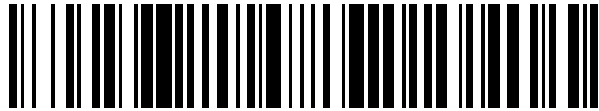


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 039**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A01K 67/033 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2013 PCT/EP2013/054417**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13131920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13711848 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2823047**

54 Título: **Control biológico**

30 Prioridad:

05.03.2012 GB 201203850

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

24.09.2018

73 Titular/es:

**OXITEC LIMITED (100.0%)
71 Milton Park Abingdon
Oxford, Oxfordshire OX14 4RX, GB**

72 Inventor/es:

ALPHEY, LUKE

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 683 039 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

Control biológico

CAMPO DE LA INVENCION

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un sistema de expresión capaz de proporcionar esperma estéril, pero competitivo, en artrópodos, en concreto insectos, así como los usos del mismo en métodos de control biológico (control de población), control de calidad y selección del sexo de dichos artrópodos.

INTRODUCCIÓN

10 **[0002]** Las plagas de insectos de importancia económica, inicialmente originarias de ciertas partes del mundo, se distribuyen actualmente de forma amplia a través del comercio internacional y del movimiento de personas. Dichas plagas desarrollan grandes poblaciones y generan invasiones perjudiciales para la fruta y verdura en todo el mundo. Existe una amplia gama de métodos de control potenciales, incluyendo espráis atrayentes, fumigación directa con insecticidas, control biológico, enfoques de manejo integrado de plagas (MIP) y la técnica del insecto estéril (TIE) (Malacrida *et al.*, 2007). No obstante, los métodos de control actuales dependen abrumadoramente del uso de insecticidas químicos. Tanto los espráis directos como los atrayentes cuentan con la posibilidad de provocar una reducción de la polinización debido a un descenso de las abejas, y la posibilidad de intoxicación animal o humana. Por otra parte, la técnica TIE es un método de control de plagas respetuoso con el medio ambiente y específico de la especie. Depende de la cría masiva, la esterilización y la liberación de grandes cantidades de machos estériles que se aparean con hembras salvajes, provocando una reducción de la población salvaje en la siguiente generación (Dyck *et al.*, 2005; Knipling, 1955). Si se liberan suficientes machos estériles durante un tiempo suficiente, la población objetivo colapsará. El documento WO 2009/115569 se refiere a insectos transgénicos que son útiles en métodos biológicos para controlar plagas de insectos como la técnica del insecto estéril (TIE); y a insectos transgénicos que comprenden un sistema de letalidad en desarrollo específico de cada fase, métodos para producir dichos insectos, y métodos para su uso en el control de la reproducción en una población de insectos que sea de interés.

25 **[0003]** La TIE depende de la radiación para esterilizar las especies plaga objetivo, aunque puede presentar un impacto negativo en los insectos liberados (Alphey, 2002; Alphey, 2007; Alphey *et al.*, 2007). La radiación afecta a todas las células del insecto, no únicamente a los gametos, y, por tanto, es inevitable provocar cierto grado de daño al insecto liberado, con potenciales efectos negativos en su rendimiento (p. ej., la longevidad o la competitividad de apareamiento). La radiación-esterilización se ha de llevar a cabo en una fase de desarrollo posterior, limitando las opciones para la liberación. Asimismo, los instrumentos de radiación son relativamente grandes y costosos (de obtener y funcionar), y tienden a imponer cierto grado de centralización que puede no ser deseable para algunos programas. Por último, los irradiadores basados en isótopos, que han supuesto la base de los programas de TIE hasta la fecha, se están tornando menos preferidos debido a cuestiones de seguridad con respecto a la presencia de cantidades considerables de radioisótopos en estos instrumentos.

35 **[0004]** En el pasado, se han probado alternativas a la radiación, en concreto para mosquitos. Estas incluyen la esterilización química y la esterilización mediante el uso de incompatibilidad citoplasmática (IC, inducida por *Wolbachia*), pero cada una de estas presentan sus propios inconvenientes. Los quimioesterilizantes tienden a ser compuestos tóxicos o mutagénicos, suponiendo problemas para la seguridad del trabajador y del medio ambiente. Los sistemas basados en *Wolbachia* dependen de la falta de cualquier hembra equivalente infectada con *Wolbachia* en estado salvaje, que puede no ser el caso, y necesitan también que no se libere ninguna de tales hembras; dicha estricta separación por sexos puede ser difícil de lograr. Este y otros problemas asociados a los programas de TIE actuales se podrían solventar mediante el uso de métodos de ADN recombinante (Morrison *et al.*, 2010; Franz y Robinson, 2011).

45 **[0005]** Se ha sugerido una alternativa transgénica a la radiación-esterilización, denominada Liberación de Insectos portadores de Dominantes Letales (RIDL, por sus siglas en inglés: (Alphey, 2002; Alphey, 2007; Alphey y Andeasen, 2002; Alphey *et al.*, 2010; Alphey *et al.*, 2007; Alphey y Thomas, 1999; Thomas *et al.*, 2000). En este sistema, los insectos se modifican para que porten un sistema genético o gen letal dominante reprimible. Estos se liberan en la naturaleza; la progenie resultante de los apareamientos entre insectos salvajes e insectos de RIDL que herede una copia del gen o constructo de RIDL tenderá a morir. El sistema de RIDL puede estar diseñado para destruir la totalidad de la descendencia que lo hereda, o únicamente un sexo. También puede estar diseñado para destruir a los insectos afectados en una etapa concreta del desarrollo; este hecho puede suponer ventajas significativas en algunas especies, p. ej., algunos mosquitos (Phuc *et al.*, 2007). Los sistemas de RIDL se han configurado en una serie de especies plaga (p. ej., Fu *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2005; Phuc *et al.*, 2007). Se puede encontrar más información acerca del sistema de RIDL en el documento WO 01/39599.

55 **[0006]** Nuestra tecnología de RIDL letal de hembras (RIDL específico de hembras, fsRIDL) es altamente efectiva, en ocasiones incluso tanto como un 100 %, a la hora de separar los sexos y se ha sometido con éxito a experimentos en laboratorio, invernadero y semicampo. Se podría utilizar RIDL con o sin radiación para producir un producto efectivo.

5 **[0007]** A pesar del hecho de que esta estrategia ofrece una ventaja considerable para la aplicación de la TIE en una serie de insectos plaga, como las moscas de la fruta: *Ceratitis capitata*, *Bactrocera oleae* y *Anastrepha ludens*; lepidópteros: *Pectinophora gossypiella* y *Plutella xylostella*; y mosquitos: *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*; y de que se puede emplear por sí sola, la radiación puede ser todavía el método de esterilización en ciertos mercados. Esto se debe a que, en las cepas de RIDL específica de hembras descritas hasta la fecha, los machos F1 son totalmente viables y las hembras se eliminan en una fase larvaria (esto es, tras la eclosión de los huevos). Asimismo, las rutas de regulación y la aceptación del público se verán facilitadas significativamente proporcionando esterilización genética (o un rasgo que la confiera). La esterilización genética en machos aumentaría de forma ventajosa nuestras cepas actuales «letales de hembras» (fs-RIDL).

10 **[0008]** Por consiguiente, en la técnica existe una necesidad de un sistema de expresión que pueda ofrecer un medio para la esterilización genética en machos similar a los efectos de la radiación en un método de TIE, pero sin la disminución asociada del estado físico de los individuos irradiados.

15 **[0009]** Crisanti *et al.*, (Catteruccia *et al.*, 2009; Windbichler *et al.*, 2007; Windbichler *et al.*, 2008) han desarrollado un sistema de expresión en el cual una endonucleasa (IppO-1, también conocida como I-Ppol) se liga al promotor de un gen estructural constitutivo, Beta-2 Tubulin. Existen una serie de problemas relacionados con este sistema, que se exponen en el presente documento, de los cuales no es de menor importancia el hecho de que los experimentos resultaron en gran medida infructuosos a la hora de lograr sus objetivos. No obstante, también resultaría especialmente útil la capacidad de ejercer cierto grado de control en el momento del efecto de esterilización genética. Este control no se encuentra en el sistema de Crisanti.

20 **[0010]** Por ejemplo, se podría querer permitir la cría de individuos portadores de un sistema de expresión en el laboratorio, pero también se podría querer activar o accionar el sistema cuando se necesite, como durante la liberación o un poco antes/después de esta. Dicho de otro modo, se podría querer suprimir el efecto del sistema y/o inducirlo en un momento determinado.

25 **[0011]** En resumen, es deseable que un sistema de expresión de este tipo incluya un medio para ejercer control en el efecto del sistema de expresión. En ocasiones, se hace referencia a dicho control como «condicionalidad», de tal forma que un sistema que incluya este control es un sistema condicional. Los sistemas de expresión condicionales se conocen, por ejemplo, en insectos, pero no en el presente contexto de esterilización genética. En cualquier caso, estos sistemas condicionales no son adecuados para la expresión en la línea germinal masculina. De hecho, para aprovechar los sistemas condicionales existentes, como el sistema tet bipartito, simplemente se pueden incluir en un sistema más grande de expresión de la línea germinal masculina. Este hecho, en la línea germinal masculina, no sirve para controlar la expresión de un efector (diseñado para lograr la esterilización genética en dicha línea germinal). Las razones que lo explican son complejas, pero se centran en las inusuales condiciones establecidas por la meiosis.

35 **[0012]** A pesar de ello, hemos desarrollado sorprendentemente un sistema adecuado para la expresión en una línea germinal masculina. El sistema es capaz de proporcionar esterilización genética en el sentido de que esa expresión del sistema en la línea germinal produce esperma que no es capaz de formar un cigoto viable. Se ha descubierto que se puede aprovechar el uso de un sistema condicional como tet, aunque se necesita una revisión significativa de la totalidad del sistema de expresión. Resulta extremadamente ventajoso el hecho de que el sistema que se ha descubierto reproduce hábilmente los efectos de la radiación en los métodos de TIE. De hecho, posibilita la producción de insectos macho estériles sin recurrir al uso de radiación debilitadora.

40 **[0013]** Por consiguiente, se ha mostrado que un sistema de expresión de artrópodos que comprende un efector adecuado que se utiliza para un sistema condicional a través de otras regiones de regulación se puede volver capaz de inducir esterilidad genética condicional, denominada en ocasiones en el presente documento «letalidad de esperma». No obstante, como se podrá apreciar, la intención preferida no es destruir el esperma en sí, ni siquiera impedir su producción, sino producir esperma que no pueda transmitir su información genética. Sin embargo, el esperma es capaz de competir de otra forma con esperma de tipo natural o de hacer que un cigoto sea inviable (esto es, impedir la formación de un cigoto viable).

45 **[0014]** Esto soluciona los problemas anteriores proporcionando esterilidad masculina condicional, y preferiblemente reprimible, que funciona permitiendo la producción de esperma que sea defectuoso, en el sentido de que sea incapaz de fecundar un óvulo para proporcionar un cigoto o embrión viable (uno que sea capaz de convertirse en un adulto fértil), pero que todavía sea capaz de entrar o ponerse en contacto con un óvulo de tal forma que se excluya otro esperma.

50 **[0015]** Se puede encontrar más información técnica sobre los antecedentes en los documentos GB2404382A, GB2355459A, JP2008067678A, WO2009/016627A, WO2008/134068A, WC Black *et al.* (Trends in Parasitology, 362-370, Vol. 27, 2011), C Barreau *et al.* (Development, 1897-1902, Vol. 135, 2008), G Fu *et al.* (Proc Natl Acad Sci USA, 4550-4554, Vol. 107, 2010) y T Ant *et al.* (BMC Biology, 51, Vol. 10, 2012).

SUMARIO DE LA INVENCION

[0016] Así, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer un sistema de expresión génica de la línea germinal masculina de artrópodos adecuado para la expresión condicional de un gen efector en una línea germinal masculina de artrópodo, comprendiendo el sistema:

- 5 – una primera unidad de expresión que comprende un gen efector y un promotor para ello ligado de forma funcional a este;
- una segunda unidad de expresión que comprende una secuencia de codificación para un factor de transcripción y un elemento regulador en la dirección 5' ligado de forma funcional a este, siendo capaz el factor de transcripción de actuar después del promotor en la primera unidad de expresión para conducir la
- 10 expresión del gen efector, incluyendo el elemento regulador en la dirección 5':
 - un promotor para el factor de transcripción; y
 - una 5'-UTR adyacente a un sitio de inicio de la traducción para la secuencia de codificación del factor de transcripción;

15 conduciendo el elemento regulador en la dirección 5' la suficiente expresión del factor de transcripción, de tal forma que la proteína del factor de transcripción conduzca a su vez la transcripción del gen efector antes de la meiosis.

[0017] Preferiblemente, el factor de transcripción es un activador transcripcional, como tTA, GAL4 o sus variantes. El efector es preferiblemente una endonucleasa, más preferiblemente una nucleasa con dedo de 3-Zn. El promotor de la primera unidad de expresión es preferiblemente un promotor mínimo. El promotor del elemento regulador en la dirección 5' en la segunda unidad de expresión es más preferiblemente de topi, aly o Beta-2 tubulin (B2T) en homólogos de los mismos. El homólogo es preferiblemente aquel que se encuentra en el artrópodo objetivo en el que se va a expresar el sistema. El promotor es un promotor de la línea germinal masculina, esto es, actúa sobre la transcripción o activa la transcripción en la línea germinal masculina. La 5'-UTR en el elemento regulador en la dirección 5' de la segunda unidad de expresión es preferiblemente de hsp83, preferiblemente de la mosca mediterránea de la fruta u homólogos de hsp83, concretamente el homólogo de hsp83 que se halla en el artrópodo objetivo (esto es, aquel en el que se va a expresar el sistema). De forma alternativa, la 5'-UTR puede ser aquella de B2T u homólogos de este, siempre que dicha 5'-UTR haya sido modificada para eliminar o mejorar los efectos de las señales de retraso de la transcripción contenidas en la de tipo natural, especialmente si se utiliza en combinación con el promotor B2T.

30 **[0018]** La primera o la segunda unidad de expresión puede comprender también un intensificador. Los promotores de ambas o de cualquiera de la primera y la segunda unidad de expresión, especialmente un promotor mínimo, se puede considerar que incluye(n) además un intensificador.

[0019] Las unidades de expresión se pueden proporcionar por separado o conjuntamente en el mismo constructo. En caso de proporcionarse por separado, el sistema de expresión puede comprender entonces constructos independientes. El constructo o constructos es/son preferiblemente plásmido(s). Los plásmidos pueden comprender transposones. Los transposones pueden comprender a su vez elementos transponibles. Entre los ejemplos de transposones se puede incluir el transposón piggyBac.

40 **[0020]** La naturaleza condicional de la expresión del gen efector es tal que puede controlarse por un usuario o verse influida de otra forma por factores externos. Tales factores pueden ser factores ambientales como la temperatura (por ejemplo, en el caso de que se utilice el sistema Gal4-UAS), aunque más preferiblemente son entidades químicas, como tetraciclina o sus análogos. La temperatura se puede controlar en el laboratorio, y se podría considerar que se pueden aprovechar los cambios de temperatura durante el transcurso del día o de la estación. Sin embargo, este hecho no se prefiere en algunas formas de realización, ya que se podría desear alcanzar un grado de control más preciso. En tales ejemplos, se prefiere en concreto que el sistema sea condicional en el sentido de que sea inducible y más preferiblemente reprimible.

45 **[0021]** Se conocen sistemas inducibles, por ejemplo, se puede emplear una configuración GAL4-UAS donde el factor de transcripción es GAL4 y la primera expresión comprende (más allá de la secuencia de codificación del gen efector) la región UAS (CGG-N₁₁-CCG, donde N puede ser cualquier base) a la que se une GAL4 o preferiblemente un oligómero de este. Si el elemento regulador en la dirección 5' en la segunda unidad de expresión comprende un promotor y una 5'-UTR adecuadas, entonces la transcripción del factor de transcripción Gal4 se puede inducir suministrando un péptido u hormona, por ejemplo, que actúe sobre el promotor del factor de transcripción Gal4 (de forma directa o indirecta, esto es, que provoque que se induzca la transcripción).

50 **[0022]** En otro ejemplo preferido, el sistema puede ser un sistema inducible, donde la inducción se lleva a cabo suministrando una entidad química, como una tetraciclina o uno de sus análogos, incluida la doxiciclina. En dicha situación, se puede emplear, por ejemplo, el uso de rtTA («tTA inverso») como factor de transcripción, por lo que rtTA se une al ADN únicamente en presencia de tetraciclina o de un análogo como la doxiciclina. El rtTA se describe, entre otros, en el documento WO 2001/059088. En este caso, el suministro de tetraciclina (esto es, en

la dieta) o de un análogo como la doxiciclina permitirá que el factor de transcripción en el presente sistema actúe en la primera unidad de expresión y, por tanto, induzca la expresión del presente gen efector.

5 **[0023]** No obstante, se prefiere que el sistema sea reprimible. Un ejemplo preferido es en el que el factor de transcripción en la segunda unidad de expresión es tTA o una variante de este (tTAV, tTAV2, tTAV3, etc.). Estos se unen al ADN a no ser que la tetraciclina (Tc), o un análogo apropiado, se encuentre presente. La tetraciclina bloqueará la unión al ADN del tTA, por lo que no habrá ninguna interacción entre el tTA y un intensificador en la primera unidad de expresión y, por lo tanto, no habrá transcripción del gen efector. Por consiguiente, como es bien sabido (véase, por ejemplo, nuestra publicación de RIDL a la que se hace referencia en el presente documento), la tetraciclina se puede suministrar en la dieta hasta tal momento en el que se desee desreprimir (esto es, eliminar o mitigar la represión de) la expresión del gen efector. En ausencia de tetraciclina (o de un análogo como la doxiciclina), como tras la liberación en campo o tras un cambio de dieta en el laboratorio, se expresa el gen efector.

[0024] Así, en algunas formas de realización, se prefiere que el sistema sea inducible, aunque en otras formas de realización, que son particularmente preferidas, el sistema es reprimible.

15 **[0025]** Las dos unidades de expresión son preferiblemente una de las dos partes de un sistema de expresión bipartito (condicional). Entre los ejemplos preferidos se incluyen GAL4:UAS y los diversos sistemas tet. En el primer caso, el factor de transcripción de la segunda unidad de expresión es preferiblemente Gal4, mientras que la primera unidad de expresión comprende preferiblemente la secuencia UAS para que se una GAL-4. Se contemplan también variantes adecuadas de GAL4, como GAL4-VP16.

20 **[0026]** Por lo general, ambas o cada una de las unidades de expresión puede(n) comprender un intensificador. No obstante, se prefiere particularmente que la primera unidad de expresión comprenda un intensificador. Se prefiere que el factor de transcripción de la segunda unidad de expresión sea tTA o una variante (esto es, cuando el presente sistema de expresión utilice el sistema tet para proporcionar condicionalidad). Cuando ese es el caso, la primera unidad de expresión incluye preferiblemente el operador tet (tetO). En concreto, se prefiere el elemento mini-promotor tetO (tTRE). Proporciona de forma conjunta los elementos de promotor e intensificador del elemento regulador en la dirección 5' de la segunda unidad de expresión. El promotor TRE con 426 pb contiene siete 18-meros tetO fusionados con un promotor mini-citomegalovirus (mini-CMV) (véase, por ejemplo, M. Ghosh *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 2004, 24(23) 10193).

25 **[0027]** Aunque se prefieren los sistemas bipartitos, donde la primera y la segunda unidades de expresión se proporcionan en constructos por separado, la primera unidad de expresión y la segunda unidad de expresión se pueden proporcionar también en el mismo constructo o plásmido. En este sentido, el presente sistema es preferiblemente un plásmido o consta de dos plásmidos. Más preferiblemente, las dos unidades de expresión se transforman como un único plásmido o un vector de tal forma que se insertan en el mismo locus del genoma.

30 **[0028]** El artrópodo es preferiblemente un insecto, como se describe con detalle más adelante. Se entenderá que la línea germinal masculina incluye esperma, de tal forma que el sistema es capaz de expresar el gen efector en el esperma.

35 **[0029]** El efector confiere u otorga letalidad de efecto paternal al menos en algunas circunstancias, es decir, es, o forma parte, del sistema genético «letal de efecto paternal». En dicho sistema, la muerte de la descendencia (considerada aquí desde la etapa en la que el esperma se introduce en el óvulo, que en insectos puede no ser simultánea a la fusión de membranas) depende más del genotipo del padre que del cigoto (o cigoto potencial). Así, por ejemplo, en un sistema letal de efecto paternal dominante, al menos parte de la descendencia de tipo natural de un macho heterocigoto que se aparee con una hembra (homocigota) de tipo natural se verá afectada. Naturalmente, es posible que se produzcan efectos cigóticos adicionales, y se prevén en la invención. Son posibles y se conciben varios modos de actuación potenciales para tales efectos. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el efector es o comprende una nucleasa. En este sentido, la esterilidad se logra a través de lo que denominamos «letal de efecto paternal». En la presente, el efector se expresa (para proporcionar una proteína nucleasa funcional) en el esperma. Este hecho puede derivar en que el ADN en el esperma se vea afectado de tal manera que el embrión fecundado presente una reducida probabilidad de supervivencia; de hecho, este es un ejemplo preferido de un mecanismo mediante el cual se puede lograr letalidad de efecto paternal. También es posible que la proteína efectora pase al óvulo, donde también puede tener lugar la escisión del ADN. No obstante, también se contempla que al menos algunos transcritos efectores puedan pasar también al óvulo, desde el esperma, y se traduzcan en el óvulo. En ambos casos, el efector de la nucleasa puede hacerse efectivo de esta forma en el óvulo, así como en el esperma.

45 **[0030]** El sistema es adecuado para la expresión del efector, pero se comprenderá que se puede hacer también referencia a este preferiblemente como «capaz de tal expresión» o «adaptado para expresar un efector en la línea germinal masculina».

50 **[0031]** El gen efector se describirá con más detalle más adelante, pero preferiblemente es un indicador, como un marcador, p. ej., una proteína fluorescente como GFP, YFP, etc. No obstante, más preferiblemente, el gen efector es una nucleasa, cuyos ejemplos adecuados se exponen más adelante. Más preferiblemente, es tanto

una nucleasa como un indicador, por ejemplo, una fusión de nucleasa-proteína fluorescente (cuyos ejemplos preferidos incluyen las conocidas proteína verde fluorescente (GFP) o proteína amarilla fluorescente (YFP)).

5 **[0032]** Cuando se hace referencia en el presente documento a un gen que «es» un indicador o una nucleasa, por ejemplo, se podrá apreciar que el gen comprende ADN o ARN que codifica una proteína que presenta la función indicada.

10 **[0033]** La primera unidad de expresión comprende el gen efector. Comprende también un promotor para este, y que está ligado de forma funcional a este. Por lo tanto, el promotor es adecuado para conducir la transcripción del gen efector. Como se ha mencionado anteriormente, la primera unidad de expresión puede comprender también un intensificador, o al menos una región o secuencia de unión para (esto es, reconocida por) el factor de transcripción de la segunda unidad de expresión.

[0034] La segunda unidad de expresión comprende una secuencia de codificación para el factor de transcripción. También comprende un elemento regulador en la dirección 5'. Este está ligado a su vez de forma funcional a la secuencia de codificación para el factor de transcripción de tal forma que conduce la transcripción del factor de transcripción.

15 **[0035]** El factor de transcripción es capaz de actuar sobre el promotor en la primera unidad de expresión para conducir la expresión del gen efector, aunque esto se puede llevar a cabo naturalmente por medio de un intensificador, esto es, el factor de transcripción puede no actuar directamente en el promotor, sino que, por el contrario, lo hace por medio de un intensificador. Por supuesto, se contemplan otros elementos reguladores como aquellos para un casquete 5', una 5'-UTR, una 3'-UTR y una cola de poliA.

20 **[0036]** Para conducir la transcripción del factor de transcripción, el elemento regulador en la dirección 5' de la segunda unidad de expresión comprende un promotor y una 5'-UTR. Ambos precisan una selección cuidadosa para proporcionar la suficiente expresión del efector. En este sentido, el promotor de la segunda unidad de expresión (esto es, en el elemento regulador en la dirección 5') es preferiblemente el de Beta-2 tubulin (B2T). De forma alternativa, y más preferiblemente, el promotor es de topi o aly. La 5'-UTR en la segunda unidad de expresión (esto es, en el elemento regulador en la dirección 5') es preferiblemente la de hsp83, por ejemplo, la de la mosca mediterránea de la fruta, pero también puede ser de B2T. Si tanto la 5'-UTR como el promotor son de B2T, entonces uno u otro deben estar modificados de tal forma que las señales de retraso de la transcripción se eliminen o perfeccionen. La referencia a estos genes incluye, por supuesto, a sus homólogos.

30 **[0037]** La 5'-UTR se define en el presente documento como la secuencia 5' adyacente (esto es, en la dirección 5') al sitio de inicio de la traducción (esto es, mínimamente, el sitio de inicio de la traducción ATG). Presenta una longitud media de aproximadamente 150 bases en eucariotas y preferiblemente se extiende hasta el promotor, por ejemplo, en torno a 50-500 bases en la dirección 5' del sitio de inicio ATG.

35 **[0038]** Aunque el volumen del marco en la segunda unidad de expresión puede ser de B2T, a pesar de haber sustituido el ORF de B2T por el ORF del factor de transcripción, se podrá apreciar que tanto el promotor de la segunda unidad de expresión como su 5'-UTR no pueden ser los de B2T: al menos uno de ellos ha de haber sido cambiado para permitir que tenga lugar la suficiente acumulación del transcrito efector antes de la meiosis. Si se va a utilizar el promotor B2T, entonces la 5'-UTR de B2T debe ser la forma modificada/perfeccionada descrita anteriormente, o puede ser la de hsp83.

40 **[0039]** De forma alternativa, si se utiliza la 5'-UTR de B2T, entonces el promotor debe ser otro promotor que actúe de forma temprana. Lo necesario es que la elección de la 5'-UTR y del promotor para el segundo elemento de expresión deben actuar en conjunto para permitir que tenga lugar la suficiente acumulación del transcrito efector antes de la meiosis.

[0040] Ejemplos preferidos de promotores alternativos son los promotores de topi y de aly. Estos se pueden utilizar con una variedad de 5'-UTR. Más adelante se exponen ejemplos de sus secuencias.

45 **[0041]** Cuando se haga referencia a un elemento genético concreto, como un promotor, intensificador, 5'-UTR o incluso un ORF que sea «de» un cierto gen mencionado, se podrá apreciar que esto no implica realmente que el elemento se elimine del gen de referencia, sino que simplemente significa que este es el origen del elemento. Otra forma de describirlo sería «derivado de». Se prefiere que el origen de la especie del gen sea el mismo que el de la especie objetivo. Dicho de otro modo, cuando se desea expresar el presente efector en una mosca mediterránea de la fruta, se prefiere que los elementos deriven de los homólogos de la mosca mediterránea de la fruta del gen mencionado. No obstante, si esto fracasa, se prefieren versiones de *Drosophila*.

[0042] De hecho, se prefiere que el orden descendente de preferencia sea:

- (más preferido) de la especie objetivo (en la que se contempla la expresión del efector);
- del género objetivo (esto es, de otras especies del mismo género); y, por último
- 55 – (menos preferido) de la familia objetivo.

El motivo es que la acción de los promotores preferidos puede no estar al menos muy bien conservada entre las especies. Por ejemplo, un promotor de *Drosophila* puede no funcionar en la mosca mediterránea de la fruta, por lo que se prefiere un promotor del homólogo de la mosca mediterránea de la fruta del mismo gen. No obstante, debido a que la secuencia de codificación está bien conservada, es relativamente simple identificar el gen de beta-2-tubulin (por ejemplo) en un artrópodo determinado, e identificar, por tanto, mediante métodos habituales, un fragmento de promotor adecuado para la versión de la mosca mediterránea de la fruta.

[0043] Un promotor adecuado se identifica normalmente de 1 a 2 kb en la dirección 5' del inicio de la transcripción del ARNm. Aunque en la presente invención se prefiere este rango, algunos promotores de la línea germinal masculina pueden ser cortos, y también se prefiere un tramo de 100-200 pb, tanto en la ventana de 1-2 kb en la dirección 5' del inicio de la transcripción del ARNm, como incluso un tramo de 100-200 pb en la dirección 5' del inicio de la transcripción del ARNm.

[0044] Se aplican consideraciones similares por lo que respecta a la conservación de la secuencia en relación con las 5'-UTR, donde la conservación de la secuencia primaria es escasa. Por consiguiente, se prefiere que la 5'-UTR sea de la misma especie que el artrópodo objetivo, por ejemplo, siguiendo el ejemplo anterior, si el objetivo es la mosca mediterránea de la fruta, entonces se prefiere que la 5'-UTR sea una 5'-UTR del homólogo de la mosca mediterránea de la fruta del mismo gen (identificable según se ha descrito anteriormente en referencia al ORF más altamente conservado). Una forma de identificar y definir una 5'-UTR es que se acople (como el ARN) al extremo 5' de una secuencia que codifique el respectivo ORF, por ejemplo, beta-2 tubulin.

[0045] Tanto en el caso de la 5'-UTR como del promotor, se podrá identificar fácilmente si la secuencia utilizada en la presente expresión es insuficiente, ya que no habrá expresión del factor de transcripción, que se puede evaluar de manera habitual o examinarse mediante el suministro de una proteína de fusión que vincula el ORF del factor de transcripción a una proteína fluorescente.

[0046] Preferiblemente, el promotor en el elemento regulador en la dirección 5' de la segunda unidad de expresión es el promotor de *beta-2-tubulin*. Más preferiblemente, este se utiliza (en el elemento regulador en la dirección 5' de la segunda unidad de expresión) en combinación con la 5'-UTR de hsp83 descrita en el presente documento.

[0047] Se prefiere también que el promotor en el elemento regulador en la dirección 5' sea el promotor de *topi*. Para ayudar en la identificación de un homólogo de *topi*, en el presente documento se expone el ORF de *topi* (véase más adelante). Se ofrecen más directrices en Perezgasga *et al.* (2004), por ejemplo, donde se describen ortólogos de *topi* de *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura* y *Anopheles gambiae*, siendo este último especialmente preferido.

[0048] De forma alternativa, se prefiere que el promotor en el elemento regulador en la dirección 5' sea el promotor de *aly*. *Aly* representa una duplicación genética más reciente que *topi*, por lo que no se encuentra presente como un gen específico de la línea germinal masculina en una gama tan amplia de especies como *topi*. No obstante, cuando se encuentra presente, este se puede identificar fácilmente de la misma manera que *topi* en referencia al ORF conservado. Más adelante se expone el ORF de *aly*.

[0049] El factor de transcripción de la segunda unidad de expresión es preferiblemente tTA o una variante de este y la primera unidad de expresión comprende el operador tet (*tetO*). Las secuencias de aminoácidos de tTA, tTAV, tTAV2 y tTAV3 se proporcionan más adelante.

[0050] Por lo tanto, es preferible que el factor de transcripción de la segunda unidad de expresión comprenda polinucleótidos que codifiquen cualquiera de las secuencias de aminoácidos de tTA o sus variantes, por ejemplo, las que se han expuesto anteriormente. Según se ha descrito anteriormente, también se prefiere que el factor de transcripción sea GAL4 o una variante de este y la primera unidad de expresión comprenda el sitio UAS para GAL4.

[0051] Tanto para tTA como para Gal4, este incluye preferiblemente cualquier secuencia que presente (o codifique) al menos un 70 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de «identidad» con la secuencia de aminoácidos, o incluso de «similitud» menos rigurosa en al menos 50 residuos con uno de dichos números de SEQ ID, incluyendo las variantes.

