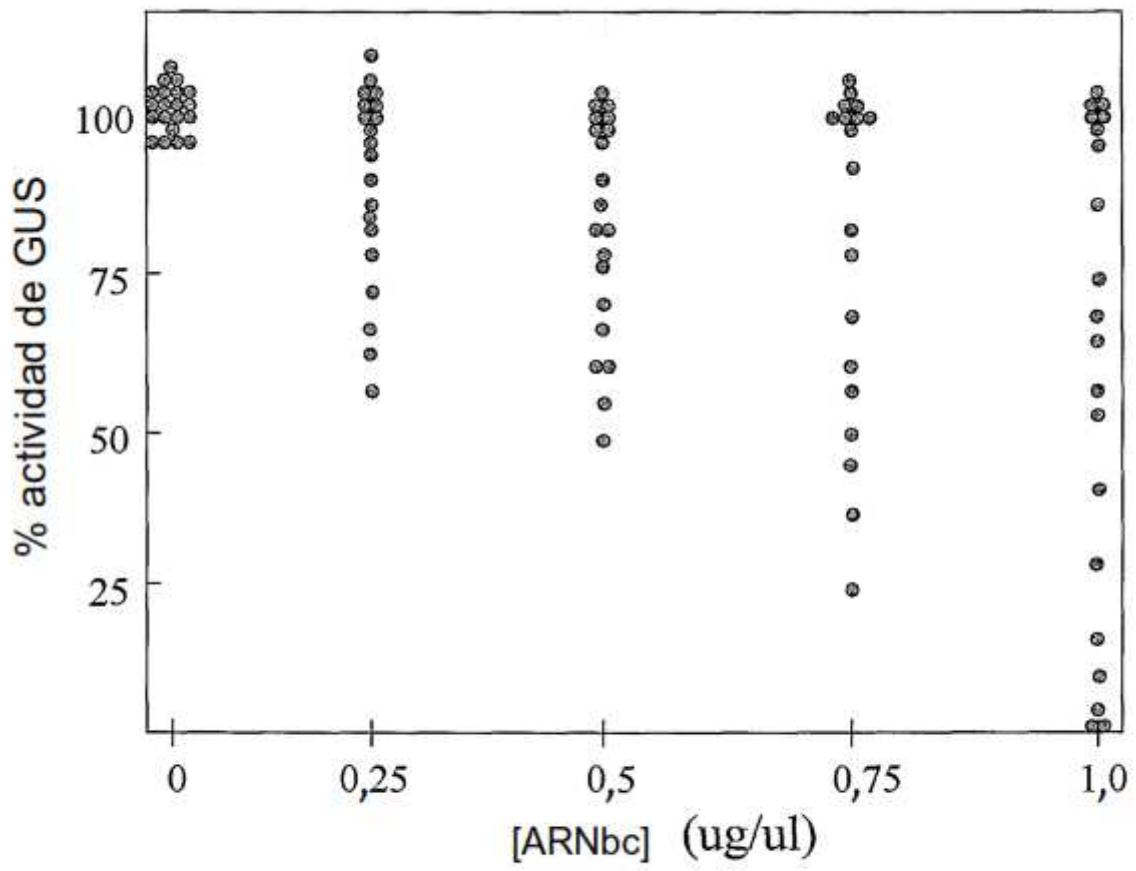


Figura 3

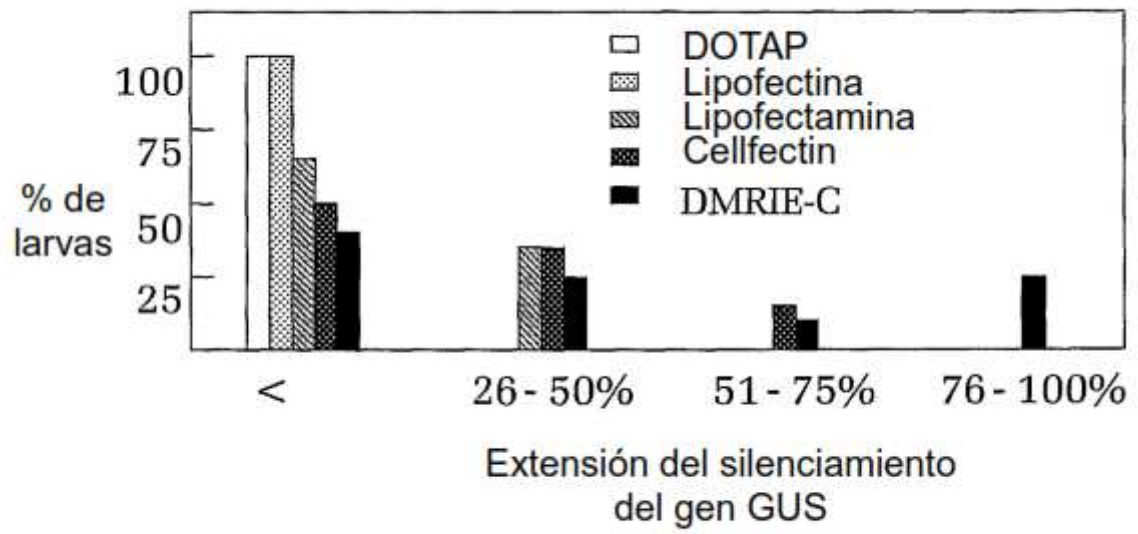


Figura 4