[0052] Como se comprenderá, la ubicación de la secuencia de reconocimiento del factor de transcripción (la secuencia de ADN, por ejemplo, a la que se une el factor de transcripción) se debe encontrar en la primera unidad de expresión y no en el ORF. Por ejemplo, tanto con *tetO* como con UAS, la inserción se realiza en algunos miles de bases en la dirección 5' del sitio de inicio ATG, por ejemplo. Normalmente, se sitúan en algunos cientos de bases del promotor, pero pueden representar a un par de kb.

[0053] En cualquier caso, es preferible que el promotor sea un promotor mínimo. Junto con el intensificador, se puede hacer referencia al {intensificador + promotor mínimo} simplemente como un promotor a fin de simplificar. Por lo tanto, el intensificador (sitio de unión al activador transcripcional, p. ej., *tetO* o UAS) es, por definición, parte del promotor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0054] A continuación se describirán ciertas formas de realización de la invención en referencia a las siguientes figuras, donde:

- La figura 1 es un dibujo esquemático que representa un diseño de un ensayo de tasa de eclosión de huevos.
- 5 La figura 2 muestra el porcentaje de esterilidad masculina de OX4282-OX4104 con y sin tetraciclina;
- La figura 3 muestra el porcentaje de esterilidad masculina de OX4282-OX4458 con y sin tetraciclina;
- La figura 4 muestra el porcentaje de esterilidad masculina de OX4353 con y sin tetraciclina;
- La figura 5 muestra el porcentaje de esterilidad femenina de OX4353 con y sin tetraciclina;
- La figura 6 muestra la esterilidad reprimible específica de machos en las líneas OX4718- σ 1;
- 10 La figura 7 muestra el porcentaje de esterilidad masculina de la mosca del olivo OX4705 con y sin tetraciclina;
- La figura 8 muestra el porcentaje de esterilidad femenina de OX4705 con y sin tetraciclina;
- La figura 9 muestra el ensayo de tasa de eclosión en la cepa OX4466;
- La figura 10 muestra el ensayo de tasa de eclosión en la cepa OX4467-E1;
- 15 La figura 11 muestra el ensayo de tasa de eclosión de las líneas de *Aedes aegypti* portadoras tanto del alelo topi-tTAV como del tetO-Dm-Protamine-FokI;
- La figura 12 muestra el ensayo de tasa de eclosión de las líneas de *Aedes aegypti* portadoras tanto del alelo β 2-tubulin-tTAV como del tetO-Ae-Protamine-FokI;
- La figura 13 muestra las cepas de OX4353 cruzadas con dos líneas letales femeninas de RIDL principales (OX3864A y OX3647Q);
- 20 La figura 14 es un mapa de plásmido de OX3866;
- La figura 15 es un mapa de plásmido de OX3867;
- La figura 16 es un mapa de plásmido de OX3671;
- La figura 17 es un mapa de plásmido de OX4112;
- La figura 18 es un mapa de plásmido de OX4103;
- 25 La figura 19 es un mapa de plásmido de OX4104;
- La figura 20 es un mapa de plásmido de OX3831;
- La figura 21 es un mapa de plásmido de OX4458;
- La figura 22 es un mapa de plásmido de OX4391;
- La figura 23 es un mapa de plásmido de OX4286;
- 30 La figura 24 es un mapa de plásmido de OX3978;
- La figura 25 es un mapa de plásmido de OX4275;
- La figura 26 es un mapa de plásmido de OX4254;
- La figura 27 es un mapa de plásmido de OX4371.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

35 **[0055]** Los términos «secuencia de codificación» y ORF se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

[0056] Según se ha explicado anteriormente, en una forma de realización preferida, el esperma no muere (como podría implicar para algunas personas el término «letal[idad] de esperma»). En cambio, algo en el esperma mata al cigoto. Cuando se utiliza una nucleasa, se trata probablemente de daño genético en el ADN del esperma, pero también es posible que el ARN o la proteína que porta el esperma presente su efecto tras la fecundación (de hecho, Burt/Crisanti han sugerido que esto podría explicar la muerte de hembras, así como de embriones masculinos, en su fragmentadora de cromosoma X en *An. gambiae*, véase Windbichler *et al.* 2008, *supra*).

40

[0057] La técnica anterior expone que se debería utilizar el gen B2T (promotor y ORF) y sustituir el ORF por un gen de interés. No obstante, se ha descubierto que no se presta a un sistema condicional del tipo descrito en el presente documento. Si el sistema se va a hacer condicional, se ha descubierto que se deben realizar cambios significativos en esta configuración. Uno de los problemas radica en que la transcripción se detiene una vez la

45

célula ha empezado la meiosis. Aunque la traducción puede tener lugar todavía en la(s) célula(s) posmeiótica(s), la transcripción posterior no puede (Barreau *et al.* (2008) han descrito recientemente la transcripción posmeiótica de unos pocos genes excepcionales, pero la cuestión general es válida). Por consiguiente, si se desea expresar una proteína de interés (de dicho gen de interés), como una proteína efectora, entonces debe existir la suficiente expresión del gen efector (para proporcionar un ARN efector correspondiente) antes de la meiosis. El término «ARN efector» hace referencia a ARN, p. ej. ARNm, que codifica (que, cuando se traduce y opcionalmente se modifica después de la traducción, se escinde si es una proteína de fusión, y/o se pliega) y proporciona una secuencia de aminoácidos que actúa como proteína efectora.

[0058] En el contexto de la presente invención, el suministro «suficiente» de un transcrito o de una proteína se relaciona tanto con la cantidad como con el momento de dicho/a transcrito o proteína. Por consiguiente, cuando se aplica al gen efector, significa que el presente sistema asegura que al menos el transcrito para la proteína efectora se genera antes de la meiosis (momento) y que se suministra de esta forma la suficiente cantidad de dicho transcrito para lograr la función proteica deseada. Como se podrá apreciar, esto incluye todos los procesos intermedios de la expresión proteica, como el procesamiento opcional del transcrito, la traducción del transcrito a una secuencia de aminoácidos que presente una estructura primaria y la modificación opcional de esta, así como la disposición de la estructura secundaria, terciaria e incluso cuaternaria (por ejemplo, en el caso de un dímero).

[0059] Sin embargo, cuando se emplea un sistema condicional, los sistemas de la técnica anterior no pueden proporcionar las suficientes proteínas efectoras funcionales para que sean efectivos. Fundamentalmente, se cree que esto se debe a que dichos sistemas condicionales no solo necesitan la transcripción y la traducción de la proteína efectora, sino también la transcripción y la traducción de una proteína de factor de control que actúe como un factor de transcripción en (las unidades reguladoras de) la proteína efectora. Simplemente, no existe tiempo para los requisitos adicionales de un ciclo completo de transcripción, traducción y función de las proteínas, seguido por otra transcripción, todo ello antes de la meiosis. En otras palabras, si, como en este caso, el sistema condicional emplea un factor de transcripción, entonces el propio factor de transcripción se necesita transcribir y traducir para proporcionar una proteína de factor de transcripción funcional. Esta proteína de factor de transcripción debe, por tanto, actuar a su vez sobre los elementos reguladores del gen efector (que codifica la proteína efectora), de tal forma que exista la suficiente acumulación de transcrito efector en cada célula *antes* de la meiosis para permitir la traducción a tiempo del transcrito efector en cada célula *después* de la meiosis.

[0060] Lo que se ha descubierto es que no es únicamente suficiente reemplazar simplemente el ORF en los sistemas de la técnica anterior por un ORF que codifique un factor de transcripción. En lugar de esto, la región promotora B2T de la técnica *también* debe ser modificada o bien sustituida por completo, de forma que el sistema pueda producir el suficiente transcrito efector antes de la meiosis (para que presente por tanto una proteína funcional (traducida) después de la meiosis). Por consiguiente, en nuestro nuevo sistema condicional, se necesitan nuevos elementos reguladores en la dirección 5' (como un promotor y/o 5'-UTR) para conducir la expresión del ORF del factor de transcripción. Los nuevos elementos reguladores en la dirección 5' deben actuar lo suficientemente temprano en la espermatogénesis como para generar la suficiente proteína funcional de factor de transcripción para que actúe a su vez sobre los elementos reguladores que controlan la expresión del efector y generar de esta forma el suficiente transcrito efector antes de que tenga lugar la meiosis y se concluya la transcripción. Resulta una ventaja concreta de la presente invención el hecho de que es capaz de lograr esto en el contexto de un sistema condicional.

[0061] La proteína efectora (esto es, la proteína funcional codificada por el gen efector) presenta más preferiblemente un efecto perjudicial, después de la meiosis, en la capacidad del esperma para fecundar un óvulo para producir un cigoto viable.

[0062] El sistema es preferiblemente dominante, en el sentido de que la esterilidad que provoca en el esperma es dominante. Es aquí donde se introduce el concepto de letalidad de efecto paternal, véase más adelante. La esterilidad genética provocada por un efector preferido como una nucleasa es preferiblemente dominante *en los machos*, de tal forma que la totalidad del esperma de un macho heterocigoto se ve afectado. Se podrá apreciar que esto no es imprescindible, debido a que se pretende liberar machos homocigotos, aunque sí preferible. Esto contrasta con el dominante *en el cigoto*, como es el caso de la RIDL convencional. En estos sistemas de la técnica anterior, una copia (heredada con el esperma) es suficiente para destruir al cigoto, pero, evidentemente, los óvulos fecundados por el esperma (de un macho heterocigoto) que portan un alelo de tipo natural no se ven afectados.

[0063] El artrópodo es preferiblemente un insecto, y en el presente documento se dan a conocer ejemplos adecuados tanto de artrópodos insectos como no insectos. No obstante, se prefiere en concreto que el artrópodo sea un mosquito, particularmente de una especie capaz de transmitir la malaria o el dengue, o una plaga agrícola, como una mosca de la fruta.

[0064] El artrópodo en el que se expresa el presente sistema es un artrópodo macho y la expresión tiene lugar en las células de la línea germinal masculina de este, en concreto en las gónadas, esto es, los testículos, donde tiene lugar la espermatogénesis. Además, o de forma alternativa, la expresión puede tener lugar en los propios espermatozoides. Preferiblemente, la expresión tiene lugar en la mayoría de dichas células, esto es, al menos en

el 50 % de dichas células, pero puede ser un número mucho mayor, por ejemplo, al menos en el 80 %, al menos en el 90 %, al menos en el 95 %, o más preferiblemente en el 99-100 % de dichas células.

5 **[0065]** Por consiguiente, el sistema de expresión es capaz de expresar un gen, o es adecuado o está adaptado para ello, en la línea germinal masculina de un artrópodo. En el presente documento, «gen» hace referencia principalmente a una proteína. Dicho de otro modo, la función de este sistema de expresión es expresar una proteína en la línea germinal masculina (células de la línea germinal) de un artrópodo. El momento de esta expresión es crucial y se examina con más detalle en otra sección, pero debe ser suficiente como para provocar que los espermatozoides sean incapaces de fecundar un óvulo para producir un cigoto viable. Lo ideal sería que el propio sistema de expresión fuera, o estuviera comprendido en, un plásmido, transposón u otro elemento genético transponible capaz de expresarse en la línea germinal masculina del artrópodo, esto es, mediante transformación. Por lo tanto, preferiblemente, el sistema de expresión es un sistema de expresión de polinucleótidos, preferiblemente ADN, ARN o una mezcla de ambos.

15 **[0066]** La expresión desde el sistema es preferiblemente condicional. Aunque puede ser inducible, se prefiere en concreto que la condicionalidad sea reprimible, de tal forma que la expresión tenga lugar únicamente en ausencia de un represor. En un sistema inducible, la expresión tendrá lugar únicamente en presencia de un inductor. Un sistema reprimible particularmente preferido para su inclusión en el presente sistema de expresión es el sistema *tet* (tetraciclina) o el sistema GAL4/UAS, descritos ambos más adelante en el presente documento.

20 **[0067]** Se podrá apreciar que el promotor es capaz de expresarse en las células de la línea germinal masculina de un artrópodo, esto es, es capaz de iniciar la transcripción en esta. Asimismo, se podrá apreciar que el promotor está ligado de forma funcional a los elementos reguladores y a la secuencia de codificación del presente sistema.

25 **[0068]** Es posible que el sistema comprenda una única secuencia de codificación o más de una secuencia de codificación. La una o más secuencia(s) de codificación puede(n) estar unida(s) como una fusión o proporcionarse por separado. Ejemplos adecuados de otras secuencias de codificación son marcadores o indicadores como las proteínas fluorescentes (p. ej., GFP, EFP, YFP, etc.), aunque también se prefieren otros efectores para proporcionar una mayor especificidad.

30 **[0069]** Además de los elementos reguladores en la dirección 5' de la segunda unidad de expresión descritos específicamente, el presente sistema también puede incluir otros elementos reguladores según sea apropiado. Estos facilitan, es decir, permiten, la expresión en las células de la línea germinal masculina de un artrópodo. Asimismo, según se describe más adelante, los otros elementos reguladores facilitan el procesamiento y la traducción de ARN antes de la meiosis. Así, los otros elementos reguladores no son parte del promotor, aunque preferiblemente incluyen la 5'-UTR en la primera unidad de expresión y/o una 3'-UTR tanto en la primera como en la segunda unidades de expresión. Por lo tanto, estos otros elementos reguladores se pueden considerar como secuencias no traducidas, como es el caso de la 5'-UTR especificada de la segunda unidad de expresión. Preferiblemente, todas ellas incluyen al menos una parte considerable de una 5'-UTR o 3'-UTR, aunque más preferiblemente una 5'-UTR completa o una 3'-UTR completa. Lo más preferible sería que se proporcionara al menos una parte considerable de la 5'-UTR y una 3'-UTR (y preferiblemente ambas estén completas). Por consiguiente, los elementos reguladores pueden incluir la totalidad o parte de una 5'-UTR, incluidas las diversas secuencias reguladoras, asociadas o situadas en la 5'-UTR, que permiten la traducción de una secuencia de ARN, por ejemplo, una que ha sido transcrita recientemente a partir del ADN.

40 **[0070]** Todos los promotores descritos en el presente documento deberían incluir preferiblemente características tales como los sitios de unión del factor de transcripción y del ARN polimerasa. Estos son elementos promotores (normalmente), no elementos de UTR (aunque puede existir una superposición). Por lo general, una 5'-UTR presenta algunas señales de inicio de la traducción, probablemente también estabilidad de ARN, localización, control de la traducción y secuencias de intrones (aunque no necesariamente).

50 **[0071]** Lo mismo se aplica para otros elementos reguladores más que pueden incluir un casquete 5' y/o una cola de poliA. Dicho de otro modo, lo ideal sería que todos estos elementos estén presentes al menos en una parte considerable, esto es, lo suficiente como para proporcionar su función reguladora necesaria. Los expertos serían capaces de determinar si se ha proporcionado la suficiente expresión de las secuencias de codificación o no en presencia o ausencia de la totalidad o parte de estos elementos reguladores, ya que el requisito fundamental es la funcionalidad en la dirección 3' del espermatozoide. Los expertos son capaces de determinar si los espermatozoides son capaces de competir, lo cual resulta ventajoso. También son capaces de identificar fácilmente si los espermatozoides producen cigotos viables, lo cual no resulta ventajoso. Si los espermatozoides no compiten, y/o si no producen cigotos viables, entonces los niveles de expresión del efector necesitarán ser revisados. En la presente invención, el espermatozoide (por lo cual se entiende el transformado o GM (genéticamente modificado, esto es, portando el transgén/el presente sistema de expresión) es preferiblemente capaz de competir con espermatozoides de tipo natural, pero no de producir cigotos viables. Por consiguiente, si alguno de estos hechos no se consigue, especialmente si se producen cigotos viables, entonces el sistema necesita ser revisado.

60 **[0072]** No obstante, lo que se debe tener en cuenta es que el procesamiento del ARN del ORF/secuencia de codificación del efector en dicho transcrito efector tiene lugar antes de la meiosis y se acumula en suficientes

niveles como para que la proteína traducida posteriormente y funcional presente el efecto deseado en la capacidad del esperma para fecundar un óvulo con el fin de producir un cigoto viable. Esto se describe con más detalle en alguna otra sección.

5 **[0073]** Cuando el efector codifica la nucleasa preferida, por ejemplo, esto es un efecto nocivo. Esto sucede en cualquier momento (aunque, evidentemente, después de que el transcrito efector haya sido procesado, traducido, etc. en una proteína funcional). El requisito básico es que debe haber el suficiente transcrito del efector antes de la meiosis, ya que la transcripción concluye en ese momento. No obstante, se contempla que la proteína efectora pueda ser funcional tras la mitosis (pero, sin duda, tras la meiosis).

10 **[0074]** Preferiblemente, todos los elementos reguladores son homólogos entre sí, esto es, derivan del mismo gen. En concreto, se prefiere que, para unos niveles de expresión perfeccionados, los elementos reguladores sean heterólogos entre sí, de tal forma que, por ejemplo, la 3'-UTR pueda derivar de un gen distinto que la 5'-UTR escogida. Es preferible que el casquete 5' y la cola de poliA sean homólogos del promotor, esto es, del mismo gen que el promotor.

15 **[0075]** Debido a que el gen efector es uno que normalmente no se expresa en las células de la línea germinal de un artrópodo macho, también se podrá apreciar que los elementos reguladores son heterólogos del gen (esto es, heterólogos de la secuencia de codificación). En todo esto, se podrá apreciar que heterólogo hace referencia a la procedencia del elemento genético como el promotor, 5'-UTR (u otro elemento regulador) o secuencia de codificación, de tal forma que pueden provenir de distintos genes del mismo organismo; de genes conservados de distintos organismos; o incluso de distintos genes (no relacionados) de distintos organismos. Dicho de otro modo, tales elementos pueden provenir *de* (en el sentido de que son *derivados de*, aunque se contempla la modificación) una gama de genes distintos dentro de un único organismo o de una gama de genes distintos de diferentes organismos, con la condición de que sean suficientes como para proporcionar los niveles de expresión necesarios en la línea germinal masculina del artrópodo, esto es, en las gónadas o el esperma de este. En concreto, la secuencia de codificación puede no provenir necesariamente de un artrópodo, mientras que, por ejemplo, los elementos reguladores pueden derivar también preferiblemente de bacterias o virus si esto facilita el grado y el momento adecuados de la expresión proteica de la secuencia de codificación, particularmente en lo que respecta a la traducción premeiótica.

20 **[0076]** La secuencia de codificación codifica una proteína efectora. Como se ha mencionado anteriormente, la secuencia de codificación es preferiblemente heteróloga de los otros elementos en el sistema de expresión, como el promotor y/o los elementos reguladores. Aunque la secuencia de codificación en el sistema de expresión será un polinucleótido, se puede transcribir en un ARN mensajero adecuado (ARNm) suficiente para ser traducido a continuación a una proteína funcional. Se contemplan empalmes alternativos del ARN, regulados por secuencias intrónicas (control de empalme) con la colaboración de un espliceosoma. La ventaja de proporcionar o controlar empalmes alternativos es que se añade un nivel adicional de regulación a la expresión proteica. Se proporcionan más directrices sobre este tema en nuestra publicación anterior WO 2007/091099.

25 **[0077]** El momento y la ubicación de la expresión de la proteína efectora resultan cruciales para la presente invención, y se describen con detalle más adelante. Sin embargo, se podrá apreciar que la función del efector es preferiblemente presentar un efecto perjudicial en la capacidad de los espermatozoides para fecundar un óvulo con el fin de producir un cigoto viable.

40 **[0078]** Según se describe en el presente documento, es importante que la hembra tenga la sensación de que ha sido fecundada adecuadamente, de lo contrario, buscará otra pareja o, de hecho, puede que ya haya otro esperma de tipo natural con el que el presente esperma tenga que competir. No obstante, el esperma no será capaz de competir si sus funciones generales están significativamente deterioradas, como su capacidad para «nadar».

45 **[0079]** El efector preferido presenta un efecto adverso sobre la capacidad del esperma para fecundar un óvulo con el fin de producir un cigoto viable. Preferiblemente, induce o provoca de forma directa daños en el ADN. Ejemplos preferidos concretos de este son nucleasas, en concreto endonucleasas. Otros ejemplos de estos se exponen más adelante.

50 **[0080]** Los promotores conducen, esto es, son capaces de iniciar la transcripción, o están adaptados para ello, de la secuencia de codificación efectora, así como los elementos reguladores que la rodean, a ARN. El momento de esto resulta crucial y se destaca en otra parte. La traducción del efector puede tener lugar antes o después de la meiosis.

55 **[0081]** La proteína efectora posee un efecto nocivo, especialmente tras la meiosis (con posterioridad a la meiosis). El esperma se crea mediante espermatogénesis a partir de las células de la línea germinal masculina que portan el presente sistema de expresión. Por consiguiente, preferiblemente, dicho esperma porta o comprende al menos una copia de la proteína efectora, aunque, preferiblemente y de manera significativa, más de una copia. Este efecto perjudicial reduce la capacidad de los espermatozoides para fecundar un óvulo. Así, el presente sistema funciona correctamente antes de la inducción de letalidad en sistemas específicos de embrión, según se da a conocer en Horn y Schetelig (Horn, C., Wimmer, A.E. 2003, Schetelig, M.F., Handler, M.A. 2012).

60 Se prefiere encarecidamente que el efector permita que el esperma presente suficiente motilidad, de tal forma

que sea capaz de competir con esperma normal (esto es, de tipo natural o no transformado) en la carrera por alcanzar el óvulo. De nuevo, cabe destacar que no es fundamental que los espermatozoides porten una copia del ADN (gen que codifica el efector). De hecho, esto es preferible y es una diferencia clave con respecto a los sistemas de RIDL cigóticamente activos, ya que el presente sistema puede:

- 5 – asegurar que no exista eclosión de huevo;
- utilizarse en combinación con sexado genético;
- proporcionar condicionalidad; y
- presentar reproducción de líneas puras, letalidad cigótica y resistencia.

10 **[0082]** Por lo general, la inseminación se lleva a cabo en el tracto genital femenino. Los machos transfieren esperma durante el apareamiento, que es almacenado por la hembra. Los óvulos maduros que pasan por el tracto reproductor femenino se exponen a este esperma y se fecundan. En el caso de algunas especies, (mosca de la fruta mediterránea, *Aedes aegypti*), las hembras normalmente se aparean una única vez y utilizan los el esperma almacenado para todos sus óvulos. Algunos otros insectos, p. ej., algunas polillas, se aparean con bastante más frecuencia.

15 **[0083]** No obstante, se prefiere en concreto que el efector provoque suficientes daños en el ADN como para que la formación de un cigoto viable resulte imposible, por ejemplo, debido a que la información genética haploide proporcionada por el esperma esté dañada. Por ejemplo, se prefiere que el ADN del esperma presente una rotura de la doble cadena de este. Esta forma de realización preferida es el resultado del uso de endonucleasas, cuyos ejemplos se proporcionan en el presente documento. Así, en primer lugar, la presente invención impide la
20 formación de cigoto viable, en lugar de expresar otra proteína en el cigoto una vez formado. Esto supone una importante diferencia con respecto a la técnica anterior, como la técnica de RIDL, donde los cigotos funcionales se forman y después se expresa un efector para destruir el cigoto. En la presente invención, no se forma nunca un cigoto viable.

25 **[0084]** Por consiguiente, se prefiere que el cigoto no pueda avanzar nunca más allá de la etapa de célula única. Los embriones tempranos de insectos, por ejemplo, dividen sus núcleos sin división celular, y a continuación se celularizan, por lo que pasan de 1 célula a >1000 en un solo paso. No obstante, se prefiere también que el embrión simplemente no consiga eclosionar como una larva (lo cual es una característica deseable en el campo). Por lo tanto, un requisito mínimo es preferiblemente que el individuo no se consiga convertir en un adulto viable.

30 **[0085]** Por consiguiente, se puede observar que la presente invención proporciona, como solución a los problemas de la técnica anterior, un delicado equilibrio de acumulación premeiótica de transcrito de/para una proteína efectora heteróloga, preferiblemente una endonucleasa, antes de que tenga lugar la meiosis en el proceso espermatogénico, de tal forma que, tras la meiosis, el esperma resultante porte copias de la secuencia efectora traducida que, por tanto, puedan tener efecto en el esperma. Este efecto tiene lugar antes de la fecundación, provocando así en la práctica que el esperma sea estéril, de tal forma que el esperma es estéril y
35 activo. Este es el efecto «letal de esperma» que se describe en el presente documento.

[0086] No parece existir un gran control para la integridad del ADN en la meiosis. Por consiguiente, en general, los daños producidos en el ADN antes de la meiosis se toleran. De hecho, esto es probablemente lo que hace la radiación: la radiación da como resultado un tamaño variable de la cabeza de los espermatozoides, dado que el tamaño de la cabeza es proporcional al contenido de ADN. Por consiguiente, este contenido de ADN variable
40 puede derivar de la segregación desigual de ADN en la meiosis debido a los daños en el ADN causados por la radiación en células premeióticas. No obstante, existe un fuerte control en la mitosis (normalmente), por lo que es probable que los daños en el ADN de las células madre de la línea germinal (GSC) o de las células espermatogonias impidan el desarrollo de esperma funcional (en el sentido de la capacidad para fecundar un óvulo).

45 **[0087]** De acuerdo con otro aspecto de la invención, se da a conocer un método para expresar la proteína efectora en una gónada o un esperma. Preferiblemente, el método comprende transformar la gónada con el presente sistema de expresión. Este aspecto también se refiere a un método de transformación.

50 **[0088]** También se da a conocer un método de control de la población que comprende la expresión de dicha proteína a través del presente sistema de expresión en las gónadas de un artrópodo macho. Los artrópodos preferidos se describen en el presente documento.

[0089] La invención también da a conocer un método de gestión de la resistencia. En principio, para cualquier sistema de RIDL cigóticamente activo, incluido uno activo en embriones, existe una posibilidad de que algo en el genoma del cigoto (p. ej., material genético heredado de la madre) pueda impedir o reducir el efecto letal previsto. Con respecto a RIDL, este sería un factor de resistencia heredado. Para ejemplificar esto, un factor de
55 resistencia podría ser algo que reduzca el nivel de expresión del efector letal, o que reduzca la sensibilidad del objetivo del efector letal a ese efector. No obstante, en el caso de la presente invención, cuando se utiliza una endonucleasa, resulta complicado concebir cómo podría suceder ese hecho. El daño ya está hecho: utilizando

una nucleasa como ejemplo, el ADN del espermatozoide ya ha sido dañado y resulta complicado concebir cómo podría corregirse esto en el óvulo, provocando así que el daño sea permanente.

5 **[0090]** Con respecto a la gestión de la resistencia, se podría contemplar una situación en la cual, si estuviéramos utilizando RIDL específica de hembras, se observase que surgiera resistencia en el campo. Podríamos añadir un sistema de acuerdo con la presente invención, reservar la fsRIDL para la separación de sexos y la presente invención para la esterilidad. De forma alternativa, simplemente se podría cambiar al presente sistema, aunque la separación de sexos presenta diferentes beneficios para la TIE en algunas especies.

10 **[0091]** Esta gestión de la resistencia no es completamente integral: la resistencia de comportamiento todavía es posible (si las hembras pueden distinguir entre machos fértiles y estériles, existirá una intensa selección para aquellas que, preferentemente, se apareen con machos fértiles, evitando de esta manera la exposición a espermatozoides afectados por la presente invención). Dicha resistencia de comportamiento se ha observado en programas de TIE basados en la radiación, aunque únicamente en raras ocasiones (se cree que únicamente se tiene conocimiento de un buen ejemplo). Este argumento es estrechamente análogo a uno que han utilizado los defensores de la esterilización por radiación, que abogan por la superioridad del daño por radiación en el espermatozoide de un letal cigótico (RIDL) por los motivos expuestos anteriormente.

15 **[0092]** En los presentes métodos, se prefiere que el sistema condicional, preferiblemente el sistema *tet* descrito en el presente documento, se utilice para ofrecer un mayor grado de control. Esto permite, por ejemplo, la cría en condiciones de laboratorio, esto es, en presencia de un represor, como tetraciclina. Tras la liberación, o la supresión de la tetraciclina, la represión del sistema se elimina y la proteína efectora se expresa de esta forma.

20 **[0093]** La esterilidad masculina resulta útil en el presente contexto tanto en la agricultura, para impedir, por ejemplo, la eclosión de huevos, como en el control de enfermedades, por ejemplo, para el control de vectores de enfermedades, como mosquitos (aquellos que son responsables de la transmisión de la malaria y del dengue, por ejemplo). Así, la presente invención también da a conocer un método de biocontención que comprende la expresión del sistema en una población o la liberación de machos (portadores del sistema) en el campo. Con un sistema reprimible, que es preferible, la cepa se vuelve dependiente del represor y no se puede establecer en la naturaleza.

25 **[0094]** La invención también da a conocer un método de control de la calidad, por ejemplo, incluyendo un indicador como una proteína fluorescente, preferiblemente proteína verde fluorescente (GFP) o cualquiera de las otras proteínas fluorescentes con color conocidas en la técnica. Esta puede ser la proteína efectora en sí, actuando como un marcador de la transformación. Entre otros ejemplos de proteínas fluorescentes utilizadas como marcadores de transformación se incluyen DsRed, DsRed2 y AmCyan.

30 **[0095]** También se pueden utilizar marcadores de transformación independientes, incluidos aquellos descritos en el presente documento. La transcripción de estos marcadores de transformación puede encontrarse bajo el control de un promotor independiente del de la primera o la segunda unidad de expresión. Entre los ejemplos de tales promotores se incluyen el promotor de actina muscular, 3xP3, hrlE y hr5IE1.

35 **[0096]** Sin embargo, más preferiblemente, la proteína fluorescente puede estar ligada a la proteína efectora en el presente sistema, de forma que esta proteína indicadora y la expresión de la misma permitirán que se pueda determinar el grado de inclusión de un transgén o de otro efector en la población. Este hecho presenta al menos alguna de las siguientes ventajas:

40 (1) como cualquier marcador de este tipo, identifica la presencia del transgén, de forma que se puede seguir la herencia. Cuanto más estrechamente ligado está el marcador al rasgo de interés, p. ej., al sistema letal, menos probable es que las mutaciones que tengan lugar inactiven a uno, pero no al otro. No obstante, en la práctica, si estos (el marcador y el transgén) se encuentran en el mismo segmento de ADN insertado, esto resulta extremadamente poco probable en cualquier caso;

45 (2) si se encuentra ligado en el sentido de fusionado, un marcador muestra expresión de la proteína efectora. Esto permitiría que se pudiera observar la expresión real. Por ejemplo, en un ejemplo preferido de expresión tet-reprimible de una nucleasa, la fusión de la nucleasa con un indicador fluorescente permitiría que se pudiera comprobar que los insectos que van a liberarse expresaban la nucleasa. La presencia del marcador fluorescente podría indicar que (i) el macho presenta al menos una copia del transgén; (ii) el sistema de expresión funciona correctamente en el sentido de que proporciona la expresión del efector en ausencia del represor; (iii) los insectos expresan la fusión de nucleasa-FP (proteína fluorescente) (y, por consiguiente, no se criaban, por ejemplo, de forma involuntaria en presencia del represor); [(iv) suponiendo expresión específica de machos, son machos]; (v) por inferencia, son, en efecto, estériles. Por lo que respecta al control de calidad (QC, por sus siglas en inglés), este hecho proporciona mucha más seguridad en cuanto a que
50 «son estériles» que simplemente el hecho de saber que el macho posee una copia del transgén, que es lo que se consigue al utilizar un marcador fluorescente ligado (genéticamente ligado, esto es, un gen adyacente);

55 (3) con un microscopio de alta potencia, se puede observar cuándo progresa la expresión y dónde se localiza la proteína dentro de la célula. Este es un instrumento de desarrollo útil para monitorizar la consistencia, por

ejemplo, en el QC en curso, para determinar si el sistema funciona hoy igual que ayer/el año pasado, pero también en el contexto de la consistencia de expresión esperma-esperma; y

(4) otra ventaja se refiere al esperma fluorescente, descrito más adelante.

5 **[0097]** Existe una evidente conexión funcional para que una nucleasa escinda ADN, por lo que, si no se encuentra en el núcleo, es poco probable que presente el efecto deseado de escisión de ADN. Por consiguiente, en este sentido, se prefiere también que se proporcione una señal de localización nuclear para asegurar que la nucleasa se localiza en el núcleo.

10 **[0098]** En otro aspecto, se da a conocer por la presente un método de control de calidad, que comprende inducir o desreprimir la expresión del presente sistema de expresión en un grupo objetivo de individuos y determinar si aquellos individuos cumplen los criterios esperados, tales como tamaño, número, fase de desarrollo o localización. Por ejemplo, si el sistema incluye medios para expresar un indicador tal como una proteína fluorescente, ya sea como el efector o como parte de una proteína de fusión, por ejemplo, entonces los individuos en los que se ha inducido o desreprimido la expresión del sistema se tornarán visibles con longitudes de onda de luz adecuadas.

15 **[0099]** Se prefiere que el presente sistema incluya al menos un espaciador. Dichos espaciadores pueden estar situados ventajosamente entre cualquiera de los elementos presentes del sistema. Por ejemplo, se puede proporcionar un espaciador entre el promotor y los elementos reguladores y/o entre los elementos reguladores y la secuencia de codificación, para proporcionar de esta forma una «amortiguación» entre estos elementos con el fin de asegurar la adecuada funcionalidad de los mismos. Del mismo modo, el espaciador no tiene función en la expresión génica distinta de la de separar estos elementos, aunque opcionalmente puede incluir una serie de sitios de restricción, si se considera que esto es útil. Lo ideal sería que no incluyera ningún sitio de factor de unión a la transcripción, etc., debido a que estos podrían interferir con la expresión del efector.

20 **[0100]** Se prefiere también que el efector pueda estar en forma de una secuencia o proteína de fusión, tal como, por ejemplo, una nucleasa fusionada con un marcador de tal forma que la transcripción y la traducción del efector derive también en la transcripción y la traducción del marcador. Esto presenta la ventaja de mostrar exposición de un esperma a una nucleasa, siendo la presencia de la proteína fluorescente indicativa de que la nucleasa se ha expresado. Las proteínas fluorescentes se pueden observar con microscopía de fluorescencia utilizando filtros de excitación adecuados para la proteína fluorescente concreta. Ejemplos de estas son nuestras cepas LA4466 o LA4467 (LA4466 = PB-hr5IE1-DsRed-Aeprt-tGFP-EcoRI y LA4467 = PB-hr5IE1-DsRed-Aeprt-tGFP-FokI). Cabe destacar que las cepas más tempranas se denominaron «LA» por el nombre del inventor, Luke Alphey, pero desde entonces se ha adoptado el prefijo «OX» por el solicitante, Oxitec. En este sentido, los prefijos LA y OX se pueden emplear indistintamente para referirse a una cepa individual. Tanto LA4466/OX4466 como LA4467/OX4467 son ejemplos de una función de nucleasa fusionada con éxito con expresión fluorescente.

35 **[0101]** También se contempla que el presente sistema y los presentes métodos puedan utilizarse para producir esperma fluorescente. Por ejemplo, un indicador como aquellos mencionados anteriormente podría estar ligado al promotor o, de hecho, bajo un promotor independiente, como un sistema intensificador de promotor *tetO* si el efector es tTA o cualquiera de sus variantes. El esperma fluorescente resultaría ventajoso para la separación visual de esperma o gónadas, en concreto en métodos de disección o selección de sexo. En concreto, esto infiere la capacidad para determinar con qué individuo macho se ha apareado una hembra, lo cual resulta útil en el contexto de un programa de liberación en campo. Dicho método podría incluir, proporcionar (p. ej., capturándolas) hembras salvajes; diseccionarlas; buscar esperma almacenado y observar si dicho esperma porta el presente sistema, esto es, si es fluorescente. Esto indicará rápidamente si una hembra:

(i) es no apareada (todavía no se ha apareado);

(ii) se ha apareado con un macho de tipo natural (ya que muestra esperma no fluorescente);

45 (iii) se ha apareado con un macho transgénico que porta el presente sistema (que mostraría esperma fluorescente); o

(iv) se ha apareado con ambos tipos de macho (demostrado por la presencia de esperma fluorescente y no fluorescente).

50 **[0102]** Debido a que una pregunta fundamental a la hora de analizar y gestionar un programa de tipo TIE es «¿con quién se aparean las hembras?», esto supone una ventaja útil. Existen varios estudios que proponen esto, p. ej., el estudio de Malacrida *et al.*, 2007, ya citado, pero no en el contexto que se expone en el presente documento.

55 **[0103]** Un ejemplo de este concepto es el constructo (OX3878), que se diseñó para marcar con fluorescencia cabezas de espermatozoides, en concreto en *Aedes aegypti*. Este constructo utilizó una protamina de *Aedes aegypti* marcada con tGFP y sus secuencias reguladoras para expresar una proteína de fusión fluorescente de una manera específica para el esperma. Se detectó una intensa fluorescencia verde tanto en los testículos enteros diseccionados como en el esperma aislado de mosquitos macho OX3878. Esto muestra que la expresión

de proteínas fluorescentes puede ser conducida por el presente sistema para producir esperma fluorescente y, además, que la fluorescencia se puede detectar eficazmente.

5 **[0104]** Por consiguiente, en otro aspecto, la invención da a conocer un método para determinar el estado de apareamiento de un artrópodo hembra, que comprende el uso de un sistema de acuerdo con la presente
 invención en una población de machos transgénicos (esto es, liberados), donde dicho sistema comprende un
 10 marcador tal como una proteína indicadora fluorescente; y donde el esperma se encuentra presente, evaluando la presencia de dicho marcador en una hembra; siendo indicativa la presencia del marcador de que la hembra se ha apareado con un macho transgénico que porta el sistema. La presencia de esperma que no porta el marcador indica que la hembra se ha apareado con un individuo de tipo natural (no transgénico). Cuando el esperma no
 15 está presente, esto indica que la hembra no se ha apareado todavía, o de que no se ha apareado recientemente. En algunas formas de realización, el método incluye la liberación de machos transgénicos que portan el presente sistema y que les permite aparearse con hembras (esto es, hembras de tipo natural).

15 **[0105]** Como se podrá apreciar, en la presente invención debe aplicarse o permitirse que tenga lugar la expresión del sistema. Dicho de otro modo, se han cumplido las condiciones necesarias para inducir la expresión del efector (y, si es independiente, un marcador opcional como un indicador). En el caso de un sistema tet reprimible, por ejemplo, esto implica la supresión de tetraciclina de la dieta de los machos transgénicos.

20 **[0106]** El objetivo fundamental de la presente invención es proporcionar esterilidad masculina. No obstante, lo que también se ha demostrado es que es posible proporcionar esperma estéril que todavía sea capaz de competir con esperma de tipo natural. Esto resulta ventajoso debido a que deriva en un mayor grado de control de población debido a que, si el esperma de tipo natural puede fácilmente competir mejor que el esperma transformado, y las hembras probablemente se aparean con ambos tipos de macho, entonces únicamente habrá una reducción marginal en la población de la siguiente generación. Aun cuando normalmente las hembras se aparean una única vez, en tal situación puede existir una rigurosa selección para incrementar el reapareamiento.

25 **[0107]** Una proteína de fusión de ubiquitina también se puede incluir de forma ventajosa en el presente sistema. Esta presenta las ventajas de proporcionar la expresión de ambas proteínas como una fusión, esto es, como un único polipéptido, pero con escisión (cotraduccional) en dos proteínas independientes. Esto resulta útil si una de las proteínas no tolera fusiones (tTA, por ejemplo, tiene tendencia a no funcionar con fusiones N-terminal). Todavía se presenta coexpresión en una forma compacta; sin embargo, se pierde la capacidad de utilizar el marcado (p. ej., proteína fluorescente, FP) para determinar la ubicación subcelular de la proteína de fusión, ya
 30 que no se mantiene fusionada a esta.

35 **[0108]** Es preciso reiterar que el presente promotor es un promotor de la línea germinal «que actúa temprano», proporcionando así los niveles necesarios de transcripción antes de la meiosis. El promotor se define con detalle más adelante, pero, de nuevo, es importante tener en cuenta que preferiblemente el promotor no debería actuar más pronto que el promotor *topi* tras la mitosis ni, especialmente, en las células madre (al menos cuando el efector no daña dichos tipos de célula, esto es, cuando el efector no es una nucleasa).

40 **[0109]** El promotor debería presentar un efecto en la línea germinal y es preferible que la expresión del sistema sea condicional. Lo ideal sería que la espermatogénesis se completara de forma considerable antes de que se observe cualquier efecto negativo de la expresión del efector. Se prefiere que no haya efecto discernible en la función espermática hasta después de la entrada en el óvulo. A pesar de que el daño en el ADN podría considerarse quizá como «un efecto negativo», se puede considerar el ADN en un esperma simplemente como «carga», ya que no existe transcripción en el esperma. Cualquier daño en el ADN provocado por el efector debe ser suficiente para impedir la producción de progenie viable.

[0110] Por consiguiente, la presente invención proporciona preferiblemente especificidad condicional de la línea germinal (en términos de expresión).

45 **[0111]** En un ejemplo preferido, el «marco» para la segunda unidad de expresión en concreto se basa en el gen de tipo natural B2T de Dm o del artrópodo objetivo. La secuencia de codificación se sustituye por la del factor de transcripción y el promotor y/o las secuencias 5'-UTR también se modifican. De hecho, incluso se puede insertar un intensificador heterólogo o utilizarse una 3'-UTR heteróloga. Evidentemente, si se aplicaran todos estos cambios, quedaría muy poco de la secuencia original, por lo que se podrá apreciar que esta es una manera de
 50 construir la segunda unidad de expresión.

55 **[0112]** Con respecto a los elementos reguladores, en concreto al promotor y/o a la 5'-UTR del elemento regulador en la dirección 5' en la segunda unidad de expresión, es importante que no exista un retraso en el efecto traduccional del presente factor de transcripción. Una forma de lograr esto es utilizar los elementos reguladores de un gen que se sepa que transcribe y traduce a un nivel suficiente, preferiblemente elevado, antes de la meiosis. Entre los ejemplos adecuados se incluirían genes de chaperona, preferiblemente la familia de genes HSP, en concreto hsp83. En otra forma de realización preferida, la 3'-UTR puede derivar de un virus, como SV40.

[0113] En una forma de realización particularmente preferida, la segunda unidad de expresión del presente sistema comprende un promotor de Beta 2 tubulin (B2T) combinado con una 5'-UTR de B2T mejorada o una 5'-

UTR de hsp83. Opcionalmente, se puede utilizar una 3'-UTR de SV40. Cualquiera de entre el promotor y la 5'-UTR, o ambos, pueden ser de *topi*. *topi* se refiere al gen *matotopetli* de *Drosophila*. No obstante, la presente invención incluye homólogos funcionales y parálogos de otras especies. Estos se pueden identificar en referencia al ORF conservado según se ha descrito anteriormente. En el caso de una 5'-UTR de *topi*, el promotor puede ser también de *topi*, aunque se contempla que podría ser de cualquier otro de los promotores descritos en el presente documento, por ejemplo, B2T. De nuevo, cuando se utiliza el promotor de *topi* y/o se utiliza la 5'-UTR de *topi*, la 3'-UTR es también preferiblemente de *topi*, al igual que los elementos reguladores restantes, como el casquete 5' y la cola de poliA. El motivo de esto es que *topi* presenta un patrón de expresión «temprano» en la espermatogénesis, de tal forma que es capaz de conducir transcripción y traducción adecuadas tras las divisiones mitóticas, pero con anterioridad a la meiosis.

[0114] En el caso de B2T, a pesar de que el promotor es útil, se ha descubierto que parece haber una señal de retraso implicada en la 5'-UTR de B2T, dificultando la traducción temprana. Fue por este motivo que la 5'-UTR de B2T se puede sustituir por la 5'-UTR de, por ejemplo, una chaperona como hsp83. Por consiguiente, se podrá observar que, en algunos casos, el promotor y los elementos reguladores son homólogos entre sí, o al menos preferiblemente de homólogos conservados de distintas especies, en algunos casos puede ser necesario utilizar promotores y elementos reguladores que sean heterólogos entre sí con el fin de perfeccionar los patrones de expresión obtenidos para la presente invención. Como se puede observar en los Ejemplos, se proporciona un ejemplo para cada supuesto.

[0115] En otro aspecto, la presente invención proporciona también un artrópodo, cuyos ejemplos preferidos se exponen en el presente documento, transformado con el presente sistema o mediante los presentes métodos. Dicho de otro modo, la invención también da a conocer un transformante o un artrópodo modificado genéticamente, preferiblemente según se define posteriormente en el presente documento. Se podrá apreciar que dicho artrópodo es un macho, cuyas gónadas portan preferiblemente el presente sistema, de tal forma que la expresión del efector tenga lugar durante la espermatogénesis.

[0116] Supone una ventaja de la presente invención el hecho de que el promotor y los elementos reguladores actúen conjuntamente de forma sinérgica para proporcionar el patrón de expresión deseado.

[0117] Como se ha mencionado anteriormente, el promotor es preferiblemente de un gen específico de los testículos o al menos uno suficiente como para proporcionar expresión «temprana» durante la espermatogénesis. Entre las alternativas se incluyen promotores más constitutivos, como promotores estructurales, por ejemplo, la familia tubulin, en concreto beta tubulin, y más preferiblemente el promotor de beta 2 tubulin, y homólogos de este. Cuando se emplea este, es necesario utilizar el elemento regulador en la dirección 5' que no presente señales de retraso traduccionales observadas con al menos algunos ejemplos de elemento regulador en la dirección 5' de beta 2 tubulin. Una ventaja de utilizar el promotor B2T es que la secuencia de codificación del gen B2T se encuentra altamente conservada y que esta y un fragmento de promotor adecuado pueden ser fácilmente identificados y aislados de una especie de artrópodo determinada por un experto en la materia.

[0118] Un ejemplo de secuencia promotora de B2T se proporciona más adelante.

[0119] Un ejemplo de secuencia promotora del B2T mejorado se proporciona más adelante.

[0120] Más adelante, se proporciona un ejemplo de una 5'-UTR de B2T. Si se utilizan promotores B2T de otras especies en la presente invención, entonces un experto en la materia será capaz de identificar fácilmente la 5'-UTR basándose en su naturaleza conservada de la anterior SEQ ID N.º. Este podrá ser capaz de sustituirla por otra 5'-UTR. Los ejemplos preparados incluyen la 5'-UTR de chaperonas, en concreto de la familia hsp, particularmente hsp83. Un ejemplo adecuado, la 5'-UTR de hsp83, se expone más adelante.

[0121] Un ejemplo adecuado de una 3'-UTR que se ha utilizado con éxito en formas de realización de la presente invención es la de SV40. Esta 3'-UTR se proporciona más adelante.

[0122] La secuencia de codificación de *topi* se encuentra altamente conservada entre mosquitos como *Aedes aegypti* y la mosca mediterránea de la fruta (*C. capitata*). Por lo que respecta a B2T, se puede clonar la región codificante de *topi* (o parte de esta) mediante similitud de secuencias (muchos métodos, incluyendo aquellos basados en moléculas o secuencias), ir a continuación en dirección 5' hasta el inicio de la transcripción y tomar un fragmento de ADN 5' como el promotor. No siempre queda claro inmediatamente cuánta cantidad; de forma conservadora, se va 5' hasta alcanzar la siguiente región transcrita y se toma la totalidad de esta, pero en la práctica los promotores de la línea germinal masculina tienden a ser bastante cortos (unos cuantos cientos de bases), por lo que 1 kb 5' de inicio de la transcripción debería ser suficiente, 2-5 si se quiere ser cuidadoso. Las pruebas de ensayo y error del presente documento también resultan evidentes: vincular el promotor a la FP, realizar transgénicos, observar el patrón de expresión.

[0123] *topi* resulta útil debido a que presenta expresión temprana y está ligado a la espermatogénesis. Asimismo, resulta ventajoso debido a que es un sistema relativamente «compacto», esto es, consta de relativamente pocos polinucleótidos. De nuevo, es específico de los testículos y, de hecho, se expresa con anterioridad al B2T. La expresión comparada con un promotor B2T es quizá un poco más débil, aunque esto puede resultar ventajoso en

ciertos aspectos si los niveles de expresión necesitan ser mejorados. *Topi* es un ejemplo de un factor de transcripción, por lo que los promotores y/o elementos reguladores de otros factores de transcripción que se expresan en los testículos y que son preferiblemente específicos de los testículos (esto es, se expresan únicamente en los testículos) se prefieren por la presente.

5 **[0124]** Se ha descubierto que se ha observado un mayor efecto de esterilización global en cruces en los que la expresión de nucleasa fue conducida por el promotor *Topi*, en comparación con el B2-tubulin, en concreto en *Aedes aegypti*. No obstante, se observó en ambos casos una significativa esterilidad masculina, provocando que tanto *topi* como la forma alterada de B2-tubulin sean promotores adecuados para el «efecto de letalidad paternal» en mosquitos, especialmente en *Aedes aegypti*.

10 **[0125]** Es posible que los genes cuyo producto (p. ej., proteína codificada) se necesita únicamente durante o después de la meiosis se traduzcan únicamente un poco antes, o después, de la meiosis, aunque hayan sido transcritos con anterioridad. Por el contrario, los factores de transcripción que se necesitan para conducir la expresión de dichos genes se deben expresar (transcribir y traducir) lo suficientemente temprano para que su producto proteico se acumule lo suficiente como para conducir la expresión adecuada de genes objetivo con anterioridad al cese de la transcripción antes de las divisiones meióticas. Por consiguiente, cuando se desee expresar un activador transcripcional como tTA en la línea germinal masculina, los elementos reguladores de un factor de transcripción de la línea germinal masculina pueden resultar adecuados con la mínima modificación.

15 **[0126]** Más adelante, se describen con más detalle endonucleasas adecuadas. No obstante, las formas de realización preferidas incluyen endonucleasas con dedos de zinc, como se observa por ejemplo en LA4104. Otras alternativas incluyen *IppO1*, también denominada *I-Ppol*, según utiliza Crisanti *et al.* (Catteruccia *et al.*, 2009; Windbichler *et al.*, 2011; Windbichler *et al.*, 2007; Windbichler *et al.*, 2008). Esto supone ciertas ventajas, como que presenta una secuencia de reconocimiento muy larga, que, en consecuencia, resulta extraña en la secuencia aleatoria. No obstante, no presenta una alta especificidad en relación con algunas enzimas de restricción, por ejemplo, en cuanto a que esta tolerará (es decir, todavía cortará) secuencias con cierto grado de divergencia con respecto a las secuencias de reconocimiento convencionales. Windbichler *et al.* 2007, muestra una detención del crecimiento de células de tejido en cultivo de *An. gambiae*, lo cual es una prueba razonable (como también concluyen ellos) de que la expresión podría ser tóxica, aunque no se muestra directamente.

20 **[0127]** Un resultado distinto es el que obtienen Windbichler *et al.* 2008, donde la expresión de *I-Ppol*, que ellos consideran que debería cortar únicamente el cromosoma X en *An. Gambiae*, ya que su sitio objetivo en el ADN parece encontrarse únicamente en el cromosoma X en esta especie: dio machos completamente estériles, al contrario de lo esperado (no hay hijas viables debido al daño producido en el cromosoma X de origen paterno, pero sí hijos viables). La explicación que proponen, para la cual aportan algunos datos de apoyo, fue que el propio *I-Ppol* se transmite en el esperma al óvulo fecundado, donde también corta el cromosoma X de origen materno (parecen asumir como proteína, aunque potencialmente podría ser igualmente ARNm). Esto es más una cuestión de perdurabilidad, que está relacionada con la estabilidad de las proteínas (o del ARNm).

25 **[0128]** Una endonucleasa alternativa preferida es la endonucleasa de fusión de protamina *Fok-1*. Otras alternativas preferidas incluyen la endonucleasa de fusión de protamina *EcoRI*. La protamina es una proteína de unión al ADN y, por lo general, presenta una muy baja especificidad de secuencia. Esto se combina con *Fok-1*, un dominio de escisión de tipo IIS. Este dominio de escisión se debe dimerizar para escindir su objetivo. Esto es útil debido a que el sitio necesita estar lo suficientemente junto para dar lugar a efectos de concentración no lineal. Se espera que un efector que funciona como monómero presente su efecto (en el presente documento, escisión de ADN) en proporción a su concentración. Para muchas aplicaciones, se preferiría una curva de respuesta a la dosis no lineal, de forma que el efecto sea cercano a cero hasta un cierto punto, pero entonces aumenta hasta su plena eficacia relativamente rápido por encima de ese punto, siendo el límite de esta un efecto «umbral» binario. Se prevé que una nucleasa como protamina-*FokI* presente cierto grado de esta no linealidad. La protamina se une al ADN, pero presenta poca o ninguna especificidad de secuencia. Por consiguiente, en concentración baja (p. ej., de moléculas por núcleo), las proteínas protamina-*FokI* tenderán a dispersarse al azar en torno a la cromatina, encontrándose raras veces lo suficientemente próximas/orientadas como para dimerizar y cortar un cromosoma.

30 **[0129]** No obstante, conforme aumenta la concentración, la probabilidad de tal proximidad aumenta considerablemente, resultando en una relación no lineal entre la concentración y el corte. Esto facilita la selección de un promotor (y la inserción de transgén específico), ya que el sistema es relativamente inerte incluso con niveles de expresión desviada del objetivo (basal) bajos pero distintos de cero, mientras que todavía presenta el efecto deseado en expresión superior (en el dominio de expresión pretendido, desreprimido en el caso de un sistema de expresión reprimible). Se puede lograr un efecto similar cuando el efector debe dimerizar (o formar un complejo más grande, p. ej., un tetrámero) antes de unirse al ADN. Cuando se desea un efecto más lineal, esto se puede lograr fácilmente mediante el método de la invención, utilizando un dominio de nucleasa que no necesita dimerizarse, o cuando las subunidades necesarias se proporcionan en un único polipéptido (p. ej., dos copias del dominio *FokI* en lugar de una). Se puede conseguir la manipulación adicional del sistema mediante el uso de nucleasas de mayor o menor especificidad de secuencia, ya que las moléculas de proteína

disponibles se «concentrarán» por la especificidad y la afinidad del dominio de unión al ADN respecto a un mayor o menor número de sitios, resultando en un mayor o menor grado de concentración en esos sitios.

5 **[0130]** Es preferible que el gen Protamina (o la secuencia de codificación de la proteína) se obtenga a partir de la misma especie que el de la especie objetivo. Es preferible que el gen Protamina derive de *D. melanogaster*. También es preferible que el gen Protamina derive de *Aedes aegypti*.

10 **[0131]** Los ejemplos relacionados con los constructos OX4466 y OX4467 expresados de forma constitutiva fueron diseñados para investigar la funcionalidad de las proteínas efectoras Aeprotamin-EcoR1 y Aeprotamin-Fok1, respectivamente. Estos ejemplos muestran que ambas de estas proteínas efectoras deberían funcionar ciertamente al utilizarse en un sistema letal de esperma, esto es, bajo el control del promotor que actúa temprano (segunda unidad de expresión). De hecho, también se ha continuado para mostrar esto en el constructo binario Aeprotamin-Fok1. Habiendo demostrado la funcionalidad de ambas proteínas efectoras, se ha desarrollado e inyectado el constructo binario Aeprotamin-Fok1 (véase el ejemplo «expresión de tetO-Ae-Protamine-FokI-CD conducida por Topi-tTAV de OX4282-OX4627»), el cual confirmó el resultado positivo del sistema anterior (expresado de forma constitutiva). Por consiguiente, es totalmente razonable esperar que un sistema EcoR1 también funcionará en la configuración letal de esperma. Por consiguiente, el gen efector es preferiblemente Aeprotamin-EcoR1 o Aeprotamin-Fok1. Estos son preferiblemente para su uso en mosquitos y en concreto *Aedes*, especialmente *Aedes aegypti*.

20 **[0132]** Entre otras endonucleasas de tipo II se incluyen Eco32I, Bfil y MbolI, por ejemplo. Estas endonucleasas son homodiméricas. Por lo general, las endonucleasas diméricas resultan ventajosas. Son diméricas debido a que únicamente escinden ADN cuando están dimerizadas. Cuando están adecuadamente dimerizadas, dan como resultado roturas de la doble cadena de ADN.

25 **[0133]** Otras endonucleasas pueden incluir HEG (endonucleasas *homing*). Estas HEG pueden ser monómeros o dímeros, pero, por lo general, presentan baja especificidad (en el sentido de que no requieren combinaciones perfectas con sus (muy largas) secuencias de reconocimiento, aunque realmente no cortan simplemente una secuencia aleatoria). Entre otras alternativas, se incluyen endonucleasas de restricción de bacterias. Estas también presentan baja especificidad.

30 **[0134]** Por consiguiente, los expertos en la materia pueden elegir el nivel de especificidad requerido. Como se podrá apreciar, las endonucleasas de baja especificidad romperán o dañarán el ADN en una mayor cantidad de ocasiones que las endonucleasas de alta especificidad, para una determinada secuencia de reconocimiento. Las HEG presentan secuencias de reconocimiento muy largas que tendrían lugar por casualidad con una frecuencia a menudo menor que uno por genoma. Por lo tanto, a pesar de su imperfecta especificidad para esa secuencia, puede que no corten en absoluto (p. ej., I-SceI en Windbichler *et al.*, 2011, corta únicamente el sitio modificado, y no el resto del genoma; al menos, no con una frecuencia tan alta como para provocar problemas evidentes en su experimento).

35 **[0135]** Así, se puede lograr un nivel superior de perfeccionamiento mediante la selección apropiada de endonucleasas como el efector. Se ha descubierto que la proteína de fusión efectora de nucleasa es completamente funcional en tres especies distintas de dípteros analizadas hasta el momento, a saber, *C. capitata*, *B. oleae* y *Aedes aegypti*. Estas especies se prefieren particularmente, al igual que otras especies del mismo género.

40 **[0136]** En concreto, se prefiere que el artrópodo (el organismo huésped en el que se expresa el presente sistema) sea un insecto, preferiblemente un tefrítido. En concreto, se prefiere que el insecto sea del orden Diptera, especialmente dípteros superiores, y en concreto que sea una mosca de la fruta tefrítida, preferiblemente la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), preferiblemente la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*), preferiblemente la mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsalis*), la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), la mosca del melón (*Bactrocera cucurbitae*), la mosca natal de la fruta (*Ceratitis rosa*), la mosca de las cerezas (*Rhagoletis cerasi*), la mosca de la fruta de Queensland (*Bactrocera tryoni*), la mosca del melocotón (*Bactrocera zonata*), la mosca de la fruta del Caribe (*Anastrepha suspensa*) o la mosca de las Indias Occidentales (*Anastrepha obliqua*). En concreto, también se prefiere que el organismo huésped sea un mosquito, preferiblemente de los géneros *Stegomyia*, *Aedes*, *Anopheles* o *Culex*. En concreto, se prefiere *Stegomyia aegypti*, también conocido como *Aedes aegypti*, *Stegomyia albopicta* (también conocido como *Aedes albopictus*), *Anopheles stephensi*, *Anopheles albimanus* y *Anopheles gambiae*.

50 **[0137]** Dentro de Diptera, otro grupo preferido es Calliphoridae, en concreto la mosca del gusano barrenador del Nuevo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*), la mosca del gusano barrenador del Viejo Mundo (*Chrysomya bezziana*) y el moscardón australiano de las ovejas (*Lucilia cuprina*). También se prefieren los órdenes Lepidoptera y Coleoptera, especialmente polillas, incluyendo la polilla del manzano (*Cydia pomonella*) y el gusano de seda (*Bombyx mori*), el gusano rosado del algodón (*Pectinophora gossypiella*), la palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), la lagarta peluda (*Lymantria dispar*), el gusano de la naranja navel (*Amyelois transitella*), la polilla del melocotonero (*Anarsia lineatella*) y el barrenador del tallo amarillo (*Tryporyza incertulas*), y también los noctuidos, especialmente Heliiothinae. Entre el orden Coleoptera, se prefieren particularmente el escarabajo japonés (*Popillia japonica*), el escarabajo de franjas blancas (*Graphognathus* spp.), el picudo del

algodonero (*Anthonomus grandis*), el gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica* spp.) y el escarabajo de la patata (*Leptinotarsa decemlineata*).

5 [0138] No obstante, como se ha mostrado en los Ejemplos, el presente sistema y los presentes métodos se pueden implantar en dípteros, incluyendo dípteros superiores e inferiores. Por consiguiente, se prefieren los dípteros superiores. También se prefieren los dípteros inferiores.

[0139] En algunas formas de realización, se prefiere que el insecto no sea un drosófilido. Así, en algunas formas de realización, se excluye la expresión en drosófilidos, especialmente en *Drosophila melanogaster*.

10 [0140] Es preferible que la expresión de la proteína efectora provoque una consecuencia fenotípica en el organismo, a saber, esterilidad. En concreto, se prefiere que la proteína funcional pueda estar asociada a marcadores visibles (incluida la fluorescencia).

15 [0141] Cuando se haga referencia a una secuencia de nucleótidos o proteínas en concreto, se comprenderá que esta incluye referencias a cualquier mutante o variante de la misma, que presenta actividad biológica considerablemente equivalente a esta. Preferiblemente, el mutante o variante presenta al menos un 85 %, preferiblemente al menos un 90 %, preferiblemente al menos un 95 %, preferiblemente al menos un 99 %, preferiblemente al menos un 99,9 %, y más preferiblemente al menos un 99,99 % de identidad de secuencia con las secuencias de referencia.

[0142] Se prevé que:

20 a) la presente esterilidad sea dominante, por lo que todo el esperma de un macho heterocigoto se vería afectado (no necesariamente todo defectuoso, ya que el sistema podría ser selectivo para algún tipo de esperma, o menos de un 100 % efectivo contra el esperma que debería verse afectado); y

b) el mecanismo no depende de la herencia del cigoto de un gen letal dominante a través de este esperma.

[0143] Por lo tanto, el presente sistema no es un sistema de RIDL, ya que tanto a) como b) le diferencian de RIDL.

25 [0144] Una ventaja potencial de la radiación había sido que resulta difícil observar qué cambio hereditario o genético en la población objetivo natural podría superar el efecto de esterilización de la radiación. Por consiguiente, es difícil imaginar que pueda aparecer resistencia en la población salvaje ante este aspecto de la TIE basada en radiación (sin embargo, podrían surgir otros tipos de resistencia, como resistencia de comportamiento, p. ej., apareamiento selectivo (Dhillon *et al.*, 2005). Por el contrario, posiblemente podrían aparecer genes o alelos que confieran resistencia a la acción letal o de incapacitación de los genes de RIDL. Del mismo modo, aunque no se conoce la base bioquímica exacta de la IC, los embriones infectados con cepas adecuadas de *Wolbachia* son capaces de revertir la esterilidad masculina inducida por IC, por lo que parece posible una resistencia bioquímica/genética a la esterilidad inducida por IC.