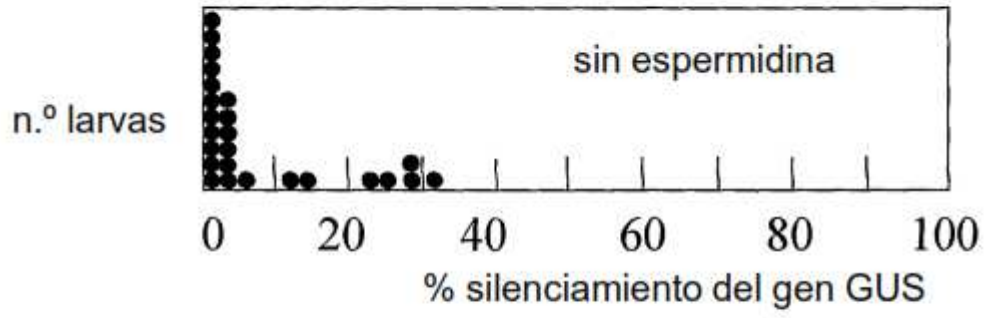


Figura 5

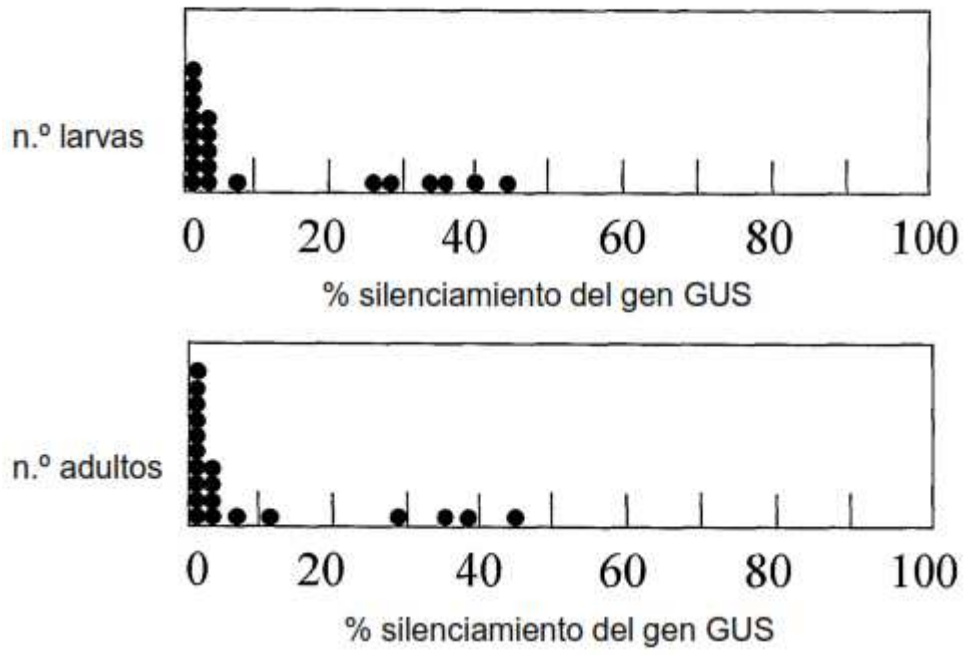


Figura 6