30

[0145] La presente invención supera estas dificultades. Los mecanismos de esterilización están diseñados para actuar con anterioridad a la expresión génica cigótica, de forma que la posibilidad de resistencia hereditaria se ve seriamente limitada. Por ejemplo, se considera la utilización de una nucleasa expresada en la espermatogénesis. En condiciones restrictivas (para la fertilidad, propicias para la expresión de la nucleasa), esto tenderá a dañar el ADN de manera muy parecida a como lo hace la radiación, p. ej., induciendo roturas de cadena doble. Por lo tanto, es igualmente complicado imaginar cómo podría desarrollar una población objetivo salvaje resistencia a tal esterilidad o a la letalidad de efecto paternal. Puede suceder que la población artificial de cría masiva desarrolle resistencia, a pesar del uso de un sistema de expresión condicional adecuado, de forma que se produzca un pequeño daño en el esperma (o en otras células o tejidos) en condiciones propicias (para la fertilidad), que reducirá al mínimo la presión de selección para dichos alelos. Aunque en este respecto es similar a la radiación, el método de la presente invención presenta varias ventajas. El efecto de esterilización se limita a las gónadas o gametos, por lo que es menos probable reducir el rendimiento de los insectos. Mediante la selección de un sistema de expresión reprimible adecuado, se puede lograr la esterilidad simplemente eliminando el represor. En esta versión, el sistema también ofrece biocontención, de forma que los insectos liberados en la naturaleza (intencionadamente o de forma involuntaria) son estériles, o la totalidad o parte de su progenie es estéril.

35

40

45

[0146] Se pretende combinar la tecnología de RIDL letal de hembras (o no voladoras) con la presente invención «letal de esperma» para desarrollar productos de insecto adecuados para su aplicación en un programa TIE. En los ejemplos se muestra que el presente sistema «letal de esperma» es viable en combinación con tecnología de RIDL. Naturalmente, también habrá especies donde la separación de sexo no sea deseable, y otras donde sea deseable, pero se pueda lograr a través de otros medios (p. ej., separación de sexo física basada en el tamaño, como es adecuado en el caso de *Aedes aegypti*). Así, preferiblemente, el presente sistema de expresión también se puede combinar con tecnología letal (o no voladora) de hembras ya existente para desarrollar otros productos de artrópodo, y en concreto de insecto, adecuados para su aplicación en un programa de tipo TIE. La liberación únicamente de machos se considera deseable para la TIE en varias especies, por ejemplo cuando las hembras adultas son realmente o potencialmente dañinas aun cuando son estériles (p. ej., mosquitos, por su picadura, o la mosca mediterránea de la fruta, por oviposición en fruta sin madurar), además, en el caso de la mosca

50

55

mediterránea de la fruta, la liberación simultánea de hembras estériles parece «distraer» a los machos estériles a la hora de buscar hembras salvajes (Rendón *et al.*, 2004).

5 [0147] Los sistemas adecuados de separación de sexo incluyen la separación basada en el dimorfismo sexual natural (p. ej., el tamaño en el caso de *Aedes aegypti*, el período de pupación en el caso de la mosca tsé-tsé); o
 10 en el dimorfismo sexual inducido (p. ej., Catteruccia *et al.*, 2005). De forma alternativa, se puede eliminar un sexo por medio del uso de un sistema de sexado genético letal; dichos sistemas han sido creados mediante genética clásica (p. ej., Franz, 2005; Klassen y Curtis, 2005) y también mediante métodos de ADN recombinante, incluyendo formas de realización de RIDL (Fu *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2000). Ambos sistemas de expresión
 15 condicional pueden utilizar la misma condición, de forma que el control de cada uno de los dos fenotipos se controle de forma coordinada. Así, por ejemplo, si cada sistema se reprimiera con tetraciclina (o análogos adecuados de esta, como clortetraciclina), la cría en presencia de una concentración adecuada de tetraciclina permitiría que la cepa creciera hasta cantidades adecuadas. En la última generación antes de la liberación, la cría sin tetraciclina resultaría en una desrepresión tanto del sistema letal específico de hembras como del sistema letal de esperma propuesto. Por consiguiente, las hembras morirían y los machos restantes serían estériles.

20 [0148] Se puede prever un cierto grado de interacción entre los dos sistemas tet-reprimibles, de tal forma que ambos efectores serán expresados por ambos sistemas. Es poco probable que la expresión del efector letal de esperma en hembras presente cualquier consecuencia no deseable, ya que se pretende que estas hembras mueran. La interacción inversa, esto es, la expresión del efector letal de hembras en la espermatogénesis, puede resultar más problemática, dependiendo de la naturaleza del efector letal de hembras y de su efecto en la espermatogénesis. Dicha interacción, en caso de que no se considere deseable, se puede evitar fácilmente limitando la expresión del efector letal de hembras en hembras, por ejemplo, mediante el uso de empalme alternativo específico del sexo para regular la producción de efector funcional (Fu *et al.*, 2007).

[0149] Las tecnologías combinadas se pueden lograr de dos maneras:

25 – la invención propuesta se puede insertar por separado en el genoma del insecto mediante transformación mediada por transposón. Un análisis exhaustivo de las cepas generadas derivará en cepas candidatas con las características deseadas. Estas se pueden retrocruzar con las cepas principales letales (preferiblemente fs-RIDL) de hembras para generar homocigotos dobles para las dos inserciones.

30 [0150] En una forma de realización particularmente preferida, los dos sistemas se pueden combinar en un único constructo de ADN, con un constructo condicional letal específico de hembras. Por consiguiente, este constructo proporcionaría tanto sexado genético como esterilidad masculina.

35 [0151] La espermatogénesis es un proceso sumamente especializado de diferenciación celular que deriva en la formación de espermatozoides funcionales para una reproducción exitosa. En principio, el proceso de espermatogénesis está bien conservado en todos los organismos que se multiplican sexualmente, aunque el tamaño y la forma del esperma maduro varía considerablemente entre distintas especies. Muchos detalles son comparables entre mamíferos y *Drosophila*, provocando que la mosca sea un sistema modelo óptimo para estudiar defectos de fecundación. Las células germinales de *Drosophila*, como las de los mamíferos, se reservan pronto en el desarrollo embrionario y migran a través del primordio del intestino distal hacia el interior del embrión, donde se unen a las partes somáticas de las gónadas embrionarias (Zhao y Garbers, 2002). Al final de
 40 la tercera fase larvaria y al comienzo de la pupariación, las primeras células germinales han comenzado la meiosis. La espermatogénesis es un proceso continuo durante la vida adulta y, por tanto, los testículos adultos contienen todas las fases, desde las células madre hasta el esperma maduro.

45 [0152] Por lo general, para las células de la línea germinal masculina (de insecto) en la espermatogénesis, la transcripción concluye poco antes de la meiosis (Fuller, 1993). Puede haber unos pocos genes transcritos después (Barreau *et al.*, 2008) pero estos son excepcionales. Por lo general, los genes cuyos productos se necesitan en la meiosis o después de esta se transcriben, no obstante, antes de la meiosis; el ARNm se almacena y se transcribe más tarde, esto es, cuando se necesita, p. ej., tras la meiosis. A continuación, normalmente, el ARNm se degrada tras la traducción. Muchos genes siguen este patrón; entre los ejemplos se incluían β 2-Tubulin y protaminas, también el regulador meiótico *twine*. De estas, la proteína *twine* se necesita
 50 para la entrada en meiosis, la β 2-Tubulin se necesita para el huso meiótico y tras la meiosis para el flagelo; las protaminas se necesitan estrictamente tras la meiosis. Así, se puede conseguir el control adecuado del tiempo.

55 [0153] En principio, debería ser posible interrumpir la producción de esperma afectando (p. ej., destruyendo) a las células somáticas en los testículos (p. ej., células quísticas) que se necesitan para la espermatogénesis, o afectando a la producción de hormonas, etc. en los machos o (ligeramente más prometedor) expresando o anulando factores en el líquido seminal. Sin embargo, dichos métodos producirían, casi con toda seguridad, en el mejor de los casos, machos sin esperma, o evidentemente con esperma aberrante. Por este motivo, hemos tratado de centrarnos en la expresión en la línea germinal masculina.

Secuencias promotoras de la línea germinal

[0154] Por consiguiente, se puede realizar fácilmente un constructo de expresión de un único gen, el cual expresará el gen en cuestión («efector») en la línea germinal masculina. Se han identificado muchos genes en *Drosophila* que se expresan durante la espermatogénesis, y muchos de estos son específicos de la línea germinal, o de la línea germinal masculina. Dichos datos de expresión se pueden conseguir con facilidad directamente a partir de la literatura; también existen proyectos a gran escala (Chintapalli *et al.*, 2007 y <http://www.flyatlas.org/>) que han llevado a cabo análisis de expresión en muchos de los genes del genoma de *Drosophila* (p. ej., FlyAtlas (Chintapalli *et al.*, 2007) y <http://www.flyatlas.org/>, la base de datos de expresión de testículos de *Drosophila* (www.fly-ted.org) y los datos recogidos en FlyBase, p. ej. <http://flybase.bio.indiana.edu/>). Por lo tanto, un constructo de expresión se puede realizar de la siguiente manera:

(1) identificar un gen adecuado expresado en los testículos, p. ej., β 2-tubulin, que codifica una isoforma de β -tubulin específica de la línea germinal masculina (Nielsen *et al.*, 2001) (un informe reciente (Jattani *et al.*, 2009) indica que la expresión y la función de β 2-Tubulin pueden no estar estrictamente limitadas a la línea germinal masculina de *Drosophila*, aunque se utilizó un fragmento de promotor de β 2-Tubulin de *An. gambiae* para expresar una nucleasa potente, que se sabe que corta secuencias del genoma de *An. gambiae*, sin efectos evidentes en otro sitio que no sea la línea germinal masculina y en embriones fecundados con esperma de dichos machos);

(2) aislar una copia de tipo natural del gen;

(3) sustituir la región codificante del gen por el gen efector; y

(4) realizar insectos transgénicos que porten este gen.

[0155] Se ha conseguido la expresión específica en la línea germinal masculina de indicadores de proteína fluorescente mediante este método en *Drosophila* utilizando una gama de genes implicados en la espermatogénesis, como protamina, *don juan* y *sneaky*, por ejemplo (Raja y Renkawitz-Pohl, 2005; Santel *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2006). La β 2-Tubulin es un gen bien conservado, por lo que una ampliación de este método, en la fase 2 que aísla el gen apropiado de la especie de interés (o una especie relacionada, como *Anopheles gambiae* para su uso en *Anopheles stephensi* (Catteruccia *et al.*, 2005)) permitirá su uso en una especie de artrópodo seleccionada de manera arbitraria. En efecto, este enfoque se ha utilizado con éxito para la expresión específica de la línea germinal masculina de un indicador de proteína fluorescente en varias especies, incluida la mosca mediterránea de la fruta (Malacrida *et al.*, 2007), *Aedes aegypti* (Maynard-Smith *et al.*, 2007) y *Anopheles gambiae* (Catteruccia *et al.*, 2005), todas las cuales utilizaron fragmentos de promotor de β 2-Tubulin de la especie objetivo, excepto Catteruccia *et al.*, que utilizó un fragmento de promotor del β 2-Tubulin de *Anopheles gambiae* para conducir la expresión específica de espermatogénesis de una proteína fluorescente en *Anopheles stephensi*.

[0156] La «letalidad de esperma» se utilizará en combinación con un sistema de expresión condicional para asegurar la transición a través de generaciones en condiciones propicias. Esta condición puede ser temperatura, que funcione por ejemplo a través de un efector proteico sensible a la temperatura. No obstante, los sistemas condicionales basados en la temperatura tienden a ser «parcialmente funcionales», por ejemplo. La cepa de mosca mediterránea de la fruta con sexado TSL (Casares, 2002), un sistema basado en la presencia/ausencia de una molécula aplicada de forma externa (p. ej., RU486/mifepristona (Osterwalder *et al.*, 2001)), podría ser una alternativa. No obstante, no es adecuada para un sistema de expresión bipartito (Brand *et al.*, 1994; Brand y Perrimon, 1993; Fussenegger, 2001; Fussenegger *et al.*, 2000; Gossen y Bujard, 1992; Gossen y Bujard, 2002; Victorinová y Wimmer, 2007).

[0157] Por otro lado, el sistema Tet-off o Tet-on es el esquema de elección (Gossen y Bujard, 1992; Gossen y Bujard, 2002). Este sistema depende de la expresión de un factor de transcripción que conduce de forma condicional la expresión de un gen adecuado (el efector). En los sistemas tet, la unión del factor de transcripción sintético tTA (o sus variantes, incluyendo rtTA) se ve afectada por la concentración de tetraciclina y/o compuestos relacionados como clortetraciclina o doxiciclina. En el sistema de expresión tet-off, la unión de tTA con tetO se inhibe mediante tetraciclina, por lo que la expresión del efector se inhibe mediante tetraciclina, de ahí que sea «Tet-off». También se conoce un sistema de expresión similar regulado por estreptogramina (Fussenegger *et al.*, 2000). No obstante, la expresión de tTA bajo el control de β 2-tubulin, por ejemplo, no resultará en una expresión significativa del efector, incluso en ausencia de tetraciclina. Esto se debe a que la expresión de tTA será considerablemente posmeiótica (más concretamente, considerablemente después de que se concluya la transcripción antes de la meiosis) y, por consiguiente, demasiado tarde como para conducir la expresión del efector, incluso en ausencia de tetraciclina.

[0158] Lo más importante es comprender el momento de expresión génica en la espermatogénesis en artrópodos y en concreto en insectos. En esencia, no existe expresión génica tras el inicio de la meiosis. Por consiguiente, para usar un sistema de expresión bipartito como tet-off (o tet-on), la transcripción del factor de transcripción específico de la secuencia (tTA) se debe realizar con la suficiente antelación con respecto a la meiosis para permitir la acumulación de ARNm de tTA, la traducción de proteína tTA y la transcripción dependiente de tTA del efector, todo ello antes de la meiosis. La mayoría de los genes expresados durante la

espermatogénesis se transcriben en espermatocitos (esto es, antes de la meiosis), pero entonces se traducen después, cuando el producto proteico realmente se necesita. En el caso de la mayoría de proteínas implicadas en la diferenciación o función espermática (y, por lo tanto, la mayoría de proteínas de esperma), esto significa que la traducción se realiza tras la meiosis. Por consiguiente, la expresión adecuada para estos propósitos implica la transcripción temprana, ASÍ COMO la traducción temprana del tTA. Esto no se reconoce ampliamente y tampoco es fácil de conseguir. Así, hemos sido los primeros en identificar que había un problema aquí.

[0159] Se puede construir una 3'-UTR adecuada utilizando la secuencia heteróloga, en lugar de la secuencia derivada del gen expresado en testículos, también la totalidad o parte de la región codificante del gen expresado en testículos se puede conservar, por ejemplo. Se puede conseguir la expresión específica de la línea germinal masculina de indicadores de proteína fluorescente mediante este método en *Drosophila* utilizando una serie de genes implicados en la espermatogénesis, como protamina, *don juan* y *sneaky*, por ejemplo (Raja y Renkawitz-Pohl, 2005; Santel *et al.*, 1997; Wilson *et al.*, 2006). Del mismo modo, se puede sustituir la 5'-UTR por una secuencia heteróloga para evitar la traducción tras la meiosis. La región no traducida cinco prima (5'-UTR) puede contener secuencias para controlar la expresión génica por medio de elementos reguladores, por ejemplo. Las secuencias que favorecen o inhiben el inicio de la traducción o los intrones dentro de las 5'-UTR se han vinculado con la regulación de la expresión génica y la exportación de ARNm (Cenic *et al.*, 2011). Comienza en el sitio de inicio de la transcripción y termina un nucleótido (nt) antes del codón de inicio (normalmente AUG) de la región codificante.

[0160] Con el fin de obtener una expresión adecuada de tAV y, respectivamente, del gen efector, es decir, para obtener «letalidad de esperma», se ha sustituido (en el elemento regulador en la dirección 5' de la segunda unidad de expresión) la 5'-UTR, y en algunos casos la 3'-UTR, del gen β 2-Tubulin por la(s) secuencia(s) correspondiente(s) de hsp83 (Theodoraki y Mintzas, 2006) y SV40 (virus 40 vacuolado del simio o *virus del simio* 40) (Cheng *et al.*, 2009), respectivamente, véanse la descripción en el presente documento y los presentes Ejemplos.

[0161] En otras palabras, la 5'-UTR preferida es de hsp83. Esta es preferiblemente de la mosca mediterránea de la fruta, ya que es la que se ha utilizado en ejemplos específicos, pero también se prefieren homólogos de otras especies. La 3'-UTR preferida es de SV40, pero también podría ser de hsp83 (de las especies anteriores para la 5'-UTR). Con todo, se ha descubierto que la elección de la 5'-UTR es más importante que la de la 3'-UTR.

[0162] La expresión más temprana de un transactivador, ejemplificado en el presente documento como tTA, también se puede lograr mediante cualquiera de los siguientes métodos. Un ejemplo es mediante la identificación de promotores que actúen más temprano en la espermatogénesis. Esto significa que los promotores actúan de tal forma que un factor de transcripción, p. ej., tTA, expresado bajo el control de este promotor, será capaz de conducir la expresión de un constructo efector sensible a la tTA. Se prefiere que este no sea un promotor considerablemente activo en las células madre de la línea germinal, ya que dichos genes (p. ej., *vasa*) se expresan en fases inmaduras; esto tenderá a derivar en la expresión del efector (en condiciones inducidas o desreprimidas) para que se expresen muy temprano en el desarrollo, posiblemente resultando en daños o pérdida en la línea germinal, y, por tanto, en la producción de pocos gametos, o ninguno. Si el sistema de expresión se indujo (o desreprimió) más tarde en el desarrollo, el transcurso de la espermatogénesis, esto es, el tiempo comprendido entre la división de la célula madre y la producción de esperma maduro (varios días en *Drosophila*), derivaría en una respuesta lenta (p. ej., esterilidad) a la inducción (o desrepresión); este efecto se agrava por la capacidad de los machos para almacenar esperma.

[0163] Por consiguiente, se prefiere utilizar elementos promotores de genes expresados en espermatogonias o espermatocitos primarios. Como se ha descrito anteriormente, muchos genes expresados en espermatocitos primarios están implicados en funciones posteriores y se traducen tras la meiosis, por lo que se prefieren genes (y promotores de genes) con funciones premeióticas. Un tipo de genes particularmente preferido son aquellos que codifican factores de transcripción, o componentes de complejos transcripcionales, que están implicados en la expresión de genes de espermatogénesis, p. ej., genes que actúan más tarde. Un motivo fundamental para preferir tales genes es que, casi por definición, se expresan (en el nivel de proteína) lo suficientemente pronto en la espermatogénesis como para ser capaz de conducir la expresión premeiótica de otros genes (por supuesto, también se prefieren elementos reguladores negativos de dichos complejos, el tiempo de expresión es lo importante, más que la función específica de la proteína traducida).

[0164] Se conocen varios tipos de dichos genes. No obstante, como se describe más adelante, no todos son adecuados y algunos son preferibles a otros. Los tipos incluyen el tipo *can* de genes de detención meiótica. Este tipo comprende *can*, *mia*, *sa*, *nht* y *rye*; estos codifican parálogos específicos de los testículos de factores asociados a la proteína de unión a TATA (TAF) ampliamente expresados (Hiller *et al.*, 2004). Otro tipo es el tipo *aly-* de genes de detención meiótica. Estos incluyen *aly*, *comr*, *achi/vis*, *topi* y *tomb*, que codifican componentes de un complejo de proteínas de unión al ADN específicas de la secuencia y factores asociados parálogos a un complejo regulador transcripcional ampliamente expresado conocido como dREAM o Myb-MuvB (Beall *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2007; Jiang y White-Cooper, 2003; White-Cooper *et al.*, 2000). La mayoría de estos genes parecen haber surgido por duplicación de genes «somáticos» conservados, p. ej., componentes ancestrales de TAF o Myb-MuvB que funcionaron tanto en la línea somática como en la línea germinal, seguidos por la

especialización de estas versiones hasta la expresión específica de la línea germinal o de la línea germinal masculina y su función. Varias de estas duplicaciones parecen haber tenido lugar de forma relativamente reciente en la evolución, lo cual quiere decir que los parálogos específicos de la línea germinal existen en un rango filogenético/taxonómico variable, y en algunos casos bastante estrecho. Es preferible utilizar el/los promotor(es) de gen(es) conservado(s) de *Drosophila* a utilizar las especies de interés, y se prefieren particularmente promotores de genes conservados a través de un amplio rango filogenético/taxonómico; esta conservación provoca tanto que la identificación de homólogos se realice más fácilmente, como que el gen específico sea por lo general más útil.

[0165] Dichos genes (conservados que actúan temprano) se pueden identificar de una de estas dos maneras:

1. Por homología con genes, p. ej. de *Drosophila*, que se sabe que presentan patrones y niveles de expresión adecuados.

[0166] Esto se logra mediante búsquedas de homología en bases de datos de secuencias. No obstante, algunos genes de espermatogénesis evolucionan rápidamente, y los homólogos específicos pueden no ser fácilmente identificables en un amplio rango filogenético. Por ejemplo, *bag-of-marbles* (*bam*) cumple con los criterios expuestos anteriormente de expresión temprana: *bam* se expresa en espermatogonias (y también en la ovogénesis) y en la función temprana (está implicado en la regulación del número de divisiones mitóticas de espermatogonias (Gonczy *et al.*, 1997; Kawase *et al.*, 2004)). Además, se ha utilizado con éxito un fragmento del promotor *bam* en un sistema de expresión bipartito (GAL4/UAS) en la espermatogénesis (y también en la ovogénesis) en *Drosophila* (Jiang *et al.*, 2007). No obstante, *bam* es únicamente reconocible en drosófilidos. Otro gen con un patrón de expresión similar, cuyo producto génico se cree que interactúa con el de *bam*, es *benign gonial cell neoplasm* (*bgcn*). Desafortunadamente, este gen tampoco está bien conservado en insectos; ambos genes muestran signos de selección positiva y rápida evolución (Bauer DuMont *et al.*, 2007).

[0167] También surgen dificultades con varios miembros de los genes de detención meiótica del tipo *can* y del tipo *aly*. Muchos de ellos parecen derivar de una duplicación de un gen ancestral presumiblemente utilizado tanto en células somáticas como en células de la línea germinal. Las versiones de la línea germinal tienden a evolucionar rápidamente, de forma que el parálogo somático se puede identificar más fácilmente que el parálogo de la línea germinal. Además, la serie de duplicaciones que derivan en estos pares de genes somáticos/de la línea germinal en *Drosophila* parecen ser posteriores a la divergencia de Diptera respecto a otros órdenes de insectos, por lo que los parálogos específicos de la línea germinal de la mayoría de estos genes no existen más allá de Diptera, y varios de ellos sólo existen en dípteros superiores.

[0168] Sin embargo, hay excepciones; estas son fácilmente identificables mediante comparaciones de secuencias con insectos de otros órdenes (p. ej., *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori* - la lista de insectos para los cuales se ha secuenciado una parte significativa del genoma aumenta rápidamente y es fácilmente accesible por un experto en la materia). Un ejemplo de dicho gen es *matotopetli* (*topi*), un gen de tipo *aly* que codifica una proteína putativa de unión al ADN específica de secuencia que se identifica en un sistema de doble híbrido como unida a otra proteína de tipo *aly* (Comr) y, por lo tanto, presumiblemente es un componente de un complejo Myb-MuvB específico de los testículos. Se han identificado homólogos de *Topi* en *Drosophila* y *Anopheles gambiae* (Perezgasga *et al.*, 2004); mediante búsquedas de similitud de secuencias de bases de datos públicas de secuencias se han identificado también homólogos en varios otros órdenes de insectos, incluyendo Coleoptera (*Tribolium castaneum*, NW_001092862.1), Hymenoptera (*Apis mellifera*, NW_001253507.1). Por lo tanto, *Topi* es un ejemplo de un gen bien conservado con un patrón de expresión adecuado (basado en (i) datos cuantitativos de rtPCR en FlyAtlas y otros sitios; (ii) el patrón de expresión de desarrollo que la hibridación de ARN *in situ* ha mostrado que está presente en espermatocitos primarios, especialmente en espermatocitos primarios tempranos (Perezgasga *et al.*, 2004); (iii) la función prevista como parte de un complejo de transcripción específico de la línea germinal masculina (Beall *et al.*, 2007; Perezgasga *et al.*, 2004); (iv) la función real, mediante análisis fenotípico de mutantes, afecta a la expresión de una serie de otros genes de la espermatogénesis (Perezgasga *et al.*, 2004)).

[0169] Los genes con promotores que actúan temprano también se pueden identificar mediante:

2. Identificación de homólogos del/de los gen(es) seleccionado(s) de la especie objetivo

[0170] Los alineamientos de secuencias relevantes de especies de mayor o menor distancia filogenética con respecto a la especie de interés identificarán regiones con probabilidad de conservarse en el gen de interés en la especie objetivo. Preferiblemente, para multiplicar el gen de interés y para evitar problemas con los intrones, se utilizará ADNc de ARN extraído de machos, más preferiblemente de testículos diseccionados. A partir de un fragmento clonado de la región transcrita del gen de interés, se puede obtener un fragmento de promotor adecuado.

[0171] Un candidato para un fragmento de promotor adecuado comprende al menos 50 bases de nucleótidos de ADN genómico 5' respecto al inicio de la transcripción y, preferiblemente, el propio inicio de la transcripción y al menos 1 nucleótido de la región transcrita. Este comprenderá el fragmento de promotor y un marco de lectura abierta para el indicador. También puede contener secuencias de 5'- y 3'-UTR, ya sean del mismo gen que el fragmento promotor, o de otra región. Es probable que aquellas del mismo gen funcionen en la

espermatogénesis si el gen ha sido correctamente identificado como activo en la espermatogénesis, aunque pueden también contener señales, p. ej. para la traducción tardía, que no serían deseables para la expresión de una proteína, como tTA, que debe funcionar antes de la meiosis. Por lo tanto, las secuencias reguladoras del mismo gen que el fragmento de promotor se prefieren para los genes cuya función se sepa o se crea (p. ej., por homología) que es premeiótica (p. ej., topi), pero se prefieren secuencias reguladoras heterólogas para los genes cuya función se sepa o se crea que es meiótica o posmeiótica.

[0172] Para los fines de nuestro trabajo, se han aislado y analizado las secuencias promotoras de *C. capitata* y *A. aegypti* con diversas proteínas efectoras, los presentes Ejemplos.

Efectores proteicos para proporcionar un fenotipo de esperma tardío

[0173] «Tardío» quiere decir en el presente documento después del momento en el que se requiere la función espermática, p. ej., la transferencia a la hembra o la entrada en el óvulo. El objetivo es producir esperma que se transfiera a la hembra y que inducirá refractariedad al reapareamiento en la hembra, y tendrá un buen rendimiento en la competencia espermática si la hembra se vuelve a aparear. La competencia espermática tiene lugar, o puede tener lugar, cuando una hembra se aparee con más de un macho; en esta circunstancia, surge la cuestión de qué machos engendran qué proporción de embriones de la hembra. Es posible que los machos que no transfieran esperma tengan mal rendimiento en este caso. Debido al riesgo o posibilidad de respuestas evolutivas ante el uso de machos sin esperma, o con esperma incapaz de transferirse a una hembra, o con esperma incapaz de competir con otro esperma tras la transferencia a una hembra, es deseable para fines de control biológico modificar machos estériles que produzcan esperma, que este esperma sea capaz de transferirse a una hembra y que sea capaz de competir con otro esperma tras la transferencia a una hembra.

Letales de efecto paternal

[0174] Nuestro enfoque, que es el método que preferimos para lograr «esterilidad», es crear letales de efecto paternal, a través de los cuales se introduzca el esperma en un óvulo, pero no se forme ningún cigoto viable (capaz de convertirse en un adulto fértil). Preferiblemente, este efecto lo generan machos con una única copia del letal de efecto paternal, aunque también se contempla el uso de múltiples copias. Se prefiere particularmente la liberación de machos homocigotos en el medio ambiente para un letal condicional de efecto paternal, debido a que dicha cepa es considerablemente estable durante la cría. Los letales de efecto paternal (Pals) de la invención afectan característicamente a la totalidad o a la mayoría del esperma producido por un macho que porta al menos una copia del Pal. En concreto, el cigoto se puede ver negativamente afectado, p. ej., destruirse, esterilizarse o cambiar su desarrollo (p. ej., su(s) fenotipo(s) sexual(es)) en función del genotipo del progenitor. Esto contrasta con RIDL, donde el efecto sobre el cigoto se basa en el genotipo del embrión. Así, la progenie del apareamiento entre una hembra de tipo natural y un macho heterocigoto para un constructo de RIDL en un único locus normalmente dará ~50 % de progenie normal y ~50% que hereda el constructo de RIDL y puede verse afectado por este. Por el contrario, toda la progenie de un macho heterocigoto para un Pal puede verse afectada.

[0175] Se contemplan varios tipos de efectores basados en proteínas. Los efectores de proteínas o ARN se pueden transmitir con el esperma para afectar al óvulo o al cigoto en desarrollo. Estos pueden encontrarse en la superficie del esperma (p. ej., en el péptido sexual, SP, de *Drosophila*), o producirse y almacenarse en este. El esperma, así como las células que se encuentran en otras fases de la espermatogénesis, son notablemente resistentes a algunos tipos de proteína, por ejemplo, proteínas proapoptóticas, presumiblemente debido a que la ruta apoptótica se ha asimilado para otros objetivos en la espermatogénesis (Arama *et al.*, 2003; Cagan, 2003).

[0176] Se prefiere que el efector tenga un efecto bioquímico directo en el esperma, en lugar de simplemente utilizar el esperma como un vehículo a través del cual entrar en el óvulo (y que tenga entonces un efecto sobre este). Esto se debe a consideraciones de resistencia potencial. En un programa de tipo TIE, los machos liberados se han producido en una instalación artificial de cría, por lo que tanto ellos como su genotipo se encuentran hasta cierto punto bajo control, o al menos se pueden identificar potencialmente y eliminar variaciones más fácilmente de lo que se podría hacer en una población salvaje de la misma especie. Un efecto bioquímico que actúe en el óvulo (o en el cigoto en desarrollo) se puede alterar o atenuar potencialmente mediante cambios en ese óvulo; si estos son hereditarios, entonces existe al menos la base para la resistencia hereditaria potencial a una toxina que produzca este efecto bioquímico. Por el contrario, resulta complicado observar cómo podría compensar el genotipo materno o cigótico al menos algunos tipos de daño que ya se hayan producido en el esperma antes de introducirse en el óvulo (o antes de introducirse en la hembra). Un ejemplo de dicho daño es el daño en la información genética contenida por el esperma, otros ejemplos, aunque quizá menos seguros acerca de la capacidad del genoma materno/cigótico para compensar, incluyen la pérdida o daño en componentes esenciales de procesos tempranos, tales como la rotura de membranas de esperma o la descondensación del núcleo espermático, por ejemplo, o en la función del centrosoma.

[0177] Un tipo preferido de letales de efecto paternal son las nucleasas. Aunque el esperma aporta varias cosas al cigoto, una fundamental es la información genética. Si esta información genética está dañada hasta el punto de que algunos o (preferiblemente) sustancialmente todos los cigotos son inviables, entonces esto conforma la base para una forma adecuada de esterilidad a través de la letalidad de efecto paternal. La radiación-esterilización, según se utiliza por ejemplo en la técnica del insecto estéril convencional, es un ejemplo de

letalidad condicional de efecto paternal (en este caso, inducible por radiación); la esterilización con quimioesterilizantes, p. ej., la tiotepa, es otro. Cada uno de estos enfoques funciona dañando el ADN en el esperma, degradando así la información genética que porta hasta el punto de que muchos cigotos mueren (Robinson, 2005). Los quimioesterilizantes como tiotepa y bisazir, por ejemplo, pueden dejar residuos tóxicos y, por lo general, se consideran inaceptables para su uso generalizado.

[0178] La expresión apropiada de una nucleasa adecuada en el esperma, o durante la espermatogénesis, tendrá el efecto de dañar la información genética del gameto, o del gameto resultante, sin dañar asimismo la información genética de células somáticas del macho. Esto reducirá el grado de incapacitación del macho asociada al proceso de esterilización. En cambio, el uso de radiación o quimioesterilizantes expone normalmente a todas las células, aproximadamente por igual, al agente esterilizante.

[0179] Una nucleasa adecuada es una que corta ADN, generando preferiblemente roturas de la doble cadena. Las enzimas modificadoras de ADN que afectan al almacenamiento o a la interpretación de información genética, o que derivan en el corte indirecto o modificación del ADN, p. ej., mediante la maquinaria de reparación del ADN celular, también se clasifican en el presente documento como nucleasas; como se comprenderá, las referencias a «cortar» el ADN, por ejemplo, incluyen por lo tanto «modificar» el ADN, según sea conveniente.

[0180] La expresión adecuada es expresión condicional, de tal forma que en condiciones restrictivas (para la fecundación, obviamente estas son condiciones propicias para la expresión de la nucleasa) al menos un 30 %, preferiblemente de más de un 50 % y lo más preferiblemente de >90 % del esperma de un macho con al menos una copia del sistema letal de efecto paternal que comprende nucleasas (un «macho PAL») es incapaz de fecundar un óvulo para formar un cigoto viable capaz de sobrevivir para dar lugar a un adulto fértil en condiciones de cría normales, p. ej., según se encuentra en la naturaleza, o en condiciones de laboratorio que se aproximan a las que se encuentran en la naturaleza. Por el contrario, en condiciones propicias (para la fecundación), machos PAL equivalentes deberían dar lugar a cigotos significativamente más viables que en condiciones restrictivas; preferiblemente, al menos un 50 % de los cigotos deberían sobrevivir.

[0181] Preferiblemente, la expresión de la nucleasa en machos se limita considerablemente a la línea germinal. Aunque esto puede significar que la expresión se limita considerablemente a la línea germinal masculina, esto no es fundamental. Para algunas aplicaciones, la eliminación de hembras es deseable (p. ej., sexado genético en TIE (Alphey, 2007; Franz, 2005)). En las circunstancias en las que las hembras se vayan a eliminar de todas formas, la expresión de la nucleasa en hembras puede no ser indeseable. De hecho, puede ser deseable, si se utiliza para eliminar hembras, o para ayudar en la eliminación de estas. Este sería un ejemplo de «uso dual» potencial: utilizar la nucleasa tanto como un PAL como como un letal dominante (cigótico) para destruir algunas o todas las hembras. Se conocen muchas nucleasas. Los tipos relevantes incluyen endonucleasas de restricción, nucleasas con dedos de zinc y nucleasas efectoras del tipo activadores de la transcripción (TALE) (Hockemeyer *et al.*, 2011; Mahfouz *et al.*, 2011; Miller *et al.*, 2011) y endonucleasas *homing*. Distintos tipos y distintos miembros dentro de un mismo tipo muestran niveles diferentes de especificidad de secuencias en el sitio en el que cortan o cerca de este. En principio, una enzima con un elevado grado de especificidad de secuencias cortarían en un número relativamente reducido de sitios por genoma, quizás únicamente en uno. Esto no es preferible, ya que permite la posibilidad de resistencia por mutación o variación del sitio objetivo. Cuando una secuencia específica se repite muchas veces, de forma que existen múltiples sitios en el genoma a pesar de que exista un grado relativamente alto de especificidad para una secuencia de reconocimiento relativamente larga, esto es más aceptable. No obstante, se prefiere que la nucleasa presente múltiples sitios objetivo por genoma. Esto implica reconocer una secuencia relativamente larga que, sin embargo, está presente en múltiples copias en el genoma, o una secuencia de reconocimiento relativamente corta, o un grado significativo de redundancia dentro de la secuencia objetivo, de especificidad incompleta para la secuencia objetivo nominal, o, de hecho, una nucleasa con poca o ninguna especificidad de secuencia. I-Ppol es de este tipo, presentando una larga secuencia de reconocimiento, pero está en una sección altamente conservada de ADNr, que está presente en múltiples copias por genoma. I-Ppol se examina más detenidamente en otra parte.

[0182] Se han descrito nucleasas con dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés), donde cada dedo de zinc proporciona unión específica de secuencia a una secuencia de nucleótidos corta, p. ej., de 3 nucleótidos. Por consiguiente, se puede proporcionar una afinidad más elevada y una mayor especificidad de secuencias combinando varios de dichos dedos de zinc en una única proteína. Si se combina con una nucleasa, p. ej., el dominio de nucleasa de la endonucleasa de restricción FokI, se puede construir una nucleasa artificial específica de secuencia, con especificidad de secuencias arbitraria (Kim *et al.*, 1996). Dichas nucleasas con dedos de zinc sintéticas se han desarrollado para fines de terapia génica, por ejemplo (Urnov *et al.*, 2005). Se ha realizado un esfuerzo considerable para mejorar su especificidad, para restringir el corte a un único sitio en el genoma, por ejemplo (Miller *et al.*, 2007). En un ejemplo en *Drosophila*, las nucleasas con dedos de zinc se han producido de forma que, al expresarse en moscas transgénicas, dañan específicamente el locus objetivo, p. ej. los locus *yellow* y posteriormente también los locus *rosy* y *bw* (Beumer *et al.*, 2006; Bibikova *et al.*, 2002). Se observó un efecto secundario no deseado, que era que el alto nivel de expresión de algunas de las ZFN utilizadas era tóxico. Se mostró además que esta toxicidad dependía de la nucleasa, y no de la actividad de unión al ADN, de las ZFN tóxicas (Beumer *et al.*, 2006). Aunque no resulta deseable para el reconocimiento génico, esta especificidad más amplia resulta interesante para nuestro propósito de generar daños en varios o muchos sitios.

[0183] Por lo general, no se prefiere el uso de endonucleasas *homing* (HEG), ya que tienden a reconocer secuencias de nucleótidos relativamente largas (15-40 pb, aunque a menudo aceptan algunos desajustes con respecto a la secuencia objetivo nominal) que, por lo tanto, tienen lugar inusualmente, si llegan a tener lugar, en cualquier genoma de insecto determinado. El número mínimo de sitios de reconocimiento/corte aceptables es de uno por genoma diploide; se prefiere uno por genoma haploide y se prefiere en concreto el reconocimiento/corte de múltiples sitios por genoma haploide. Un ejemplo de una HEG que probablemente sea inapropiada es I-SceI. Inicialmente aislada a partir de mitocondrias de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), I-SceI se ha utilizado en *Drosophila* como parte de un sistema que permite o fomenta la recombinación de homólogos objetivos (Gong y Golic, 2003; Rong y Golic, 2000; 2001; Rong *et al.*, 2002). Una característica interesante de I-SceI para ese sistema de recombinación homólogo fue precisamente que I-SceI *no* corta fácilmente cualquier secuencia endógena en el genoma de *Drosophila melanogaster* y, por consiguiente, tenderá a cortar específicamente en sitios modificados insertados en transgenes. A pesar de que, por casualidad, algunos otros genomas de insecto pueden presentar uno o más sitios reconocidos por I-SceI, por lo general no se prefiere esta enzima para su uso en la presente invención. Un ejemplo de una endonucleasa *homing* que corta múltiples sitios por genoma es Ppol. Aunque esta presenta un sitio de reconocimiento bastante específico y largo, corresponde a una secuencia altamente conservada en un gen de ADNr. Debido a que en todos los genomas eucariotas se encuentran múltiples copias de este ADNr, hay disponibles múltiples sitios objetivo. Existen mecanismos potenciales, como la conversión génica, a través de los cuales se podría propagar una mutación «resistente», esto es, resistente a cortes mediados por Ppol, de dicho gen a través de las secuencias de ADNr, aunque existen copias suficientes de esta secuencia como para que el riesgo de que haya genomas resistentes, en los que la totalidad o la práctica totalidad de estos sitios se haya vuelto resistente, parezca bastante bajo. Se ha demostrado que tanto I-SceI como Ppol funcionan en células en cultivo de tejido de mosquito (*Anopheles gambiae*) (Windbichler *et al.*, 2007); como se podría esperar, la expresión de Ppol era perjudicial para las células, dando como resultado la detención de la proliferación celular, mientras que I-SceI era relativamente inocua. Las endonucleasas *homing* son un tipo de elemento de ADN egoísta que se puede propagar a través de poblaciones de los hongos en los que han sido identificadas.

[0184] No se conoce ninguna endonucleasa *homing* en animales, pero se ha propuesto que sus propiedades inusuales (cortar un cromosoma homólogo que no soporta HEG y que se copia en él mediante la maquinaria de reparación de ADN de la célula (Burt y Trivers, 2006)) se podrían utilizar para construir un sistema de «genética dirigida» (Burt, 2003); se ha conseguido una prueba de concepto utilizando I-SceI y un sitio objetivo artificial (Windbichler *et al.*, 2011). Un sistema de genética dirigida es un sistema para propagar genes a través de una población objetivo, p. ej., salvaje, donde el gen que se va a propagar no confiere una simple ventaja selectiva (p. ej., Alpey *et al.*, 2002).

[0185] Además del uso «convencional» de las HEG como sistemas de genética dirigida, que es similar a su mecanismo de propagación natural e implica copiar la HEG en ADN cortado, también se ha propuesto que una HEG ubicada en el cromosoma Y que corte específicamente el cromosoma X podría dar como resultado machos cuyos únicos gametos viables sean portadores de Y (Deredec *et al.*, 2008).

[0186] Normalmente, las HEG reconocen un sitio objetivo de 15-40 pb. Las ZFN reconocen aproximadamente 3 pb por cada dedo de zinc. En la configuración típica, las ZFN se necesitan dimerizar para cortar ADN; esto significa una secuencia de reconocimiento efectiva de 18 pb. Una secuencia específica de 18 nt tendrá lugar normalmente una vez en 4^{18} nucleótidos, lo cual es aproximadamente 7×10^{10} nucleótidos o 7000 Mb. A título comparativo, los genomas de insecto normalmente son de unos cientos de Mpb, y el genoma humano es de aproximadamente 3000 Mpb, por lo que dichas secuencias tendrán lugar normalmente 0-1 veces por genoma. Naturalmente, se trata de un cálculo simplificado, y pasa por alto los efectos del contenido GC, el ADN repetitivo, etc., pero todavía se mantiene la cuestión general, que la especificidad de dichas secuencias de reconocimiento largas es deseable para los fines que necesitan especificidad, como la terapia génica y el reconocimiento génico, aunque por lo general se prefieren moléculas con una secuencia de reconocimiento más corta para el propósito de cortar el genoma dos o más veces.

[0187] Uno de tales tipos de enzimas son las endonucleasas de restricción. Normalmente, estas presentan sitios de reconocimiento de 4-10 pb, que normalmente cortarán un genoma eucariota muchas veces (4^{10} es aproximadamente 1×10^6). Algunas endonucleasas de restricción son sensibles al estado de metilación del ADN del sustrato; se prefieren enzimas que no sean sensibles a la metilación, o que corten ADN modificado de una forma característica del genoma objetivo. Por ejemplo, el ADN genómico de *Drosophila melanogaster* es considerablemente no metilado, por lo que no se prefiere una enzima como DpnI, que únicamente corta ADN adenometilado. Por el contrario, para cortar la misma secuencia (GATC), se preferirían enzimas alternativas como DpnII, MboI o Sau3AI. Se prefiere particularmente FokI, que no es sensible a la metilación y en la que se sabe que el dominio de nucleasa funciona en diversos tipos de células, así como *in vitro*.

[0188] La nucleasa no necesita presentar ninguna especificidad de secuencia considerable. Otro tipo de nucleasa preferido es uno en el que un dominio de nucleasa, por ejemplo, de FokI, se combina con un dominio de unión al ADN, presentando dicho dominio de unión al ADN poca o ninguna especificidad de secuencia (aunque es aceptable una preferencia general por algunos tipos de ADN, por ejemplo, regiones o secuencias ricas en GC o AT, respecto a otros). Entre los ejemplos que se prefieren particularmente de este tipo de efector

están las fusiones de protamina-nucleasa e histona-nucleasa. Algunas de las ventajas de las fusiones de protamina-nucleasa se han descrito anteriormente. Se contemplan dos tipos de dominio de nucleasa. En primer lugar, uno que requiere unirse a al menos una otra proteína («dimerizarse»; como se comprenderá, se incluye en este término una necesidad de formar complejos más grandes, p. ej. trímeros, tetrámeros, etc.), ya sea consigo misma (homodímero) o con al menos una proteína distinta (heterodímero) para cortar el ADN; en segundo lugar, uno que no necesita dimerizarse.

[0189] La diferencia fundamental entre estos dos tipos se encuentra en sus relaciones de concentración/función. En general, una enzima que no necesite dimerizarse funcionará en proporción a su concentración. Por consiguiente, con concentraciones muy bajas se producirá algún daño o modificación en el ADN; con concentraciones más altas, se producirán más. Esto resulta ventajoso cuando el sistema de expresión condicional produce cantidades relativamente bajas de efector. Durante el transcurso de la espermatogénesis, es probable que se proporcione al efector al menos algunas horas para que actúe, y posiblemente bastante más tiempo. Por el contrario, una enzima que no necesite dimerizarse presentará normalmente una función de respuesta a la dosis no lineal. En el caso concreto de una enzima que se puede unir en varios sitios en el genoma, es poco probable que, con una baja concentración, dos moléculas de enzima se encuentren de tal forma que sean capaces de cortar. En concentraciones más altas, es mucho más que proporcionalmente probable (normalmente, aumenta según el cuadrado de la concentración en el caso de los homodímeros, el cubo en el caso de homotrímeros, etc.). Esto puede resultar ventajoso, por ejemplo, cuando el sistema de expresión condicional es de alguna forma parcialmente funcional, produciendo un nivel de efector bajo y distinto de cero en al menos algunas células distintas de las células previstas (p. ej., en otro lugar que no sea la línea germinal masculina o, como otro ejemplo, que no sea en las células de la línea germinal masculina donde la expresión prevista es en las espermatogonias o únicamente en etapas posteriores de la espermatogénesis). Por tanto, esta baja expresión «basal» debería ser relativamente inocua, o al menos mostrar una diferencia más que lineal en su actividad en la célula no objetivo en relación con su actividad en la(s) célula(s) objetivo.

[0190] Otro tipo relevante de actividad parcialmente funcional está relacionada con la condicionalidad del sistema de expresión condicional; es poco probable que la supuesta condición de «off» proporcione de hecho una expresión de cero y, por lo tanto, es deseable un sistema adicional, como este, que exagere la diferencia fenotípica entre los estados de «on» y «off». Se ha de tener en cuenta que estos argumentos y beneficios potenciales se aplican a otros tipos de efector. Dentro de los efectores de nucleasa, se aplican a las nucleasas con dedos de zinc, así como a las protamina-nucleasas, etc. En concreto, el dominio de nucleasa de FokI necesita dimerizarse para cortar ADN. Normalmente, esto se lleva a cabo mediante homodimerización. Sin embargo, se conocen variantes que alteran este hecho. Los dos dominios de nucleasa se pueden incluir en la misma proteína, conectados mediante un conector adecuado, por lo que no se necesita dimerización (es decir, es suficiente con la dimerización intramolecular, en lugar de la intermolecular). Además, se conocen mutantes de FokI en los que se necesita la heterodimerización (Miller *et al.*, 2007). Cabe destacar que no se necesita que cada uno de los dos dominios de dimerización presenten actividad nucleasa. Esto posibilita otro método para lograr una mayor especificidad. Las dos (o más) proteínas que necesitan heterodimerizarse se pueden expresar bajo un control por separado (p. ej., control transcripcional, pero también control traduccional o de degradación, por ejemplo). Únicamente las células que expresen ambos dominios presentarán una actividad significativa. Por consiguiente, la expresión parcialmente funcional de una proteína en una célula que no experimenta también una expresión parcialmente funcional de la otra proteína presentará poco o ningún efecto adverso.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: *Promotores específicos de la línea germinal*

[0191] Con el fin de analizar la idoneidad de una región promotora aislada, se puede utilizar una proteína fluorescente como indicador, y en concreto una fusión entre un activador transcripcional de respuesta a la tetraciclina (tTA) y una proteína fluorescente. Esto permite tanto una visualización directa de la expresión proteica, como un análisis posterior acerca de la idoneidad del momento y del nivel de expresión dirigidos por el fragmento del promotor candidato adecuado para el fin específico de utilizarlo como parte de un sistema de expresión bipartito condicional que sea funcional en la espermatogénesis. La expresión del indicador a partir de dichas inserciones representa la actividad del fragmento del promotor candidato adecuado. La evaluación de varias de tales líneas de inserción permite determinar la posible idoneidad del fragmento de promotor. Se deberían examinar varias líneas de inserción a causa del «efecto de posición»; un conocido fenómeno a través del cual la expresión de un gen insertado se ve influida por el contexto de la cromatina en el que se inserta (Wilson *et al.*, 1990).

[0192] La capacidad real del fragmento del promotor candidato adecuado para funcionar como parte de un sistema de expresión condicional en la línea germinal masculina se puede analizar según se ha expuesto anteriormente, pero incluyendo un sistema de expresión adecuado, o un componente relevante de este, p. ej., que codifique tTA o una secuencia relacionada. El uso de una fusión de tTA-proteína fluorescente (tTA-FP) en el análisis del indicador expuesto anteriormente permite que se utilice la misma línea de inserción, o conjunto de líneas de inserción, en ambos análisis. El cruce con una línea apropiada, p. ej., tRE-X, donde X puede ser un efector o un indicador, en condiciones propicias para la expresión a partir del sistema de expresión, permitirá

determinar si el sistema de expresión (promotor-tTA, tRE-X) es funcional en la espermatogénesis y, p. ej., mediante microscopía de fluorescencia en testículos diseccionados, saber dónde, cuándo y cuánto se expresa X y/o tTA-FP. Mediante experimentos similares en condiciones represivas para la expresión se permitirá determinar si el sistema de expresión es condicional.

5 **[0193]** Si los estudios de expresión indican que el fragmento del promotor candidato adecuado *no* es en efecto adecuado, se puede tomar un fragmento de promotor distinto del mismo gen. Dicho fragmento revisado es normalmente más largo, ya que el fragmento original puede haber omitido algunos elementos reguladores importantes, aunque, en caso de que la expresión sea específica pero demasiado tardía en el desarrollo, p. ej., tras la meiosis, incluso aunque el gen del que derive el fragmento de promotor se crea que se transcribe lo suficientemente temprano (p. ej., basándose en los datos de ARN *in situ*), puede ser deseable suprimir algunos elementos, especialmente elementos de UTR, para eliminar las señales para el retraso traduccional. También puede resultar deseable analizar fragmentos más largos y más cortos con el fin de identificar regiones del promotor necesarias para los niveles de expresión génica y la especificidad temporal y de tejido, o regiones que influyan en estas; este enfoque ha sido ampliamente utilizado para analizar promotores, y se puede lograr simplemente mediante iteraciones del proceso expuesto anteriormente con variantes del fragmento del promotor candidato original.

10 **[0194]** Experimentos de hibridación de ARN *in situ* demostraron que la transcripción de $\beta 2$ -*tubulin* de la mosca mediterránea de la fruta se lleva a cabo en una etapa entre temprana y tardía de la espermatogénesis de la mosca mediterránea de la fruta. Se presupone que el transcrito de $\beta 2$ -*tubulin* de la mosca mediterránea de la fruta comienza en una fase similar a *Dm* $\beta 2$ -*tubulin*, que es antes de la meiosis y se sintetiza desde la etapa de tercera fase larvaria tardía, antes de que tenga lugar una meiosis significativa en los testículos en desarrollo. Se han desarrollado sistemas de marcado de esperma que utilizan este promotor génico para los mosquitos *Anopheles stephensi* (Catteruccia, Benton *et al.*, 2005) y *Ae. aegypti* (Smith, Walter *et al.*, 2007), para la mosca mediterránea de la fruta (Scolari, Schetelig *et al.*, 2008) durante el período de esta investigación acerca de la letalidad de esperma y posteriormente en la mosca de la fruta del Caribe, *Anastrepha suspensa* (Zimowska, Nirmala *et al.*, 2009). Conforme a esto, se ha ampliado el promotor de $\beta 2$ -*tubulin* del genoma de la mosca mediterránea de la fruta utilizando los siguientes cebadores:

Hacia delante: CTCCCGTGCGATATCCTAGGCCCCCATGTTACAAGGCTG (SEQ ID N.º: 53)

Hacia atrás: AGCCATTTTGGTTAATTGAAATCCCTAAAATAAATGTAATTCATTTTTCG (SEQ ID N.º: 54).

30 **[0195]** El constructo OX3671 (Figura 16) contiene el promotor de $\beta 2$ -*tubulin* de la mosca mediterránea de la fruta (el fragmento de promotor de 1556 pb se amplió a partir del ADN genómico de la mosca mediterránea de la fruta) fusionado con la secuencia DsRed2. Se omitió la mayor parte de la secuencia de 3'-UTR de *Cc* $\beta 2$ -*tubulin* y se sustituyó por una 3'-UTR utilizada normalmente, de SV40, y que se sabe que se expresa en varias especies. La expresión del transgén debería dar como resultado fluorescencia roja en el esperma con un filtro de excitación adecuado. La expresión de DsRed2 fue claramente visible en el abdomen de machos transgénicos en la totalidad de las tres líneas obtenidas, con dos zonas con una fluorescencia más intensa, aparentemente los testículos (datos no mostrados).

35 **[0196]** Para evaluar además si el marcador de DsRed2 se expresa en el esperma, se diseccionaron testículos de machos transformados sexualmente maduros. Los resultados muestran que el esperma maduro presenta una firme expresión de DsRed2 en comparación con el esperma de un macho de tipo natural. En el alineamiento con el patrón de expresión de $\beta 2$ -*tubulin*, los espermatoцитos tempranos no presentan fluorescencia, que empieza a ser claramente visible en las fases de espermátida de la espermatogénesis.

40 **[0197]** Con el fin de analizar si se podrían obtener patrones similares de expresión de fluorescencia utilizando el «sistema tet-off» bipartito, se crearon dos constructos de indicador fluorescentes; OX3866 (Figura 14) (*tetO*-mini promotor-DsRed2-mls) y OX3867 (Figura 15) (*tetO*-mini promotor-protamina fusionado con DsRed2). El elemento de promotor mínimo de *tetO* se conoce como tRE, y es preferible. En OX3866 (Figura 14), el indicador DsRed2 se fusiona con una señal de localización de membrana (mls), que se prevé que dé como resultado que cualquier proteína fluorescente expresada se una o asocie a la membrana tras la expresión, mientras que en OX3867 (Figura 15) el DsRed2 se fusiona con una protamina de *Drosophila*. Ambos genes indicadores se analizaron con promotores que conducían la expresión de tTAV en células somáticas y se descubrió que eran funcionales.

45 **[0198]** Tras el hallazgo de que el promotor de $\beta 2$ -*tubulin* conduce la expresión de DsRed2 en el esperma, si bien se realizó demasiado tarde para nuestros objetivos, se diseñó el constructo OX3831 (Figura 20) y se modificó respecto a OX3671 (Figura 16), conduciendo el promotor de $\beta 2$ -*tubulin* de la mosca mediterránea de la fruta el gen de fusión tTAV-fluorescencia. En este constructo, la región 5'-UTR de *aly* en *Drosophila* reemplazó a la del promotor de $\beta 2$ -*tubulin* suponiendo que la proteína tTAV se expresaría entonces más temprano durante la espermatogénesis. Debido a que la secuencia de TurboGFP se fusionó con la de tTAV, el esperma de machos transgénicos OX3831 (Figura 20) debería presentar fluorescencia verde con el filtro de excitación apropiado. Para analizarlo, se diseccionaron machos adultos de siete líneas transgénicas y se observaron con un microscopio de fluorescencia. Aunque la expresión de fluorescencia no era fácilmente visible en los testículos de machos no diseccionados, en los testículos diseccionados de machos adultos OX3831 (Figura 20), la expresión

de fluorescencia era visible en los haces de espermátidas. Algunas líneas expresaron una fluorescencia más intensa que otras, pero todas las espermátidas en las cepas de OX3831 (Figura 20) mostraron fluorescencia en la expresión del marcador de esperma específico de los testículos.

5 **[0199]** Se cruzaron moscas OX3831 heterocigotas con moscas OX3866 y OX3867 heterocigotas (Figuras 14 y 15 respectivamente) (cepas de *tetO-DsRed2*). Se diseccionó una progenie de más de 20 machos adultos que habían sido alimentados con comida sin tetraciclina (esto es, en condiciones propicias para la expresión de *tetO-DsRed2*) en diferentes cruces y en distintos momentos, y se observó con un microscopio de fluorescencia de gran aumento. Únicamente un macho mostraba una fuerte expresión de *DsRed2*, que era visible en varios haces de espermátidas. En otros machos, no se detectó expresión de *DsRed2* en ningún haz de espermátida. Un posible motivo para que únicamente un macho muestre una fuerte expresión de *DsRed2* es la transcripción y traducción tardías de fluorescencia de *tTAV*, conducida por el promotor de *Ccβ2-tubulin*. Esta expresión tardía puede significar que no existe suficiente tiempo para que *tTAV* se una a la secuencia de *tetO* e induzca además los suficientes transcritos de *DsRed2* antes de la meiosis. Conforme a estos resultados, solo por casualidad, algunos de los espermátocitos en algunos machos presentan los suficientes transcritos de *DsRed2* acumulados antes de la meiosis, y la fluorescencia de *DsRed2* se puede detectar en haces de espermátidas. El análisis por PCR de transcriptasa inversa en testículos y cadáveres aislados de machos OX3831 (Figura 20), utilizando cebadores específicos de *tTAV*, mostró la especificidad de testículos del promotor de *Ccβ2-tubulin* de *aly* de 5'-UTR.

20 **[0200]** En esta etapa, era evidente que se requería una expresión de *tTAV* todavía más temprana con el fin de permitir una expresión adecuada del gen indicador en la línea germinal masculina. Por este motivo, se desarrolló y se analizó el constructo OX4282 que contenía la 5'-UTR del gen *Hsp83*. *Hsp83* se expresa intensamente tanto en las células de la línea germinal como en las células somáticas de la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata*, y no se considera que contenga ninguna señal de retraso de la traducción. En el constructo OX4282, el gen indicador, TurboGFP, no se fusionó con la secuencia de *tTAV*, pero se situó adyacente a la secuencia de *tetO*. Asimismo, los componentes *tetO*-indicador y promotor-*tTAV* se combinaron en un único plásmido en un intento por analizar la 5'-UTR de *Hsp83* de una manera más inmediata. *tTAV* se debería expresar en la línea germinal masculina de individuos transformados, y, en ausencia de tetraciclina, mediante la unión a *tetO* se debería inducir la expresión del gen marcador de TurboGFP adyacente. Dicho de otro modo, los testículos de los machos de esas cepas que porten este constructo deberían presentar expresión de TurboGFP cuando se crían sin tetraciclina, y la expresión se debería reprimir con tetraciclina. La disección de los testículos de machos adultos criados en ausencia de tetraciclina reveló la presencia de una intensa fluorescencia verde (turboGFP) en tres de las 6 líneas analizadas.

35 **[0201]** El hecho de que no se observara expresión de TurboGFP en las otras líneas se debe probablemente a los efectos de posición de la inserción del transgén. En las líneas que presentan fluorescencia de TurboGFP sin tetraciclina, la expresión se vio totalmente reprimida por la tetraciclina (datos no mostrados).

[0202] Se cruzaron machos OX4282 con hembras OX3867 (*tetO*-protamina-*DsRed2*) (Figura 15) en cada jaula con el fin de examinar posteriormente la capacidad del promotor para conducir una expresión adecuada del gen indicador; en este caso, utilizando *DsRed2* el sistema condicional bipartito «*tet-off*».

40 **[0203]** La expresión de TurboGFP se puede detectar en distintas etapas de la espermatogénesis (tanto en las espermátidas alargadas como en los espermátocitos, aunque únicamente se detectó fluorescencia roja en las espermátidas alargadas, y no en los espermátocitos tempranos) (Figura 3). Se detectó expresión de TurboGFP tanto en la cabeza de los espermatozoides (donde se ubica el núcleo) como en la cola de las espermátidas.

45 **[0204]** Los resultados expuestos anteriormente indican que existe un ligero retraso en la expresión del gen indicador (*DsRed2* en este experimento) en comparación con la expresión de *tTAV*; debido a que esto se calcula mediante la cantidad de fluorescencia verde observada. Teniendo en cuenta que la fluorescencia roja era evidente en etapas más tardías de la espermatogénesis (espermátidas alargadas), es probable que el indicador se transcriba antes de la meiosis, pero se traduzca tras la meiosis.

50 **[0205]** *Dmtopi* es un gen específico de los testículos que codifica una proteína con dedo de zinc específica de los testículos que interactúa físicamente con *Comr* (Perezgasga, Jiang *et al.*, 2004). *Dmtopi* no se necesita para la localización nuclear de *Aly* o de *Comr*, pero se necesita para su acumulación en la cromatina. En *Drosophila*, aunque la totalidad de los genes que dependen de *aly* o de *comr* para su expresión dependen también de *achi/vis* y/o de *topi*, hay unos pocos genes cuya transcripción depende de *achi/vis* y de *topi*, pero no de *aly* ni de *comr* (Perezgasga, Jiang *et al.*, 2004). Quizá sea más significativo el hecho de que muchos de los genes de tipo *aly* parecen haber surgido a partir de duplicaciones genéticas. Tras la duplicación, uno del par ha asumido una función somática y el otro una función de la línea germinal. Esto presenta dos limitaciones con respecto al uso de estos genes como fuente de promotores de la línea germinal masculina en una amplia gama de insectos.

60 **[0206]** En primer lugar, los dos genes pueden ser bastante similares, provocando que sea relativamente difícil identificar la versión específica de la línea germinal. En segundo lugar, y lo que es mucho más significativo, muchas de estas duplicaciones parecen ser bastante recientes. Por lo tanto, la mayoría de los insectos pueden presentar la versión ancestral, que se trata de un único gen que lleva a cabo tanto funciones de la línea germinal

como funciones somáticas, y por ende ningún gen de la línea germinal ni promotor independiente. A este respecto, *topi* es poco habitual debido a que no presenta una alternativa somática evidente, y también parece más antiguo que la mayoría de duplicaciones del tipo aly. Por consiguiente, es probable proporcionar un promotor potencial específico de la línea germinal en una gama mucho más amplia de insectos que los otros genes de tipo aly. Se advierte en este sentido que la conservación de la secuencia de *topi* es evidente, pero la conservación funcional, y en concreto el patrón de expresión, de *topi* en otros insectos se desconocen por lo general. No obstante, esta cautela se aplica también a otros genes de la línea germinal masculina. Debido a estas diversas razones, se eligió a *topi* para posteriores investigaciones como origen de un promotor de la línea germinal masculina.

[0207] Antes de desarrollar constructos basados en *topi* en la mosca mediterránea de la fruta, la conservación del patrón de expresión de *topi* se probó primero en el mosquito *Ae. Aegypti*; la disponibilidad de la secuencia del genoma significó que el homólogo de *topi* y el fragmento de promotor putativo se podrían aislar rápidamente. Los resultados de RISH (hibridación de ARN *in situ*) mostraron que la transcripción del gen *topi* en *Ae. Aegypti* (*Aetopi*) comienza desde la etapa de espermatozoides primario; un perfil de expresión similar al de *Dmtopi* en los testículos de *Drosophila* (Perezgasga, Jiang *et al.*, 2004). Se desarrolló una cepa transgénica de *Ae. aegypti* (OX4286, Figura 23), con expresión de tTA conducida por una secuencia de 1233 pb, incluyendo 1168 pb de promotor de *Aetopi* y 65 pb de 5'-UTR de *Aetopi*. Tras cruzar 3 líneas de OX4286 independientes (Figura 23) con una cepa de tetO-indicador (OX3978, tetOAehsp70 mini promotor-Amcyan, Figura 24), se observó una clara expresión de Amcyan en los testículos y en las células de la espermatogénesis en la totalidad de los tres cruces criados con una dieta sin TET (datos no mostrados). La expresión era reprimible en relación con la tetraciclina.

[0208] Después de que se mostrara que el promotor *topi* en *Ae. Aegypti* inducía expresión específica en los testículos de tTAV y, en consecuencia, la expresión de un gen indicador, se analizó el patrón de expresión de *topi* en *Ceratitis capitata*. Utilizando la secuencia de nucleótidos de este gen en la mosca mediterránea de la fruta, los cebadores se diseñaron para comprobar que *Cctopi* es un gen específico de los testículos en la mosca mediterránea de la fruta. Se utilizaron diez pares de testículos diseccionados de diez machos de tipo natural para extraer ARN (para los detalles de la disección, véase la sección 2.6.4.3). Se extrajo ARN a partir de los cadáveres restantes para proporcionar controles que no fueran de los testículos. Se utilizó el análisis de transcriptasa inversa empleando los cebadores «TopitestF1» y «TopitestR» para estas PCR. Los resultados confirmaron que la expresión de *Cctopi* es específica de los testículos. RISH también ha demostrado que *Cctopi* se transcribe en los testículos de la mosca mediterránea de la fruta (datos no mostrados). Este promotor génico, por lo tanto, se eligió para su uso en nuevos constructos para desarrollar expresión específica de los testículos en cepas transgénicas.

Cebador TopitestF1: GTAACCTCCGTTCTGAGACAACA (SEQ ID N.º: 55)

Cebador TopitestR: CGATATGGAGTGGGTGAAACCTCA (SEQ ID NO: 56)

[0209] El constructo OX4275 (Figura 25) comprende un fragmento de promotor putativo (1178 pb) de *Cctopi* que conduce DsRed2 (3'-UTR de SV40). Los testículos diseccionados de machos adultos de todas las cepas obtenidas con este constructo no revelaron ningún signo de expresión de DsRed2 (datos no mostrados). Para analizar posteriormente el promotor de *Cctopi*, se desarrolló un constructo con la misma secuencia promotora que conducía la expresión de tTAV (OX4254, Figura 26). Se cruzaron moscas OX4254 heterocigotas con moscas OX3867 (tetO-DsRed2) (Figura 15) heterocigotas (cepas de tetO-DsRed2) del sexo opuesto, y la progenie masculina adulta de estos cruces se diseccionó y se evaluó su fluorescencia roja. No se detectó expresión de DsRed2 en ningún haz de espermátida en esos testículos de machos.

[0210] Debido a que la longitud corta del promotor de *Cctopi* putativo en OX4275 (Figura 25) y OX4254 (Figura 26) puede haber derivado en una carencia de función evidente, se realizó un nuevo constructo: OX4371 (Figura 27), basándose en las siguientes modificaciones. Este constructo contiene una secuencia de 1708 pb de la región codificante de *Cctopi* putativo, más de 530 pb más que en anteriores constructos incluyendo una posible secuencia de codificación de 484 pb y un intrón de 55 pb en la parte conservada de la región de codificación. Debido a que, por lo general, tTAV no actúa tras la fusión con otra proteína en su N-terminal, se utilizó una secuencia génica de ubiquitina de 228 pb (secuencia basada en la ubiquitina de *Drosophila*, pero optimizada para su expresión en una gama de insectos y sintetizada por Genart Ltd.) entre la región codificante de *Cctopi* y tTAV para separar los dos productos génicos tras la traducción a través de la escisión por la proteasa ubiquitina (Varshavsky 2005). Este constructo contiene tanto el promotor de *Cctopi* diseñado recientemente que conduce tTAV como un indicador tetO-Dmhs70 promotor mínimo-TurboGFP. Por consiguiente, la expresión de tTAV se debería detectar mediante fluorescencia en los testículos de machos criados sin tetraciclina en su dieta larvaria. Se detectó una débil expresión de TurboGFP en las células de la espermatogénesis en los testículos diseccionados de machos adultos OX4371 (Figura 27) criados sin tetraciclina en una de las dos líneas analizadas. No se detectó expresión de TurboGFP en los testículos diseccionados de ningún macho criado con tetraciclina, lo cual indica expresión reprimible.

[0211] Al mismo tiempo que se trabajó con OX4371 (Figura 27), se generaron y analizaron cepas de OX4391 (Figura 22).

[0212] OX4391 (Figura 22) se diferencia de OX4371 (Figura 27) en un aspecto: la 3'-UTR de SV40 de tTAV en OX4371 (Figura 27) se sustituyó por la 3'-UTR endógena de *Cctopi* en OX4391 (Figura 22). Conforme a lo mencionado anteriormente, las 3'-UTR pueden influir en el futuro de un ARNm concreto, por ejemplo, en su estabilidad de transcrito o en su nivel de traducción (Mazumder, Seshadri *et al.*, 2003). Considerando que la 3'-UTR ha demostrado que desempeña un papel importante en el procesamiento del ARNm, hemos formulado una hipótesis acerca de que la 3'-UTR endógena de *Cctopi* podría conferir los patrones de expresión deseados del gen a nuestro transgén tTAV. Se utilizó la PCR con transcripción inversa para ampliar la 3'-UTR de *Cctopi*. Se diseccionaron testículos de machos adultos de 2-3 días de edad criados sin tetraciclina de 6 cepas de OX4391 (Figura 22). 3 cepas mostraron una fuerte expresión de TurboGFP en las células de la línea germinal masculina. Se detectó una débil fluorescencia en las otras tres.

[0213] Para probar con más detalle la secuencia promotora de *topi* recientemente diseñada, se establecieron cruces con machos OX4391 (Figura 22) (criados con una dieta sin tetraciclina) con hembras de tipo natural y se analizó la presencia de fluorescencia en espermatecas diseccionadas. El análisis del esperma almacenado en las espermatecas con un microscopio de fluorescencia demostró, en efecto, que se podía detectar TurboGFP.

[0214] Los resultados expuestos anteriormente indican que nuestra secuencia promotora aislada de *topi* (según se ha descrito anteriormente) se expresa en la línea germinal masculina y conduce de forma adecuada la expresión de genes indicadores de tetO en los testículos. Los cruces con moscas que comprenden transgenes de tetO-nucleasa se describen más adelante.

Ejemplo 2 *Proteínas efectoras*

[0215] El objetivo del presente trabajo es producir esperma que se transfiere a la hembra y que dará como resultado que sobrevivan pocos embriones, o ninguno (que, de lo contrario, la hembra sí habría producido). El mismo esperma debería inducir una refractariedad adecuada para reaparearse en la hembra, al mismo tiempo que tendrá un buen rendimiento en la competencia espermática si la hembra se vuelve a aparear. Nuestro enfoque en este sentido es construir letales de efecto paternal, a través de los cuales pueda entrar el esperma en un óvulo, pero no se forme ningún cigoto viable (capaz de convertirse en un adulto fértil). Lo ideal sería que este efecto lo generaran machos con una única copia del letal de efecto paternal, aunque también se contempla el uso de múltiples copias. Además, se prefiere que el efector tenga un efecto bioquímico directo en el esperma, en lugar de utilizar el esperma simplemente como un vehículo a través del cual entrar en el óvulo (y que tenga entonces un efecto en este). Esto se debe a consideraciones de resistencia potencial. Las nucleasas son una opción preferible para los fines de la presente invención. Teóricamente, si la información genética que porta el esperma está dañada hasta el punto de que algunos o (preferiblemente) sustancialmente todos los cigotos son inviables, entonces esto conforma la base para una forma adecuada de esterilidad a través de la letalidad de efecto paternal. Se han investigado distintos tipos de nucleasas en un intento por inducir daños específicos al esperma. Todas las nucleasas se analizaron como parte del sistema condicional bipartito «tet-off»; esto es, ligadas a una secuencia de *tetO*. Este enfoque permite la evaluación de diversas proteínas efectoras en combinación con diferentes secuencias promotoras específicas de la línea germinal, sin necesidad de crear nuevas cepas transformantes. Asimismo, ofrece una situación más realista en lo que respecta a su aplicación en el futuro.

[0216] Se han descrito nucleasas con dedos de zinc (ZFN), donde cada dedo de zinc proporciona unión específica de secuencia a una secuencia de nucleótidos corta, p. ej., de 3 nucleótidos. Se puede proporcionar una afinidad más elevada y una mayor especificidad de secuencia combinando varios de dichos dedos de zinc en una única proteína. Si se combina con una nucleasa, p. ej., el dominio de nucleasa de la endonucleasa de restricción FokI, se puede construir una nucleasa artificial específica de secuencia, con especificidad de secuencias arbitraria. Hemos probado la hipótesis de que las ZFN pueden producir roturas del ADN en espermátidas alargadas cruzando estas líneas con diversos promotores específicos de la línea germinal masculina. Se han diseñado y probado dos (OX4103) (Figura 18) y tres (OX4104, Figura 19) constructos de nucleasa con dedos de zinc. Una evaluación anterior, mediante el cruce con líneas de promotor-tTAV que se expresan en tejidos somáticos, indicó que la nucleasa de dedos de 3-Zn muestra un mayor efecto «letal», y por lo tanto la más fuerte de estas líneas se utilizó para los fines del presente trabajo. Por consiguiente, se prefiere esta nucleasa.

[0217] Las endonucleasas *homing* son un tipo de enzimas de restricción codificadas normalmente por intrones. Actúan en el ADN celular de las células que las sintetizan, y tienden a reconocer secuencias de nucleótidos relativamente largas (15-40 pb, aunque a menudo aceptan algunos desajustes con respecto a la secuencia objetivo nominal) que, por lo tanto, rara vez tienen lugar, si llegan a tener lugar, en cualquier genoma de insecto determinado. El número mínimo de sitios de reconocimiento/corte aceptables es de uno por genoma diploide; se prefiere uno por genoma haploide, y se prefiere particularmente el reconocimiento/corte de múltiples sitios por genoma haploide. Un ejemplo de una endonucleasa *homing* que corta múltiples sitios por genoma es IPPol.

[0218] Aunque esta presenta un sitio de reconocimiento bastante específico y largo, corresponde a una secuencia altamente conservada en un gen de ADNr. Debido a que en todos los genomas eucariotas se encuentran múltiples copias de este ADNr, múltiples sitios objetivo se encuentran disponibles. Se diseñó y se probó un constructo de tetO-IPPO1 (OX4112, Figura 17).

[0219] Las endonucleasas de restricción presentan sitios de reconocimiento de 4-10 pb, que normalmente cortarían un genoma eucariota muchas veces. Dichas nucleasas no presentan especificidad de secuencia considerable. Para nuestro objetivo, se prefiere particularmente FokI, que no es sensible a la metilación y de la cual se sabe que el dominio de nucleasa funciona en diversos tipos de células, así como *in vitro*. El dominio de nucleasa FokI combinado con un dominio de unión al ADN de poca o ninguna especificidad de secuencia resulta especialmente interesante. Entre los ejemplos preferidos de este tipo de efector están las fusiones de protamina-nucleasa. Una ventaja de la fusión protamina-nucleasa es la necesidad de dimerización (o polimerización), ya sea consigo misma (homodímero) o con al menos una proteína diferente (heterodímero) para cortar ADN. Una enzima que no necesite dimerizarse presentará normalmente una función de respuesta a la dosis no lineal. En el caso concreto de una enzima que se puede unir en muchos sitios en el genoma, con una baja concentración, es poco probable que dos moléculas de enzima se encuentren de tal forma que sean capaces de cortar. Esto puede resultar ventajoso cuando el sistema de expresión condicional sea parcialmente funcional, ya sea a través del promotor o a través del sistema condicional en sí, produciendo un bajo nivel de efector, distinto de cero, en al menos algunas células que no sean las células previstas (p. ej., que no se encuentren en la línea germinal masculina). Se ha diseñado y probado un constructo de tetO-protamina-FokI (OX4458, Figura 21).

[0220] Se hace referencia a la evaluación de esterilidad masculina en el sistema bipartito mencionado anteriormente como «Ensayos o experimentos de tasa de eclosión de huevos». En la Figura 1 se muestra una representación esquemática del diseño. Las líneas promotoras conducen la expresión de tTAV en la línea germinal masculina, preferiblemente con poca o ninguna expresión en otro sitio, mientras que las líneas efectoras están ligadas a la secuencia de *tetO*, cuya expresión se correlaciona con tTAV, tanto de forma temporal como espacial. Los marcadores de transformación en las líneas promotoras y efectoras utilizan distintos genes fluorescentes para una evaluación precisa de los resultados, esto es, las líneas promotoras dan respuesta fluorescente verde, mientras que las líneas efectoras dan respuesta fluorescente roja con filtros de excitación apropiados. Las líneas efectoras (E) y promotoras (P) se cruzan sin tetraciclina, esto es, en condiciones propicias (para la expresión). Los huevos resultantes de estos cruces se recogen y se dividen en condiciones propicias (sin tetraciclina) o condiciones represivas (con tetraciclina), y se crían en consecuencia. Las pupas se criban para la expresión de marcadores fluorescentes específicos de la línea y se recogen los heterocigotos dobles (con ambos marcadores). Se comprueba si estos presentan una proporción de machos y hembras equivalente tras la eclosión y de machos cruzados con hembras de tipo natural (de nuevo con o sin tetraciclina). Los cruces entre hembras heterocigotas dobles con machos de tipo natural se utilizan para probar si cualquier efecto observado es específico del sexo. El control de tipo natural se incluye como punto de referencia para las tasas de eclosión de los huevos. Se recogen y contabilizan los huevos de los cruces. Tres días después, se vuelven a contabilizar y se evalúa el número de huevos no eclosionados.

Figura 1.: Diseño del ensayo de tasa de eclosión de huevos.

[0221] Los resultados de una serie de estos cruces se muestran más adelante. Todos los cruces que se presentan en este documento han seguido el diseño básico descrito anteriormente.

OX4282 (PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-ccTubulin-hsp83-tTAV-SV40) x

OX4104 (PB-YAFN-hsp83-tetO21-Hr5-IE1-Red) (Figura 19)

[0222] **Figura 2. Esterilidad masculina en OX4282-OX4104 con y sin tetraciclina.** Tres líneas de inserción autosómicas independientes de transposón de OX4282 que portaban transactivador reprimible de tetraciclina (tTAV) conducidas por el promotor de β 2-Tubulin del gen de *Ceratitis capitata* (I, L, G) se cruzaron con la línea OX4104 que portaba un efector tetO-dedo de 3Zn. La progenie de estos cruces se crió y se alimentó con una dieta con (100 μ g/ml; tet+) o sin tetraciclina (tet-). Los machos que portaban ambos alelos conductores y efectores se cruzaron con las hembras de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Para cada cruce, se utilizaron dos recolecciones de huevos distintas de 100-150 huevos cada una. Los machos de tipo natural cruzados con hembras de tipo natural en presencia o ausencia de tetraciclina se utilizaron como controles. Los cruces en los que se observó una esterilidad masculina sumamente significativa (prueba de chi cuadrado, * representa $P < 0,01$, ** representa $P < 0,001$) se indican con asteriscos.

[0223] Se cruzaron tres líneas de OX4282 con una línea de dedo de 3Zn (OX4104, Figura 19), que previamente ha mostrado resultados prometedores al cruzarse con dos promotores genéricos (Hsp83 y OP). No se registraron efectos adversos en las moscas que contenían ambos plásmidos, lo cual indica que la expresión basal del efector en tejido somático no era lo suficientemente elevada como para mostrar un efecto adverso. Únicamente se observó un 14 % de eclosión de huevos en la línea L y un 27 % en la línea I. No hubo una disminución significativa de la eclosión de huevos en la línea G. Tanto la línea L como la línea I contienen una única copia del transgén, a diferencia de la línea G, que contiene dos (o más) copias. Los resultados indican claramente que el promotor 5' Hsp83 UTR-Cctubulin-SV40 3'-UTR conduce la expresión adecuada de tTAV en la línea germinal masculina para inducir esterilidad de esperma, según indica la reducción de larvas que eclosionan de la progenie resultante de estos machos. De forma adicional, no se observó una reducción de la fertilidad femenina, lo cual indica que el promotor actúa de una forma específica de la línea germinal masculina (datos no mostrados). No

obstante, el hecho de que no tuviera lugar una reducción significativa de la progenie de una línea de OX4282 apunta a efectos de posición que influyen en el fenotipo.

OX4282 (*PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-ccTubulin-hsp83-tTAV-SV40*) x

OX4112 (*PB-IPPO-1-hsp83-tetO21-Hr5-IE1-Red*)

5 **[0224]** Las mismas líneas de OX4282 se cruzaron con una línea de I-Ppo1, que había demostrado letalidad al cruzarse con dos promotores (Hsp83 y Opie2) activos en células somáticas. Utilizando este efector, se observó hasta un 50 % de esterilidad en comparación con el tipo natural y los controles de tetraciclina (datos no mostrados). Los resultados prueban que la esterilidad observada en este ensayo es el resultado de la activación de la expresión de nucleasa mediante tTAV y la posterior escisión de ADN espermático. Los niveles de esterilidad indican una penetrancia genética insuficiente. El hecho de que la misma línea mostrase un potente efecto letal cuando se cruzó con líneas promotoras genéricas puede sugerir que no se habían producido suficientes moléculas de esta proteína en la línea germinal masculina para provocar un efecto deseable. Es probable que la proteína necesite sobrepasar cierto umbral para que tenga lugar un potente efecto, lo cual incrementa la posibilidad de efectos de posición del transgén que influyan en el rendimiento. Esto, junto con el número reducido de pupas que contenían ambos transgenes que se habían observado durante este ensayo, provoca que I-Ppo1 sea un candidato menos apropiado, y por lo tanto menos preferido, para desarrollar letalidad de esperma.

OX4282 (*PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-ccTubulin-hsp83-tTAV-SV40*) x

OX4458 (*PB-AttP-Hr5-IE1-DsRed2-SV40-teto21-Dmprotamine-nuclease*)

20 **Figura 3. Esterilidad masculina de OX4282-OX4458 con y sin tetraciclina - Esterilidad reprimible específica de machos en moscas mediterráneas de la fruta transgénicas.**

25 **[0225]** Cuatro líneas de inserción autosómicas e independientes de transposón de OX4458 (Figura 21) que portaban un efector tetO-Protamina-FokI (B1, D1, D2, F2) se cruzaron con la línea conductora de OX4282L que portaba el transactivador reprimible de tetraciclina (tTAV) conducida por un promotor del gen β 2-Tubulin de *Ceratitis capitata*. La progenie de estos cruces se crió y se alimentó con una dieta con (100 μ g/ml; tet+) o sin tetraciclina (tet-). Los machos que portaban ambos alelos conductores y efectores se cruzaron con las hembras de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Para cada cruce, se utilizaron cuatro recolecciones de huevos distintas de 200-500 huevos cada una. Los cruces de machos de tipo natural y OX4282L con hembras de tipo natural en presencia o ausencia de tetraciclina se utilizaron como controles. Los cruces en los que se observó una esterilidad masculina sumamente significativa (prueba de chi cuadrado, $P < 0,0001$) se marcan con asteriscos.

35 **[0226]** El constructo de OX4458 (Figura 21) contiene un único dominio de escisión de FokI fusionado con una protamina de *Drosophila* bajo el control transcripcional del operador tetO en un vector de extremo único derivado de *piggyBac* con hr5-IE1-DsRed2 como marcador de transformación. El constructo de OX4458 (Figura 21) no debería producir ningún efecto por sí solo. La expresión de la proteína de fusión efectora tiene lugar cuando la línea de OX4458 (Figura 21) se cruza con una línea adecuada que expresa tTAV, en la progenie heterocigota doble, que posee ambos alelos, y en condiciones propicias (sin represor de tTAV - tetraciclina).

40 **[0227]** Cuatro líneas con una única inserción autosómica de transgén se cruzaron con la línea que expresaba tTAV - OX4282L, que mostraba una mayor actividad promotora en experimentos anteriores (ver arriba). En la totalidad de las cuatro combinaciones heterocigotas dobles, se observó una drástica reducción en la tasa de eclosión de huevos de hembras que se habían apareado con machos transgénicos. Se confirmó la especificidad sexual del efecto observado utilizando hembras transgénicas portadoras de ambos transgenes cruzadas con machos de tipo natural (datos no mostrados).

45 **[0228]** De acuerdo con los resultados mostrados anteriormente, la combinación del promotor de tubulin «alterado» y el efector de protamina-Fok1 de *Drosophila* parecen producir un efecto letal específico de la línea germinal masculina con efectos adversos mínimos (o nulos) en el estado físico general de los machos de cualquier forma distinta a la analizada. De forma adicional, las hembras no parecen verse significativamente afectadas por la expresión de los transgenes, manteniendo la especificidad de la línea germinal masculina de las secuencias utilizadas. El siguiente paso sería diseñar un constructo que contenga tanto las secuencias promotoras como secuencias efectoras en un único plásmido (OX4353). Dicho constructo proporcionaría una situación más realista del transposón que va a ser utilizado para el desarrollo de un sistema letal de efecto paternal.

OX4353 (*PB-HrIE-AmCyan-SV40-teto14-Dmprotamine-nuclease-ccTubulin-hsp83-tTAVnew-SV40*)

55 **[0229]** Se consideró que 4 líneas eran actos de inserción única, excepto la línea F, que se creía que presentaba dos inserciones, en función del patrón hereditario del marcador de transformación. Todas las líneas se examinaron mediante cruces con tipos naturales en presencia y ausencia de tetraciclina, según se ha descrito

anteriormente. Las hembras de las mismas líneas también se cruzaron con machos de tipo natural, y su fecundidad se evaluó de una forma similar.

Figura 4. Porcentaje de esterilidad masculina en OX4353 con y sin tetraciclina.

5 [0230] Se generaron cinco líneas de inserción autosómicas e independientes del transposón OX4353 que portaban el efector tetO-Protamina-FokI y el transactivador reprimible de tetraciclina (tTAV) conducidas por un promotor de β 2-Tubulin de *Ceratitis capitata* en las moscas mediterráneas de la fruta (A, B, C, D, F). La progenie de estas líneas se crió y se alimentó con una dieta con (100 μ g/ml; tet+) o sin tetraciclina (tet-). Los machos se cruzaron con las hembras de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Para cada cruce, se utilizaron dos recolecciones de huevos de 100-150 huevos. Los machos de tipo natural cruzados con hembras de tipo natural en presencia o ausencia de tetraciclina se utilizaron como controles. Los cruces en los que se observó una esterilidad masculina sumamente significativa (prueba de chi cuadrado, ** representa $P < 0,001$, *** representa $P < 0,0001$) se marcan con asteriscos.

15 [0231] **Figura 5. Porcentaje de esterilidad femenina en OX4353 con y sin tetraciclina.** Se generaron cinco líneas de inserción autosómicas e independientes del transposón OX4353 que portaban el efector tetO-Protamina-FokI y el transactivador reprimible de tetraciclina (tTAV) conducidas por el promotor de β 2-Tubulin de *Ceratitis capitata* en las moscas mediterráneas de la fruta (A, B, C, D, F). La progenie de estas líneas se crió y se alimentó con una dieta con (100 μ g/ml; tet+) o sin tetraciclina (tet-). Las hembras se cruzaron con machos de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Se utilizaron dos recolecciones de huevos de 100-150 huevos de cada cruce. Los machos de tipo natural cruzados con hembras de tipo natural en presencia o ausencia de tetraciclina se utilizaron como controles. No se observó esterilidad femenina significativa (prueba de chi cuadrado, $P > 0,05$).

20 [0232] Los resultados indican que los machos heterocigotos OX4353 eran hasta un 100 % estériles en ausencia de tetraciclina (condiciones propicias) en la dieta. No obstante, los machos de algunas líneas eran subfértiles incluso en presencia de tetraciclina, y las hembras de la mayoría de líneas mostraron una ligera reducción de su fertilidad en ausencia de tetraciclina. A partir de los resultados anteriores, se puede concluir que la expresión del transgén es operativa en la totalidad de las 5 líneas examinadas; en cuanto a la inducción de letalidad de esperma, no obstante, el ajuste para lograr una letalidad de esperma completa (o muy cercana a ello) con efectos mínimos en el estado físico general de los insectos que contienen el transgén parece verse notablemente influido por efectos de posición (esto es, la ubicación de las secuencias introducidas en el genoma del insecto y los elementos reguladores cercanos).

25 [0233] El trabajo descrito en el presente documento muestra que un fragmento de promotor de β 2-Tubulin de 1030 pb de la mosca mediterránea de la fruta es suficiente para conducir la expresión de tTAV y para conducir además la expresión génica del efector en la espermatogénesis bajo el control de tetraciclina. La cepa OX4353 demostró ser una cepa funcional, letal de esperma y reprimible de tetraciclina. De forma adicional, se puede concluir también que la *Dm*protamina conserva al menos una de sus propiedades fundamentales al expresarse en la mosca mediterránea de la fruta; es decir, se une al ADN espermático. La secuencia de protamina no está bien conservada, por lo que el resultado positivo era incierto con anterioridad a estos experimentos. Estos resultados parecen prometedores para el uso posterior de esta combinación de promotor/efector en relación con el sistema bipartito «tet-off», con miras al control de población de la mosca mediterránea de la fruta.

OX4718 (PB4 Hrie1-AmC-MexMActPro-DsR-tetO21-Prota-mCh-FokI-CcBTubPro-tTAV2-Hrie1-ZsG)

35 [0234] OX4718 es un ejemplo de un único constructo que porta tanto componentes de promotor como de efector en la mosca mediterránea de la fruta. Este plásmido se inyectó en embriones de *Ceratitis capitata* en la etapa de preblastodermo. Las pupas que expresaban tanto proteína fluorescente roja como verde (constructo de pb de extremo 4 que contenía distintos extremos de pb con color (Dafaala *et al.*, 2006), lo cual implica la inserción de transposón completo, se hallaron entre la progenie G1 en dos cruces Go: V (1 pupa) y σ (47 pupas). La única pupa de la línea OX4718-V no sobrevivió a la etapa adulta. Las pupas de la línea OX4718- σ presentaron dos fenotipos claramente distintos: uno más fuerte (30 pupas) y otro más débil (17 pupas), y se les llamó respectivamente σ 1 y σ 2. Estas se propagaron, en su mayoría como cruces únicos de macho o hembra con el tipo natural, y en esta etapa se consideran dos actos de inserción independientes. Las líneas de OX4718- σ 1(b) y OX4718- σ 2(b) se interrumpieron en la etapa G2. El análisis fenotípico de pupas G2 indicó múltiples inserciones en cada una de estas líneas. Además, un análisis de las líneas en la etapa G3 confirmó que tanto la línea σ 1(a) como la línea σ 1(c) eran inserciones autosómicas únicas. OX4718- σ 2(a) porta una única inserción en el cromosoma X, como se ha sugerido por la ausencia o presencia alternante del transgén en machos de distintas generaciones, y no ha sido analizada posteriormente para los fines del presente estudio.

50 [0235] Las líneas de OX4718- σ 1 (a) y OX4718- σ 1(c) se criaron y alimentaron con una dieta con (100 μ g/ml; tet+) o sin tetraciclina (tet-) y se cruzaron con el tipo natural. Los cruces de tipo natural con tipo natural y los de hembras OX4718 con machos de tipo natural en presencia o ausencia de tetraciclina se utilizaron como controles. Se recolectaron huevos recientes (de no más de 24 horas de edad) de estos cruces al cuarto día tras el establecimiento de las jaulas. Se llevaron a cabo tres recolecciones por cruce/jaula. El número total de huevos

se comparó con el número total de huevos que no habían conseguido eclosionar tras cuatro días. Las tasas de eclosión se calcularon como el porcentaje promedio de huevos depositados que eclosionaron; estos datos mostraron una esterilidad significativa de machos OX4718- σ 1 en ausencia de tetraciclina. Los resultados se muestran en la **Figura 6**. Las líneas de OX4718- σ 1 (a) y OX4718- σ 1(c) criadas en presencia o ausencia de tetraciclina se cruzaron con las hembras de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Los cruces de tipo natural con tipo natural y los cruces de hembras OX4718 con machos de tipo natural se utilizaron como controles. Los cruces en los que se observó una esterilidad masculina sumamente significativa (prueba de chi cuadrado, $P < 0,0001$) se marcan con asteriscos.

- 10 **[0236]** Los resultados expuestos anteriormente muestran el desarrollo exitoso de la esterilidad condicional específica masculina en *Ceratitís capitata* en un formato adecuado para su uso en el campo; esto es, se ensamblaron moléculas individuales de promotor y efector en un único constructo.

Figuras 7 y 8 Porcentaje de esterilidad masculina y femenina de OX4705 con y sin tetraciclina en la mosca del olivo.

- 15 **[0237]**

OX4705 (PBMexMAActPro-DsR-tetO21-Prota-mCh-FokI-CcBTubPro-tTAV2)

[0238] Este constituye otro ejemplo de un único constructo que contiene tanto componentes de promotor como de efector, en este caso en la mosca del olivo.

- 20 **[0239]** En función de los resultados alentadores obtenidos con la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitís capitata*), se desarrollaron plásmidos similares para un tefritido pariente; *Bactrocera oleae*, comúnmente denominada mosca del olivo. El plásmido OX4705 incorpora la forma alterada de β_2 tubulin que conduce la expresión de tTAV en la línea germinal masculina, y posteriormente la del efector de fusión tetO y DroProtamine-FokI. El plásmido incorpora también un novedoso promotor de actina muscular de la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*), que conduce la expresión de la proteína fluorescente DsRed2 como marcador de transformación.
- 25

- [0240]** La microinyección del plásmido OX4705 en embriones de la mosca del olivo en la etapa de preblastodermo generó 10 actos de inserción independientes. Todas las cepas presentaron un intenso fenotipo fluorescente (expresión de marcador fluorescente) con un microscopio con el filtro de excitación apropiado y se trataba de inserciones únicas, de acuerdo con las leyes de la herencia de Mendel. Nueve de las inserciones fueron autosómicas, mientras que una se realizó en el cromosoma X. Se comprobó la esterilidad masculina y femenina en todas las cepas en presencia y ausencia de tetraciclina del medio larvario. Los cruces de tipo natural proporcionaron un control adicional. Los resultados se muestran en las Figuras 7 y 8.
- 30

- [0241]** La Figura 7 muestra el porcentaje de esterilidad masculina de la mosca del olivo OX4705 con y sin tetraciclina. Se generaron 9 líneas de inserción autosómicas independientes del transposón OX4605 que portaba el efector tetO-Protamina-FokI y el transactivador reprimible de tetraciclina (tTAV) conducido por una forma alterada del promotor de β_2 -Tubulin de *Ceratitís capitata* en la mosca del olivo (A, A1, A2, A3, B, B1, F, F1, P). La progenie de estas líneas se crió y se alimentó con una dieta con (100 μ g/ml; tet+) o sin tetraciclina (tet-). Los machos se cruzaron con hembras de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Para cada cruce, se utilizaron tres recolecciones de huevos de 100-150 huevos para proporcionar significación estadística. Los machos de tipo natural cruzados con hembras de tipo natural en presencia o ausencia de tetraciclina se utilizaron como controles.
- 35
- 40

- [0242]** La figura 8 muestra el porcentaje de esterilidad femenina de la mosca del olivo OX4705 con y sin tetraciclina. Se generaron 9 líneas de inserción autosómicas independientes del transposón OX4705 que portaban el efector tetO-Protamina-FokI y el transactivador reprimible de tetraciclina (tTAV) conducido por el promotor de β_2 -Tubulin de *Ceratitís capitata* en la mosca del olivo (A, A1, A2, A3, B, B1, F, F1, P). La progenie de estas líneas se crió y se alimentó con una dieta con (100 μ g/ml; tet+) o sin tetraciclina (tet-). Las hembras se cruzaron con machos de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Se utilizaron dos recolecciones de huevos de 100-150 huevos de cada cruce. Los machos de tipo natural cruzados con hembras de tipo natural en presencia o ausencia de tetraciclina se utilizaron como controles. No se observó esterilidad femenina significativa.
- 45
- 50

- [0243]** Los datos indican claramente una impresionante esterilidad masculina en la mosca del olivo OX4705 cuando los machos se crían en presencia de tetraciclina en la dieta larvaria, sin disminución de la fertilidad masculina en ausencia de tetraciclina en la dieta larvaria, en comparación con los controles de tipo natural (Figura 7). La fertilidad femenina (Figura 8) y el estado físico general de los machos no se vieron afectados, lo cual sugiere una expresión específica de la línea germinal masculina del «casete letal paternal».
- 55

[0244] Figura 9 Porcentaje de esterilidad masculina y femenina de OX4466 con y sin tetraciclina Tras el éxito del efecto letal transmitido paternalmente en *Ceratitís capitata* y *Bactrocera oleae*, el enfoque se trasladó a

otro díptero de importancia económica: *Aedes aegypti*. Los ejemplos que se muestran más adelante aportan pruebas acerca de la significativa esterilidad masculina en esta especie utilizando secuencias promotoras y efectoras similares a las de *C. capitata*. Tuvieron lugar ligeras alteraciones en algunos constructos utilizando secuencias genómicas de este organismo para lograr máximos resultados.

5 **OX4466** (PB-hr5IE1-DsRed-Aepro-tGFP-EcoRI)

[0245] Este también proporciona un ejemplo de otro efector: Aepro-EcoRI. Se inyectó OX4466 en embriones de *Aedes aegypti* en etapa de preblastodermo. Los componentes de este constructo están constitutivamente expresados, en lugar de ser inducibles mediante el sistema tet-off. Se generaron 4 actos de inserción independientes. Se realizó un cruce regresivo de machos y hembras de cada cepa con mosquitos de tipo natural del sexo opuesto. Los insectos de tipo natural se utilizaron como control. Se permitió que las hembras depositaran los huevos en papeles de filtro húmedos durante 24 horas. Se evaluó la supervivencia de la progenie. Los resultados se muestran en la Figura 9. El gráfico muestra el porcentaje de embriones recolectados que eclosionaron de cada cruce de prueba. La tabla interior presenta los números reales registrados. El experimento muestra una disminución significativa del número de huevos eclosionados cuando estos habían sido engendrados por machos OX4466; la reducción de la viabilidad embrionaria fue menos evidente en la línea D, probablemente a causa de los efectos de posición. Los resultados confirman la especificidad sexual prevista de letalidad embrionaria; los embriones de hembras transgénicas son viables al igual que los del cruce control de tipo natural.

[0246] La secuencia de ADN del efector *Aedes*-protamina-nucleasa (EcoRI) del constructo OX4466 se fusionó con un gen fluorescente (*turboGFP*), de forma que la expresión de la nucleasa debería coexistir con la expresión de la proteína fluorescente en el esperma. La microscopía fluorescente de esperma aislado a partir de testículos diseccionados de varios machos OX4466 mostró una intensa colocalización de GFP con el núcleo / cabezas de espermatozoides. Este es un ejemplo de función de nucleasa fusionada con expresión fluorescente.

Figura 10 Porcentaje de esterilidad masculina y femenina de OX4467 con y sin tetraciclina

25 [0247]

OX4467 (PB-hr5IE1-DsRed-Aepro-tGFP-FokICD)

[0248] OX4467 es idéntico al plásmido OX4466, siendo la única diferencia que el efector de nucleasa es Fok1 en lugar de EcoRI.

[0249] La inyección de este plásmido en embriones de *Aedes aegypti* en etapa de preblastodermo derivó en 3 actos de inserción independientes. Dos de estos actos se perdieron en la generación G1 a través de machos G0 transgénicos; lo cual indica una muy fuerte expresión del efecto letal paternal. La cepa restante fue analizada como se ha mencionado anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 10. El gráfico muestra el porcentaje de embriones recolectados que eclosionaron de cada cruce de prueba. La tabla interior presenta los números reales registrados. El experimento muestra una reducción significativa del número de huevos eclosionados cuando estos fueron engendrados por machos OX4467. Los resultados confirman la especificidad sexual prevista de la letalidad embrionaria; los embriones de hembras transgénicas son viables del mismo modo que los de los cruces control de tipo natural.

[0250] Al igual que en el plásmido OX4466, la secuencia de ADN del efector *Aedes*-protamina-nucleasa (*Fok1*) se fusionó con un gen fluorescente (*turboGFP*) de tal forma que la expresión de la nucleasa debería coexistir con la expresión de la proteína fluorescente en el esperma. La microscopía fluorescente de esperma aislado a partir de testículos diseccionados en varios machos OX4467-E1 mostró una intensa colocalización de GFP con el núcleo / cabezas de espermatozoides. Este es otro ejemplo de función de nucleasa fusionada con expresión fluorescente.

OX4286 (PB-AeTopi-tTAV-K10-3xP3-DsR)

[0251] OX4286 (Figura 23) es un constructo basado en el transposón piggyBac que contiene tTAV conducido por el promotor topi y la 5'-UTR de topi derivados de *Aedes aegypti*. OX4286 (Figura 23) emplea DsRed conducido por 3xP3 como marcador de transformación. 3xP3 es un promotor artificial, específico de los ojos, que responde al factor de transcripción evolutivamente conservado Pax-6, y está activo durante las fases embrionaria, larvaria y de pupa. Para examinar la actividad del promotor Topi, se utilizó una línea indicadora, OX3979-Ae. El OX3979-Ae contiene una secuencia de codificación de AmCyan bajo el control del operador tetO, integrada en un sitio de acoplamiento genómico utilizando el sistema del fago C31. Este expresa DsRed conducido por hr5IE1 como el marcador de transformación. Los heterocigotos dobles que portaban tanto Topi-tTAV como tetO-AmCyan, generados mediante cruces entre las líneas OX4628B y OX3979, mostraron una clara expresión de AmCyan en los testículos de *Aedes aegypti* de fases larvarias más tardías.

55 **OX4635** (PB-HrIE-AmCyan-SV40-Aebeta2tubulin-hsp83-tTAV-SV40)

[0252] Para examinar la idoneidad del promotor de B2 tubulin para su uso en un sistema condicional de esterilidad masculina en mosquitos OX4635 de *Aedes aegypti*, se creó un constructo basado en piggyBac. Smith

et al., en su publicación de 2007, describieron la clonación y caracterización del promotor de B2-tubulin de *Aedes aegypti* y definieron su fragmento de 959 pb como suficiente para conducir la expresión de DsRed en testículos de mosquito, de una forma específica de la fase y el tejido, similar al promotor endógeno. Esto representó una expresión directa y acertada de un gen indicador, y fue similar en cuanto al diseño a nuestro sistema constitutivo de esterilidad masculina previamente analizado. Para adaptar al promotor para su uso en nuestro sistema de expresión condicional, se decidió eliminar tan pronto como fuera posible las secuencias transcritas de B2-tubulin, argumentando que era probable que estas mediaran con el retraso traduccional típico de B2-tubulin, lo cual no sería nada deseable en el caso del sistema de expresión bipartito propuesto. La 5'-UTR, junto con los primeros 36 pb de ORF presentes en la secuencia utilizada por Smith *et al.* (2007), se suprimió y se sustituyó por un promotor mínimo de hsp83 de la mosca mediterránea de la fruta. Este promotor modificado se empleó para conducir la expresión de tTAV en el constructo OX4635. OX4635 contiene AmCyan conducido por hr5IE1 como el marcador de transformación.

Esterilidad masculina condicional en *Aedes aegypti*

Figura 11 Expresión de tetO-Ae-Protamine-FokI-CD (OX4286-B x OX4458) conducida por Topi-tTAV en OX4282-OX4627

[0253]

OX4627 (PB-AeProt-FokI-sv40-polyA-hrIE1-DsRed)

[0254] Para la segunda parte del sistema condicional de esterilidad, la proteína efectora nucleasa, se configuró el constructo OX4627 de una forma similar a OX4458 (Figura 21) (utilizado con éxito en *C. capitata*); siendo la diferencia principal que la secuencia de protamina utilizada procedía de *Aedes aegypti* y no de *D. melanogaster* para unos resultados óptimos.

[0255] La cepa OX4282B se cruzó con cuatro cepas distintas de OX4627. Los machos heterocigotos dobles se cruzaron con hembras de tipo natural y se contabilizaron los embriones resultantes para las tasas de eclosión. Se incluyó un solo OX4627 de tipo natural, y hembras control. Se observó una disminución significativa (de hasta el 100 %) de la tasa de eclosión embrionaria en la totalidad de las 4 muestras de machos portadores de ambos alelos criados con una dieta sin tetraciclina. Los resultados se muestran en la Figura 11. La progenie de cruces entre las líneas OX4286B y OX4627 se crió en una dieta con (tet+) o sin tetraciclina (tet-). Los machos que portaban ambos alelos conductores y efectores se cruzaron con las hembras de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Los cruces de machos de tipo natural con hembras de tipo natural se utilizaron como controles. Los cruces en los que se observó una esterilidad masculina sumamente significativa (prueba de chi cuadrado) se marcan con asteriscos.

Figura 12 Expresión de tetO-Ae-Protamina-FokI-CD (OX4635 x OX4627) conducida por β 2-tub-tTAV en OX4635-OX4627

[0256] Se cruzaron dos cepas de OX4635 con cuatro cepas distintas de OX4627. Los machos heterocigotos dobles se cruzaron con hembras de tipo natural y se contabilizaron los embriones resultantes para las tasas de eclosión. Se utilizó un cruce de tipo natural como control. Se observó una reducción significativa de la tasa de eclosión embrionaria en algunos machos heterocigotos (para cada alelo) que portaban ambos alelos criados con una dieta sin tetraciclina. Se cree que el hecho de que no todas las muestras presentaran la misma tasa de esterilidad espermatógena se puede deber a los efectos de posición de las diversas inserciones de transgén. Los resultados se muestran en la Figura 12. La progenie de cruces entre las líneas OX4635 y OX4627 se crió en una dieta con (tet+) o sin tetraciclina (tet-). Los machos que portaban ambos alelos conductores y efectores se cruzaron con las hembras de tipo natural y se calcularon las tasas de eclosión de los huevos obtenidos a partir de estos cruces (porcentaje de huevos depositados que eclosionaron). Los cruces de machos de tipo natural con hembras de tipo natural se utilizaron como controles. Los cruces en los que se observó una esterilidad masculina sumamente significativa (prueba de chi cuadrado) se marcan con asteriscos.

[0257] Se observó un mayor efecto de esterilización global en cruces en los que la expresión de nucleasa fue conducida por el promotor Topi, en comparación con B2-tubulin, en *Aedes aegypti*. No obstante, en ambos casos se observó una significativa esterilidad masculina, provocando que tanto topi como la forma alterada de B2-tubulin sean promotores adecuados para el «efecto de letalidad paternal» en la especie de mosquito *Aedes aegypti*. Sin embargo, el efecto más intenso ejercido por el promotor de Topi podría estar relacionado con más de una inserción de alelo de Topi-tTAV. De acuerdo con los datos de segregación de un fenotipo, existen varias inserciones de Topi-tTAV en la línea OX4286B, algunas de las cuales están ligadas al locus de determinación del sexo masculino. *Aedes aegypti* carece de cromosomas sexualmente dimórficos; en su lugar, el sexo se determina mediante la presencia o ausencia del locus de determinación del sexo masculino (M).

[0258] La proteína de fusión efectora de nucleasa, protamina-Fok1, es completamente funcional en tres especies distintas de dípteros analizadas hasta el momento, a saber, *C. capitata*, *B. oleae* y *Aedes aegypti*.

Cepas de machos estériles y hembras letales cruzadas entre sí

[0259] Con el fin de examinar cómo puede interactuar la tecnología letal de esperma con la tecnología de RIDL letal de hembras y los posibles efectos sobre el rendimiento general de un producto final que contenga ambos transgenes, se configuró un experimento donde hembras de OX4353 de la mosca mediterránea de la fruta (se seleccionaron dos líneas B y F) se cruzaron con machos de una línea letal de hembras de la mosca mediterránea de la fruta (OX3864A y OX3647Q). El uso de la tecnología de RIDL se describió primero en WO 01/39599. Los individuos que contenían ambas inserciones se seleccionaron según sus fenotipos fluorescentes y se establecieron ensayos de letalidad femenina y de esterilidad. En ausencia de tetraciclina, la progenie de estos cruces debería ser únicamente masculina y estéril. Se evaluó la fertilidad masculina y la letalidad femenina en presencia y ausencia de tetraciclina (100 ng/μl). Los resultados confirmaron que no se había producido progenie femenina en ausencia de tetraciclina en ninguno de los cruces, mientras que se obtuvo una proporción de machos y hembras normal de 50:50 cuando las larvas habían crecido con comida que contenía tetraciclina. Se realizó un cruce regresivo de los machos que contenían ambas inserciones con hembras de tipo natural, y se evaluó la esterilidad masculina como en los cruces anteriores. Los resultados se presentan en la **Figura 13**. Los datos indican que la esterilidad masculina de las cepas de OX4353 analizadas no se vieron afectadas por la presencia de la respuesta positiva letal de hembras, o incluso se ha reducido un poco más, aunque este hecho se puede atribuir a la variación estocástica. De manera importante, estos cruces sugieren firmemente que la presencia de plásmidos letales de hembras y esperma pueden coexistir en un único organismo sin ningún efecto adverso en el rendimiento de cualquier inserción.

Función de 5'-UTR y 3'-UTR en el promotor Ccβ2-tubulin en cepas letales de esperma

[0260] El promotor Ccβ2-tubulin, como se ha descrito en otras partes en la literatura (Catteruccia *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007; Scolari *et al.*, 2008; Nirmala *et al.*, 2009) no condujo la expresión de DsRed2 en la totalidad del esperma en las cepas de OX3671 (**Figura 16**), posiblemente relacionada con la transcripción tardía o la traducción del gen Ccβ2-tubulin. La expresión tardía puede dar como resultado una proteína tTAV insuficiente que se una a repeticiones de tetO para la activación de la función de un gen indicador o de un gen letal en la cepa transgénica. Los constructos con una 5'-UTR modificada (OX3831, OX4282 y OX4353) mostraron niveles de fluorescencia o letalidad en el esperma más altos, lo cual representa la importancia de la 5'-UTR en la expresión génica en la espermatogénesis.

[0261] En *D. melanogaster*, la mayoría de los genes se expresan antes de la meiosis, y los productos se almacenan en las células de la línea germinal en desarrollo, solo unos pocos genes se transcriben tras la meiosis (White-Cooper 2009). El momento de la transcripción y de la traducción, y la estabilidad de productos proteicos y de ARN, son vitales para el desarrollo de cepas transgénicas letales de esperma de mosca mediterránea de la fruta. La importancia de esto puede variar entre un tipo de efector y otro. De hecho, Windbichler *et al.* especulan que parte de su problema fue que la nucleasa era demasiado estable, y persistía hasta en el embrión (Windbichler *et al.*, 2008). Por otro lado, para el marcado de esperma con una proteína fluorescente, es evidentemente fundamental que la proteína fluorescente sobreviva hasta el esperma maduro. La *Ccβ2-tubulin* no modificada se expresa en la línea germinal masculina, como se puede confirmar mediante el empleo de promotores de este gen para conducir la expresión de un gen indicador en espermatoцитos. Sin embargo, este promotor de *Ccβ2-tubulin* en su configuración normal, esto es, combinado con secuencias de 5'-UTR derivadas del mismo gen, puede conducir la traducción de tTAV muy tarde, y justo antes de la meiosis. En este caso, no hay suficiente tiempo para que la proteína tTAV se una a las secuencias de tetO e induzcan además la suficiente expresión del gen indicador adyacente, al cruzarse con una cepa de tetO-indicador. Con el promotor de Ccβ2-tubulin no modificado, solo uno de cada 20 testículos presentó expresión del indicador (DsRed2) en unos cuantos haces de espermátida. Por otro lado, la sustitución de 5'-UTR dio como resultado una mayor expresión de fluorescencia en espermatoцитos y espermátidas tempranas de testículos diseccionados de machos en las cepas OX3831 (**Figura 20**) y OX4282. La 3'-UTR contiene secuencias que regulan la eficacia de la traducción y la estabilidad del ARNm, sustituyendo por tanto la 3'-UTR del gen tubulin con una secuencia que se sabe que funciona en una amplia gama de especies; posiblemente, una elimina los elementos reguladores responsables de la traducción tardía del gen tubulin.

OX4371 (PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-Topi-ubi-tTAV2-SV40)

OX4112 (PB-IPPO-1-hsp83-tetO21-Hr5-IE1-Red)

[0262] Por el patrón hereditario, las líneas de OX4371 (**Figura 27**) parecían presentar una única copia del transgén. Al cruzarse con la línea OX4112 (**Figura 17**), que contiene el efector IPpo1, se produjo una ligera disminución del número de individuos que contenían ambos plásmidos (en comparación con las pupas de tipo natural del mismo cruce). No obstante, no hubo una reducción significativa del número de huevos eclosionados en la mayoría de las líneas, con la excepción de la línea E, que presentaba una reducción del 40 % en la fertilidad masculina.

OX4371 (PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-Topi-ubi-tTAV2-SV40)

OX4104 (PB-YAFN-hsp83-tetO21-Hr5-IE1-Red) (**Figura 19**).

[0263] Cuando se cruzaron las líneas de OX4371 (**Figura 27**) con la línea de dedo de 3-Zn, las moscas que contenían ambos plásmidos eran totalmente viables y estaban sanas. No se produjo una reducción de la fertilidad masculina en la línea F; sin embargo, se produjo una reducción del 45 % y del 40 % en las líneas B y E respectivamente.

5 **OX4391** (PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-Topi-ubi-tTAV2-Topi3'UTR)

OX4104 (PB-YAFN-hsp83-tetO21-Hr5-IE1-Red) (**Figura 19**)

[0264] Se estimó que las líneas de OX4391G, C y D presentaban una única inserción, mientras que las líneas B y H parecían presentar cada una dos copias del transgén. Al cruzar las líneas de OX4391 (**Figura 22**) con la línea de tetO-dedo de 3Zn (OX4104, **Figura 19**), no pareció haber ningún efecto adverso en la viabilidad de los individuos que contenían ambos plásmidos. Esto indica que presentaba una expresión basal muy baja (en caso de haberla) de los transgenes en tejido somático. De entre la totalidad de las 5 líneas analizadas, B presentaba una reducción del 70 % en la capacidad del esperma para producir progenie viable, mientras que la línea H era únicamente un 40 % fértil. No hubo diferencias significativas en la viabilidad de los huevos con y sin T en el resto de las líneas. Los resultados indican claramente que la presencia de dos copias en esta combinación en concreto disminuye significativamente la fertilidad de los machos analizados.

15

OX4391 (PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-Topi-ubi-tTAV2-Topi3'UTR)

OX4112 (PB-IPPO-1-hsp83-tetO21-Hr5-IE1-Red)

[0265] Cuando se cruzaron las mismas líneas de OX4391 (**Figura 22**) con la línea de IPPO1, la cantidad de progenie que contenía ambos plásmidos en ausencia de T se redujo en comparación con la progenie que contenía cualquiera de los dos plásmidos o ninguno. La viabilidad del huevo se evaluó según lo descrito en experimentos similares. No se produjo una reducción significativa de la cantidad de larvas eclosionadas al compararse con el control de tipo natural en las líneas B, C, F y G. Se experimentó una reducción del 50 % en la viabilidad del embrión en la línea H.

20

[0266] Tanto el promotor *Aetopi* como el promotor *Cctopi* han demostrado que son capaces de dirigir la expresión específica de los testículos de un gen indicador y de tTAV, que posteriormente indujo expresión específica de los testículos de un gen indicador o de un gen letal. En concreto, se mostró que una secuencia de 1233 pb, incluyendo 1168 pb de promotor *Aetopi* y 65 pb de 5'-UTR de *Aetopi*, conducía expresión específica en los testículos de la proteína de fusión tTAV-DsRed en *Ae. aegypti* (datos no mostrados), y que la expresión de tTAV puede inducir además la expresión del gen indicador AmCyan específico de los testículos. Un promotor *Cctopi* putativo de 1178 pb no mostró indicios de actividad específica en los testículos de la mosca mediterránea de la fruta. Se descubrió que un fragmento de secuencia más grande (1708 pb) de *Cctopi* era suficiente para conducir la expresión de tTAV específica de los testículos.

25

30

[0267] Desde una perspectiva de ingeniería genética aplicada, el fragmento de promotor putativo de *Cctopi* utilizado se verificó como un nuevo promotor específico de la línea germinal masculina en la mosca mediterránea de la fruta, con una expresión más temprana que el promotor de *β-2-tubulin* anteriormente caracterizado.

35

REFERENCIAS

[0268]

Alphey, L. (2007). "Engineering insects for the Sterile Insect Technique", en M. Vreysen, A. Robinson, y J. Hendrichs, (eds.), *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*. Dordrecht, Países Bajos, Springer, pp. 51-60.

40

Alphey, L., Beard, B., Billingsley, P., Coetzee, M., Crisanti, A., Curtis, C. F., Eggleston, P., Godfray, C., Hemingway, J., Jacobs-Lorena, M., James, A., Kafatos, F., Mukwaya, L., Paton, M., Powell, J., Schneider, W., Scott, T., Sine, B., Sinden, R., Sinkins, S., Spielman, A., Touré, Y., y Collins, F. (2002). "Malaria control with genetically modified vectors". *Science*, 298, pp. 119-121.

45

Arama, E., Agapita, J., y Steller, H. (2003). "Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*". *Developmental Cell*, 4, pp. 687-697.

Barreau, C., Benson, E., Gudmannsdottir, E., Newton, F., y White-Cooper, H. (2008). "Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes". *Development*, 135, pp. 1897-1902.

50

Bauer DuMont, V., Flores, H., Wright, M., y Aquadro, C. (2007). "Recurrent positive selection at Bgcn, a key determinant of germ line differentiation, does not appear to be driven by simple coevolution with its partner protein Bam". *Mol. Biol. Evol.*, 24(1), pp. 182-191.

Beall, E., Lewis, P., Bell, M., Rocha, M., Jones, D., y Botchan, M. (2007). "Discovery of tMAC: a *Drosophila* testis-specific meiotic arrest complex paralogous to Myb-Muv B". *Genes Dev.*, 21, pp. 904-919.

55

Beumer, K., Bhattacharyya, G., Bibikova, M., Trautman, y Carroll, D. (2006). "Efficient gene targeting in *Drosophila* with Zinc-finger nucleases". *Genetics*, 172, pp. 2391-2403.

- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K., y Carroll, D. (2002). "Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using Zinc-finger nucleases". *Genetics*, 161, pp. 1169-1175.
- Brand, A., Manoukian, A., y Perrimon, N. (1994). "Ectopic expression in *Drosophila*". *Meth. Cell Biol.*, 44, pp. 635-654.
- 5 Brand, A., y Perrimon, N. (1993). "Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes". *Development*, 118, pp. 401-415.
- Burt, A. (2003). "Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations". *Proc. Biol. Sci.*, 270, pp. 921-928.
- 10 Burt, A., y Trivers, R. (2006). *Genes in conflict: The biology of selfish genetic elements*, Cambridge, Belknap Press, Harvard University Press.
- Cagan, R. (2003). "Spermatogenesis: Borrowing the apoptotic machinery". *Current Biology*, 13, pp. R600-R602.
- Catteruccia, F., Benton, J., y Crisanti, A. (2005). "An *Anopheles* transgenic sexing strain for vector control". *Nature Biotechnology*, 23(11), pp. 1414-1417.
- 15 Catteruccia, F., Crisanti, A., y Wimmer, E. (2009). "Transgenic technologies to induce sterility". *Malaria Journal*, 8(Supl. 2), pp. S7.
- Chintapalli, V., Wang, J., y Dow, J. (2007). "Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* models of human disease". *Nature Genetics*, 39, pp. 715-720.
- 20 Deredec, A., Burt, A., y Godfray, H. (2008). "Population genetics of using homing endonuclease genes in vector and pest management". *Genetics*, 179, pp. 2013-2026.
- Dhillon, M., Singh, R., Naresh, J., y Sharma, H. (2005). "The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: a review of its biology and management". *Journal of Insect Science*, 5, pp. 40.
- Dyck, V. A., Hendrichs, J., y Robinson, A. S. (2005). "Sterile Insect Technique: Principles and practice in Area-Wide Integrated Pest Management". Ciudad: Springer: Países Bajos, pp. 801.
- 25 Franz, G. (2005). "Genetic sexing strains in mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique", en V. A. Dyck, J. Hendrichs, y A. S. Robinson, (eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Países Bajos, Springer, pp. 427-451.
- 30 Fu, G., Condon, K. C., Epton, M. J., Gong, P., Jin, L., Condon, G. C., Morrison, N. I., Dafa'alla, T. H., y Alphey, L. (2007). "Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing". *Nature Biotechnology*, 25(3), pp. 353-357.
- Fuller, M. (1993). "Spermatogenesis", en M. Bate y A. Martinez Arias, (eds.), *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 71-147.
- 35 Fussenegger, M. (2001). "The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies". *Biotechnol. Prog.*, 17, pp. 1-51.
- Fussenegger, M., Morris, R., von Stockar, B., Fux, C., Timann, M., Thompson, C., y Bailey, J. (2000). "Novel Streptogramin-based gene regulation systems for mammalian cells". *Nat. Biotech.*, 18, pp. 1203-8.
- Gonczy, P., Matunis, E., y DiNardo, S. (1997). "bag-of-marbles and benign gonial cell neoplasm act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis". *Development*, 124, pp. 4361-4371.
- 40 Gong, P., Epton, M., Fu, G., Scaife, S., Hiscox, A., Condon, K., Condon, G., Morrison, N., Kelly, D., Dafa'alla, T., Coleman, P., y Alphey, L. (2005). "A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly". *Nat. Biotech.*, 23, pp. 453-456.
- Gong, W., y Golic, K. (2003). "Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*". *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 100, pp. 2556-2561.
- 45 Gossen, M., y Bujard, H. (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(12), pp. 5547-51.
- Gossen, M., y Bujard, H. (2002). "Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation". *Annu. Rev. Genet.*, 36, pp. 153-173.
- 50 Hiller, M., Chen, X., Pringle, M., Suchorolski, M., Sancak, Y., Viswanathan, S., Bolival, B., Lin, T. Y., Marino, S., y Fuller, M. (2004). "Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program". *Development*, 131, pp. 5297-5308.

- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C. S., Gao, Q., Cassady, J. P., Cost, G. J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J. C., Zeitler, B., Cherone, J. M., Meng, X., Hinkley, S. J., Rebar, E. J., Gregory, P. D., Urnov, F. D., y Jaenisch, R. (2011). "Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases". *Nat Biotech*, 29(8), pp. 731-734.
- 5 Horn, C., Wimmer, A.E., (2003) "A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management". *Nature Biotechnology*, 1, pp. 64-70
- Jattani, R., Patel, U., Kerman, B., y Myat, M. M. (2009). "Deficiency screen identifies a novel role for beta 2 tubulin in salivary gland and myoblast migration in the *Drosophila* embryo". *Developmental Dynamics*, 238(4), pp. 853-863.
- 10 Jiang, J., Benson, E., Bausek, N., Doggett, K., y White-Cooper, H. (2007). "Tombola, a tesmin/TSO1 family protein, regulates transcriptional activation in the *Drosophila* male germline and physically interacts with Always early". *Development*, 134(1549-1559).
- Jiang, J., y White-Cooper, H. (2003). "Transcriptional activation in *Drosophila* spermatogenesis involves the mutually dependent function of aly and a novel meiotic arrest gene cookie monster". *Development*, 130, pp. 563-573.
- 15 Kawase, E., Wong, M., Ding, B., y Xie, T. (2004). "Gbb/Bmp signaling is essential for maintaining germline stem cells and for repressing bam transcription in the *Drosophila* testis". *Development*, 131, pp. 1365-1375.
- Kim, Y.-G., Cha, J., y Chandrasegaran. (1996). "Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to FokI cleavage domain". *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 93, pp. 1156-1160.
- 20 Klassen, W., y Curtis, C. F. (2005). "History of the sterile insect technique", en V. A. Dyck, J. Hendrichs, y A. S. Robinson, (eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Países Bajos, Springer, pp. 3-36.
- Knipling, E. F. (1955). "Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males". *J Econ Entomol*, 48, pp. 459 - 469.
- 25 Mahfouz, M. M., Li, L., Shamimuzzaman, M., Wibowo, A., Fang, X., y Zhu, J.-K. (2011). "De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks". *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Malacrida, A., Scolari, F., Schetelig, M., Bertin, S., Gasperi, G., y Wimmer, E. (2007). "A transgenic sperm marking system in the medfly, as a tool for pest control strategies and sperm use analysis". *Entomological Research*, 37, pp. (Suppl. 1): A56.
- 30 Maynard-Smith, L., Chen, L.-C., Banaszynski, L., Ooi, A., y Wandless, T. (2007). "A directed approach for engineering conditional protein stability using biologically silent small molecules". *Journal of Biological Chemistry*, 282(34), pp. 24866-24872.
- Miller, J., Holmes, M., Wang, J., Guschin, D., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., Beausejour, C., Waite, A., Wang, N., Kim, K., Gregory, P., Pabo, C., y Rebar, E. (2007). "An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing". *Nature Biotechnology*, 25(7), pp. 778-785.
- 35 Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., Meng, X., Paschon, D. E., Leung, E., Hinkley, S. J., Dulay, G. P., Hua, K. L., Ankoudinova, I., Cost, G. J., Urnov, F. D., Zhang, H. S., Holmes, M. C., Zhang, L., Gregory, P. D., y Rebar, E. J. (2011). "A TALE nuclease architecture for efficient genome editing". *Nat Biotech*, 29(2), pp. 143-148.
- 40 Nielsen, M., Turner, F., Hutchens, J., y Raff, E. (2001). "Axoneme-specific β -Tubulin specialization: a conserved C-terminal motif specifies the central pair". *Current Biology*, 11, pp. 529-533.
- Osterwalder, T., Yoon, K., White, B., y Keshishian, H. (2001). "A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4". *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 98(22), pp. 12596-12601.
- 45 Perezgasga, L., Jiang, J., Bolival, B., Hiller, M., Benson, E., Fuller, M., and White-Cooper, H. (2004). "Regulation of transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes by the testis-specific Zn-finger protein matotopetli". *Development*, 131, pp. 1691-1702.
- Phuc, H. K., Andreasen, M. H., Burton, R. S., Vass, C., Epton, M. J., Pape, G., Fu, G., Condon, K. C., Scaife, S., Donnelly, C. A., Coleman, P. G., White-Cooper, H., y Alphey, L. (2007). "Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control". *BMC Biology*, 5, pp. 11.
- 50 Raja, S., y Renkawitz-Pohl, R. (2005). "Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromosome condensation in late spermatids and role of Sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus". *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), pp. 6165-6177.

- Rendón, P., McInnis, D., Lance, D., y Stewart, J. (2004). "Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala". *Journal of Economic Entomology*, 97(5), pp. 1547-1553.
- 5 Robinson, A. S. (2005). "Genetic basis of the sterile insect technique", en V. A. Dyck, J. Hendrichs, y A. S. Robinson, (eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Países Bajos, Springer, pp. 95-114.
- Rong, Y., y Golic, K. (2000). "Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*". *Science*, 288(5473), pp. 2013-8.
- Rong, Y., y Golic, K. (2001). "A targeted gene knockout in *Drosophila*". *Genetics*, 157, pp. 1307-1312.
- 10 Rong, Y., Titen, S., Xie, H., Golic, M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B., Brodsky, M., Rubin, G., y Golic, K. (2002). "Targeted mutagenesis by homologous recombination in *Drosophila melanogaster*". *Genes Dev.*, 16, pp. 1568-1581.
- Santel, A., Winhauer, T., Blümer, N., y Renkawitz-Pohl, R. (1997). "The *Drosophila* don juan (dj) gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of a repetitive amino acid motif". *Mechanisms of Development*, 64, pp. 19-30.
- 15 Schetelig, M.F., Handler, M.A. (2012). "Strategy for enhanced transgenic strain development for embryonic conditional lethality in *Anastrepha suspensa*". *PNAS*, 109 (24), pp. 9348-9353
- Thomas, D. D., Donnelly, C. A., Wood, R. J., y Alphey, L. S. (2000). "Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system". *Science*, 287(5462), pp. 2474-2476.
- 20 Urnov, F., Miller, J., Lee, Y.-L., Beausejour, C., Rock, J., Augustus, S., Jamieson, A., Porteus, M., Gregory, P., y Holmes, M. (2005). "Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases". *Nature*, 435, pp. 646-651.
- Victorinová, I., y Wimmer, E. (2007). "Comparative analysis of binary expression systems for directed gene expression in transgenic insects". *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37, pp. 246-254.
- 25 White-Cooper, H., Leroy, D., MacQueen, A., y Fuller, M. (2000). "Transcription of meiotic cell cycle and terminal differentiation genes depends on a conserved chromatin associated protein, whose nuclear localisation is regulated". *Development*, 127, pp. 5463-5473.
- Wilson, C., Bellen, H. J., y Gehring, W. J. (1990). "Position effects on eukaryotic gene expression". *Annu Rev Cell Biol*, 6, pp. 679-714.
- 30 Wilson, K., Fitch, K., Bafus, B., y Wakimoto, B. (2006). "Sperm plasma membrane breakdown during *Drosophila* fertilization requires sneaky, an acrosomal membrane protein". *Development*, 133(24), pp. 4871-4879.
- Windbichler, N., Menichelli, M., Papathanos, P. A., Thyme, S. B., Li, H., Ulge, U. Y., Hovde, B. T., Baker, D., Monnat, R. J., Burt, A., y Crisanti, A. (2011). "A synthetic homing endonuclease-based gene drive system in the human malaria mosquito". *Nature*, 473(7346), pp. 212-215.
- 35 Windbichler, N., Papathanos, P., Catteruccia, F., Ranson, H., Burt, A., y Crisanti, A. (2007). "Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos". *Nucl Acids Res*, 35, pp. 5922 - 5933.
- 40 Windbichler, N., Papathanos, P. A., y Crisanti, A. (2008). "Targeting the X chromosome during spermatogenesis induces Y chromosome transmission ratio distortion and early dominant embryo lethality in *Anopheles gambiae*". *PLoS Genet*, 4(12), pp. e1000291.

SECUENCIAS

[0269] Los párrafos siguientes se refieren a las SEQ ID N.ºs: 1-56 que se dan a conocer a continuación.

SEQ ID N.ºs: 1-5 Secuencias completas de beta-2 tubulin - distintos insectos

- 45 [0270]
- SEQ ID N.º: 1 >gi|167822003|gb|EU386342.1| ARNm de beta-2-tubulin de *Ceratititis capitata*, cds completa
- SEQ ID N.º: 2 >gi|158742|gb|M20420.1|DROTUBB2A ARNm de beta-2-tubulin de *D. melanogaster*, cds completa
- SEQ ID N.º: 3 >gi|111035017|gb|DQ833526.1| Gen de beta-2 tubulin (B2t) de *Aedes aegypti*, cds completa
- SEQ ID N.º: 4 >gi|2|9815271|gb|EU938673.1| Gen de beta-2 tubulin de *Bactrocera dorsalis*, cds completa
- 50 SEQ ID N.º: 5 >gi|219815267|gb|EU938671.1| Gen de beta-2 tubulin de *Anastrepha suspensa*, cds completa

SEQ ID N.ºs: 6-10: secuencias de 5'-UTR de beta-2 tubulin - distintos insectos

[0271]

SEQ ID N.º: 6 >gi|167822003|gb|EU386342.1| 5'-UTR de beta-2 tubulin de *Ceratitis capitata*

SEQ ID N.º: 7 >gi|158742|gb|M20420.1|DROTUBB2A 5'-UTR de beta-2-tubulin de *D. melanogaster*

5 SEQ ID N.º: 8 >gi|9815271|gb|EU938673.1| 5'-UTR de beta-2 tubulin de *Bactrocera dorsalis*

SEQ ID N.º: 9 >gi|111035017|gb|DQ833526.1| 5'-UTR de beta-2 tubulin (B2t) de *Aedes aegypti*

SEQ ID N.º: 10 >gi|219815267|gb|EU938671.1|DROTUBB2A 5'-UTR de beta-2 tubulin de *Anastrepha suspensa*

SEQ ID N.ºs: 11-15: secuencias de 3'-UTR de beta-2 tubulin - distintos insectos

[0272]

10 SEQ ID N.º: 11 >gi|167822003|gb|EU386342.1| 3'-UTR de beta-2 tubulin de *Ceratitis capitata*

SEQ ID N.º: 12 >gi|158742|gb|M20420.1|DROTUBB2A 3'-UTR de beta-2-tubulin de *D. melanogaster*

SEQ ID N.º: 13 >gi|111035017|gb|DQ833526.1| 3'-UTR de beta-2 tubulin (B2t) de *Aedes aegypti*

SEQ ID N.º: 14 >gi|2|9815271|gb|EU938673.1| 3'-UTR de beta-2 tubulin de *Bactrocera dorsalis*

SEQ ID N.º: 15 >gi|219815267|gb|EU938671.1| 3'-UTR de beta-2 tubulin de *Anastrepha suspensa*

15 tTAV y variantes

[0273]

SEQ ID N.º: 16: Marco de lectura abierta de tTAV

SEQ ID N.º: 17: Secuencia de proteína de tTAV

SEQ ID N.º: 18: Marco de lectura abierta de tTAV2

20 SEQ ID N.º: 19: Secuencia de proteína de tTAV2

SEQ ID N.º: 20: Marco de lectura abierta de tTAV3

SEQ ID N.º: 21: Secuencia de proteína de tTAV3

SEQ ID N.º: 22 - 5'-UTR de Beta-2 tubulin de *D. melanogaster*

25 SEQ ID N.º: 23-24 - secuencia promotora de b2 tubulin de *Drosophila melanogaster* (SEQ ID N.º 24) alineada con la secuencia de ARNm de b2-tubulin de Dm (5'-UTR se incluye en el alineamiento) (SEQ ID N.º 23)

SEQ ID N.º: 25 - ORF de Hsp83 de la mosca mediterránea de la fruta

SEQ ID N.º: 26 - 5'-UTR proporcionada por genebank

SEQ ID N.º: 27 - 5'-UTR de Hsp83 de 4353

SEQ ID N.º: 28 - Secuencia de aminoácidos de Hsp83 de la mosca mediterránea de la fruta

30 SEQ ID N.º: 5'-UTR de Dm Aly de OX3831

SEQ ID N.º: 30 - Promotor de Dm Aly

SEQ ID N.º: 31 - TETR

SEQ ID N.º: 32 - VP16

Las secuencias de TETR y VP16 combinadas dan lugar a la secuencia de tTAV.

35 SEQ ID N.º: 33 - ADNc de DmTopi

SEQ ID N.º: 34 - Secuencia promotora de Dm según se encuentra en la base de la mosca

SEQ ID N.º: 35 - # Promotor Cc topi de OX4254

SEQ ID N.º: 36 - # Promotor Cc topi de OX4275

SEQ ID N.º: 37 - # Promotor Cc topi de OX4371

40 SEQ ID N.º: 38-40 Alineamiento de LA4254 (SEQ ID N.º 38) cf LA4275 (SEQ ID N.º 39) cf LA4371 (SEQ ID N.º 40)

SEQ ID N.º: 41 - Promotor Aedes topi de 4286

SEQ ID N.º: 42 - 5'-UTR de Ae topi de 4286

SEQ ID N.º: 43 ORF de Topi de *Drosophila melanogaster* (región codificante)

SEQ ID N.º: 44 - ORF de Aly de *Drosophila melanogaster* (región codificante)

SEQ ID N.º: 45 - Promotor y 5'-UTR de B2 tubulin de LA 3671

5 SEQ ID N.º: 46 - Promotor de B2 tubulin de LA 4353

SEQ ID N.º: 47 - 5'-UTR de hsp83 de LA 4353

SEQ ID N.º: 48 - 5'-UTR de B2 tubulin

SEQ ID N.º: 49 - AeProtamina

SEQ ID N.º: 50 - SG4

10 SEQ ID N.º: 51 - Dominio de escisión de Fok1

SEQ ID N.º: 52 - AeProtamina-SG4-Fok1

SEQ ID N.º: 53 - Cebador directo del promotor de B2 tubulin de la mosca mediterránea de la fruta

SEQ ID N.º: 54 - Cebador inverso del promotor de B2 tubulin de la mosca mediterránea de la fruta

SEQ ID N.º: 55 - Cebador de TopitestF1

15 SEQ ID N.º: 56 - Cebador de Topitest R

SEQ ID N.º: 23-24

Secuencia promotora de b2 tubulin de *Drosophila melanogaster* alineada con la secuencia de ARNm de b2-tubulin de Dm (5'-UTR se incluye en el alineamiento)

[0274]

ES 2 683 039 T3

extendida TCCTTTATTGAGATTAACGGTCAAATCAATAGATAAAAAGAAAACCTATTACATATTTAAA
dro -----

extendida GAATGATGAAATTTTAAAAATTCATTGTATCATATGTTATTTCGGCCACTGTAACCGAAAT
dro -----

extendida CAACCATTTTTGGCGGATGCTGTGTGTTTGTGTTTGTGCTGACAACATCGATTTTGTGAGAC
dro -----

extendida GCAGCATCTTTAACTGAACGAAAAAGGCGGTGGTCAAAAATATATTAATTGATTATAGA
dro -----

extendida TCGTAGTGATTATATTTGAGACTATATGATGAAGCGACAGAAATGTCCTACCCCTTCCCT
dro -----

extendida GGTGGTATGCACCTTTCACCTATCTTTTAAATGGAGCCCGGTTCGATTCCCTGGAGTC
dro -----

extendida ACCAACGGAGGCCAAAAGATGGGAATTCCTACAGAGTGAGAAGCTTGTGATTTATTAAC
dro -----

extendida CTAATTTCTTAGTAATGAATTTATTTAATCAATGTAGCCGTTAAGAACAACCTTGTAG
dro -----

extendida AAAGTACAATGTGACTGACGAGGATTTCCGTGTGATGGAAATCGTCATCATTGAAAATAA
dro -----

extendida GCCCCACAAGCCGGACCTCAGTGGAAATTCGCTGGAGCTTTCTATTTTCAGCACGGTTGT
dro -----

extendida ACTGGCAATGATAGGTAATTAATTATCTATTAATAATGATTATGAATAGATTATAAT
dro -----

extendida TCTGTTGTAACCTTTCTTTAGGATATGGTCATTCTACGCCAGTTACAATTCGGGAAAAGC
dro -----

extendida ATTTTGTATGGCTATGCTATGGTAAGTGAACCTTACAATCCCAATTTCCAGTCTTCTAAA
dro -----

extendida GATATCCCTTATTAGGTGGCATCCCGCTGGGTCGGTGATGTTCCAGTCTATCGGAGA
dro -----

extendida ACGTCTGAATAAGTTTGCATCCGTGATAATAAGGCGGGCAAAGAGAGCCAGTGGAGCTCG
dro -----

extendida CTGTACGGATGCCACCGAAATGAATCTCATGTTGGCCACCGAATGCTCTCCTCCATAAT
dro -----

extendida AATCACCACTGGAGCAGCAGTCTTTTCCGATACGAGGTTGGAGCTACTTCGATAGCTT

ES 2 683 039 T3

dro -----

extendida C T A C T A T T G T T T T G T C A C C T T G A C G A C A A T T G G T T C G G C G A T T A T G T G C C A T T G C A G A A
dro -----

extendida C G A C C A A G C T C T A A C T A A T A A G C C T G G C T A T G T G G C G C T G A G C T T G G T C T T C A T C C T A T T
dro -----

extendida C G G C T T G G C C G T G G T G G C C C C A G T A T C A A T C T A T T G G T G C T C C G A T T C A T G A C C A T G T G
dro -----

extendida A G T C C A T G T T C T A T T G C A G G A A A T A T C T T A T T T A A T G G A T T T T T A A T C A C A G G C A A G C A G
dro -----

extendida A G G A T G C C A A G A G A G A T G A G C A G G A T G C T C A G A A C T T G G C T G G A A A T G C C C A G C C G T G A
dro -----

extendida C C T T C G A T G A T G A G T C C A C G T A C A A T A T G C A C G G C A A G C T G C T G G A G A A C A A C T A C A C A A
dro -----

extendida C G G A G A A C G A T G A G A C C G C C T C C C T G T G T T C C T G C A C C T G C A T G G G T G G C A C C A G G T G C C
dro -----

extendida T G A A T C A T G A G C A G T T C G T G G A C C C G G A C T T T C A G C C T A C C G A C A T T A T C G A G A G C A C C T
dro -----

extendida T G T G C C T G A A G C G A G C C T C C G T C T G A T A T C C G T A C A G C C A G C T G T G G G A C T C C T C A T T G T
dro -----

extendida A G G A G C C A G A G C C A A T G G A T C A C C A A A T C G T A G T T A C A A T C C T G T A G A G A A C C A T C C G C C
dro -----

extendida G C C A A A A T T T G G T T G T T A G A C A A A C C T T C C T C C C T A C G T A G A T T T T T A A A C C A G G A T G G G
dro -----

extendida T C A T A A T A C A T A T A A G T T T G G A G A G C A A G G T T A A T A G T C T T T A A A A G G C A G T T T T T G C T T
dro -----

extendida A A G A A A T A A T C G A C C C A T C C C A T T A T A C A C C C A T A T A A C A T T T A C A A A G G A G T A A A A T C
dro -----

extendida C A G G A C A T C C A T G T C A A T A T C A A T C G T A T C A T C T G G T C G G T A G C C T T G G A A T C C T C T A T T
dro -----

extendida G C T T C C A A G G C A C C G C C A A T C C A T C C C A T C T C G A A T T T A G C C G T A T A T T C G T T T A T C T
dro -----

extendida A T G T A A G T A C T A T T A A A G T T T G T G C T C A A A A C G G A G A A C T G A G T T T C T G A A A T C G G G G T

ES 2 683 039 T3

```
dro -----
extendida GTGTGAAATGTGTCGAAGTCGGAAATCGTAGTAGCCTATTTGTGAACATTCGGTGTAGTA
dro -----GAAATCGTAGTAGCCTATTTGTGAACATTCGGTGTAGTA
*****

extendida ATCCAAGCCAGGTTTCAGTTCACCTCAGTATCAGCTAGCACGTACACGACTAAAATCTAAA
dro ATCCAAGCCAGGTTTCAGTTCACCTCAGTATCAGCTAGCACGTACACGACTAAAATCTAAA
*****

extendida CCTGAAAATTATACGTTTAAATATTCAGTCTTTTGCCGATTTTGGCCCACTCAGACTG
dro CCTGAAAATTATACGTTTAAATATTCAGTCTTTTGCCGATTTTGGCCCACTCAGACTG
*****

extendida TTTTAAAAGCTCGATTTTTTTTGTACCATTTTTTCGGTGTGAAAAGGGGCCCTAACTT
dro TTTTAAAAGCTCGATTTTTTTTGTACCATTTTTTCGGTGTGAAAAGGGGCCCTAACTT
***** **

extendida TACTATCAAAATGCGTGAAATGTACACATTCAGGCCGTCAATGCGGTAACCAGATCGG
dro TACTATCAAAATGCGTGAAATGTACACATTCAGGCCGTCAATGCGGTAACCAGATCGG
*****

extendida TGGTAAATTCGGGAGGTAATCTCGGATGAGCACTGTATAGATGCGACCGGAACGTACTA
dro TGGTAAATTCGGGAGGTAATCTCGGATGAGCACTGTATAGATGCGACCGGAACGTACTA
*****

extendida CGGCGATAGTGATCTCCAGCTGGAGCGCATCAATGTATACTACAATGAAGCCACCGGTGC
dro CGGCGATAGTGATCTCCAGCTGGAGCGCATCAATGTATACTACAATGAAGCCACCGGTGC
*****

extendida CAAGTATGTGCCACGCGCAATTCCTCGTGGACCTGGAGCCCGCACCATGGATTGCGTTCG
dro CAAGTATGTGCCACGCGCAATTCCTCGTGGACCTGGAGCCCGCACCATGGATTGCGTTCG
*****

extendida TTCTGGCGCCTTTGGCCAGATCTCCGGCCGACAATTTGTGTTTGGCCAATCGGAGGC
dro TTCTGGCGCCTTTGGCCAGATCTCCGGCCGACAATTTGTGTTTGGCCAATCGGAGGC
*****

extendida AGGCAACAAC TGGGCAAGGGTCATTACACCGAGGGTGCTGAACTGGTGGATTCCGTCTT
dro AGGCAACAAC TGGGCAAGGGTCATTACACCGAGGGTGCTGAACTGGTGGATTCCGTCTT
*****

extendida GGATGTGGTGC GAAAGGAGTCCGAGGGATGCGATTGCC TTCAGGTAAGTTTTGGGGTTT
dro GGATGTGGTGC GAAAGGAGTCCGAGGGATGCGATTGCC TTCAGGTAAGTTTTGGGGTTT
*****

extendida GGAATTTATCTGAAAAGTTTACCCTACTTTTCTCCAACAGGGCTTCCAGCTGACCCAC
dro -----GCTTCCAGTCGACCCAC
*****
```

ES 2 683 039 T3

extendida TCGCTGGGTGGCGGCACTGGCTCCGGCATGGGAACCCTGCTGATCTCGAAGATCCGCGAG
dro TCGCTGGGTGGCGGCACTGGCTCCGGCATGGGAACCCTGCTGATCTCGAAGATCCGCGAG

extendida GAGTACCCGGACCGCATCATGAACACCTTCTCGGTGGTGGCCCTCGCCCAAGGTGTCCGAT
dro GAGTACCCGGACCGCATCATGAACACCTTCTCGGTGGTGGCCCTCGCCCAAGGTGTCCGAT

extendida ACGGTGGTGGAGCCCTACAATGCCACCCTGAGTGTGCATCAGCTGGTGGAGAACACCGAT
dro ACGGTGGTGGAGCCCTACAATGCCACCCTGAGTGTGCATCAGCTGGTGGAGAACACCGAT

extendida GAGACGTACTGCATCGACAACGAGGCGTTGTATGACATCTGCTTCCGCACACTGAAGCTG
dro GAGACGTACTGCATCGACAACGAGGCGTTGTATGACATCTGCTTCCGCACACTGAAGCTG

extendida ACCACGCCACCTACGGTGACCTGAACCATCTGGTTTCGGCCACCATGTCTGGTGTGACG
dro ACCACGCCACCTACGGTGACCTGAACCATCTGGTTTCGGCCACCATGTCTGGTGTGACG

extendida ACCTGCCTGCGCTTCCCTGGCCAGCTGAACGCTGATCTTCGCAAGCTGGCCGTGAACATG
dro ACCTGCCTGCGCTTCCCTGGCCAGCTGAACGCTGATCTTCGCAAGCTGGCCGTGAACATG

extendida GTACCCTTCCCCGGTGCACCTTCTTCATGCCCGGATTCGCACCGCTCACCTCGCGAGGA
dro GTACCCTTCCCCGGTGCACCTTCTTCATGCCCGGATTCGCACCGCTCACCTCGCGAGGA

extendida TCGCAACAATACCGGCCCTTACCGTTCGGAGCTGACCCAGCAGATGTTTCGATGCCAAG
dro TCGCAACAATACCGGCCCTTACCGTTCGGAGCTGACCCAGCAGATGTTTCGATGCCAAG

extendida AACATGATGGCTGCGTGCGATCCCGACATGGTTCGCTATCTGACCGTCCGCCCATCTTC
dro AACATGATGGCTGCGTGCGATCCCGACATGGTTCGCTATCTGACCGTCCGCCCATCTTC

extendida CGTGGCCGATGTCCATGAAGGAGGTGGACGAGCAGATGCTCAACATTCAGAACAAGAAC
dro CGTGGCCGATGTCCATGAAGGAGGTGGACGAGCAGATGCTCAACATTCAGAACAAGAAC

extendida AGCAGCTTCTTCGTGGAATGGATCCCGAATAACTGCAAGACAGCGGTGTGCGATATCCG
dro AGCAGCTTCTTCGTGGAATGGATCCCGAATAACTGCAAGACAGCGGTGTGCGATATCCG

extendida CCCAGAGTCTCAAGATGTCGGCCACCTTCATTGGCAACTCCACCGCCATTAGGAGCTA
dro CCCAGAGTCTCAAGATGTCGGCCACCTTCATTGGCAACTCCACCGCCATTAGGAGCTA

ES 2 683 039 T3

```

extendida      TTCAAACGGGTTTCGGAGCAGTTCACCGCCATGTTCCGAAGGAAGGCCTTCTTGCATTGG
dro            TTCAAACGGGTTTCGGAGCAGTTCACCGCCATGTTCCGAAGGAAGGCCTTCTTGCATTGG
*****

extendida      TACACCGGCGAGGGAATGGACGAAATGGAATTCACAGAGGCCGAGAGCAACATGAACGAC
dro            TACACCGGCGAGGGAATGGACGAAATGGAATTCACAGAGGCCGAGAGCAACATGAACGAC
*****

extendida      TTGGTTTCTGAATATCAGCAGTACCAGGAGGCGACTGCCGATGAGGAGGCGAATTCGAT
dro            TTGGTTTCTGAATATCAGCAGTACCAGGAGGCGACTGCCGATGAGGAGGCGAATTCGAT
*****

extendida      GAAGACGAAGAGGGTGGCGGCGATGAATAATAGGATTAACCTCCCACTCAAGATCACACA
dro            GAAGACGAAGAGGGTGGCGGCGATGAATAATAGGATTAACCTCCCACTCAAGATCACACA
*****

extendida      TGAACACCAAAACAGGCTAGCAGGGGAACCCATTAGGAAGGCACAACACATTGGATCTTT
dro            TGAACACCAAAACAGGCTAGCAGGGGAACCCATTAGGAAGGCACAATAACATTGGATCTTT
*****

extendida      GGGCCTTAGCATATTGTGCTTCGAGGCCCGTCGGTGTACATATTTCCATATATGGATTCT
dro            GGGCCTTAGCATATTGTGCTTCGAGGCCCGTCGGTGTACATATTTCCATATATGGATTCT
*****

extendida      TCACTGTTTCGATTATTTATCATTCACACACGTACAGAAGAAATATGTCCACCTTTGTTAA
dro            TCACTGTTTCGATTATTTATCATTCACACACGTACAGAAGAAATATGTCCAC- TTTGTTAA
*****

extendida      GCTCATGTTGCAATTGCTGTGATTTCTGGGTTACGAATAAATGTTGATTTATAAGCAGAC
dro            GCTCATGTTGCAATTGCTGTGATTTCTGGGTTACGAATAAATGTTGATTTATAAGCAGAC
*****

extendida      AAGATTACCAACAGCATTTTGCATATTTTTATACCGTTCAAAGGCATTGCATAAACCTA
dro            AAGATTACCAACAGCATTTTGCATATTTTT-----
*****

```

[0275] SEQ ID N.ºs: 38-40 - Alineamiento de LA4254 (SEQ ID N.º 38) cf LA4275 (SEQ ID N.º 39) cf LA4371 (SEQ ID N.º 40):

```

4254      GCCGTTCAAGTCAAATGTGATATTCACAACCTATTGAGCAGAGAATCCATAATGTACATA 60
4275      GCCGTTCAAGTCAAATGTGATATTCACAACCTATTGAGCAGAGAATCCATAATGTACATA 60
4371      -----

4254      TGTATTTTGATTGCTGCAACAAAAATATTAATGTTAGCAAGGTTAATTAAGTGTA 120
4275      TGTATTTTGATTGCTGCAACAAAAATATTAATGTTAGCAAGGTTAATTAAGTGTA 120
4371      -----

4254      AATGACAGATTTTTTTACATACACCACCTTCGCCCTGTAGCTAGTTGCGAGTTTACTT 180
4275      AATGACAGATTTTTTTACATACACCACCTTCGCCCTGTAGCTAGTTGCGAGTTTACTT 180
4371      -----

4254      CAGTTTCTATCTAATTCGTTGAATCCATATGGCAGAATTACAGTGAATGGACGCTCTC 240
4275      CAGTTTCTATCTAATTCGTTGAATCCATATGGCAGAATTACAGTGAATGGACGCTCTC 240
4371      -----CTAATTCGTTGAATCCATATGGCAGAATTACAGTGAATGGACGCTCTC 50

```

ES 2 683 039 T3

```
*****
4254 TTACTTTTTAGGCTTAAAAACACATTAAGATCAATTAATTTAAGGAATAAGCAAAT 300
4275 TTACTTTTTAGGCTTAAAAACACATTAAGATCAATTAATTTAAGGAATAAGCAAAT 300
4371 TTACTTTTTAGGCTTAAAAACACATTAAGATCAATTAATTTAAGGAATAAGCAAAT 110
*****

4254 AAAATTACTCCGGCGTTCAGATATTGGAATATAGAATAATGTAACATTTAAATAAGGC 360
4275 AAAATTACTCCGGCGTTCAGATATTGGAATATAGAATAATGTAACATTTAAATAAGGC 360
4371 AAAATTACTCCGGCGTTCAGATATTGGAATATAGAATAATGTAACATTTAAATAAGGC 170
*****

4254 CTAATTTTATCAATTATCAAGACATATGTATATACATGATTGATGCAAAAAGGTATTCAT 420
4275 CTAATTTTATCAATTATCAAGACATATGTATATACATGATTGATGCAAAAAGGTATTCAT 420
4371 CTAATTTTATCAATTATCAAGACATATGTATATACATGATTGATGCAAAAAGGTATTCAT 230
*****

4254 TTTAATAATGCAGGAAAAACTACAGCTAAACAACAACGTAATCAATTCCTACTTGGTA 480
4275 TTTAATAATGCAGGAAAAACTACAGCTAAACAACAACGTAATCAATTCCTACTTGGTA 480
4371 TTTAATAATGCAGGAAAAACTACAGCTAAACAACAACGTAATCAATTCCTACTTGGTA 290
*****

4254 TTTCTTCGTTCCCTTTAACATTTTTTCATAACAGTAGGTTTTCAATATTTTATGATGTA 540
4275 TTTCTTCGTTCCCTTTAACATTTTTTCATAACAGTAGGTTTTCAATATTTTATGATGTA 540
4371 TTTCTTCGTTCCCTTTAACATTTTTTCATAACAGTAGGTTTTCAATATTTTATGATGTA 350
*****

4254 ATGAAAAATGTACGGTTCCGTGGCAAGCTTAACTTGCCATTCTTGAACAATTTAATC 600
4275 ATGAAAAATGTACGGTTCCGTGGCAAGCTTAACTTGCCATTCTTGAACAATTTAATC 600
4371 ATGAAAAATGTACGGTTCCGTGGCAAGCTTAACTTGCCATTCTTGAACAATTTAATC 410
*****

4254 TAATAATTTTTCATTATCTAAGGCGTCAATTTAAATGGCAAAGTATTAATATTCTTGATG 660
4275 TAATAATTTTTCATTATCTAAGGCGTCAATTTAAATGGCAAAGTATTAATATTCTTGATG 660
4371 TAATAATTTTTCATTATCTAAGGCGTCAATTTAAATGGCAAAGTATTAATATTCTTGATG 470
*****

4254 GTTGCCTAAATTTAGAAATAAACACTGAATGCTATTAAGGAAAGTTGAGGTAAAAG 720
4275 GTTGCCTAAATTTAGAAATAAACACTGAATGCTATTAAGGAAAGTTGAGGTAAAAG 720
4371 GTTGCCTAAATTTAGAAATAAACACTGAATGCTATTAAGGAAAGTTGAGGTAAAAG 530
*****

4254 TTTTGTTAAATCCACATATGTTGGAATATCGTCATCAAAAATAAATGTGCTGTAAT 780
4275 TTTTGTTAAATCCACATATGTTGGAATATCGTCATCAAAAATAAATGTGCTGTAAT 780
4371 TTTTGTTAAATCCACATATGTTGGAATATCGTCATCAAAAATAAATGTGCTGTAAT 590
*****

4254 TAATATGTTTATCGTTTGTAAAATAAATAAATTAAGTAACTGTAATGGGTGT 840
4275 TAATATGTTTATCGTTTGTAAAATAAATAAATTAAGTAACTGTAATGGGTGT 840
4371 TAATATGTTTATCGTTTGTAAAATAAATAAATTAAGTAACTGTAATGGGTGT 650
*****

4254 ACTCAATCGTTGGATTAGAAATTGAAAGCGGAGGCAAATATAATTTTCGGTGTGGGTA 900
4275 ACTCAATCGTTGGATTAGAAATTGAAAGCGGAGGCAAATATAATTTTCGGTGTGGGTA 900
4371 ACTCAATCGTTGGATTAGAAATTGAAAGCGGAGGCAAATATAATTTTCGGTGTGGGTA 710
*****

4254 AGTGTTACAATCGAACAGTTTTAAATTAGAATAAATAAATATATGAAAATGCATTA 960
4275 AGTGTTACAATCGAACAGTTTTAAATTAGAATAAATAAATATATGAAAATGCATTA 960
4371 AGTGTTACAATCGAACAGTTTTAAATTAGAATAAATAAATATATGAAAATGCATTA 770
*****

4254 ATCAAAAATATCCATGATTAATCATATTTAAATGTAGAAATTAATAACACTAAAATAT 1020
4275 ATCAAAAATATCCATGATTAATCATATTTAAATGTAGAAATTAATAACACTAAAATAT 1020
4371 ATCAAAAATATCCATGATTAATCATATTTAAATGTAGAAATTAATAACACTAAAATAT 830
*****

4254 TTTGGTAAATTAAGACACTATCAAAAACCGAAAAAGTAGGCTAGCTTTCTATGTCAA 1080
4275 TTTGGTAAATTAAGACACTATCAAAAACCGAAAAAGTAGGCTAGCTTTCTATGTCAA 1080
```

ES 2 683 039 T3

```

4371   TTTGGTAAATTAAGACACTATCAAAAACTCGAAAAAGTAGGCTAGCTTTCTATGTCAA 890
*****

4254   GGCGCCATTTTTAAAGAACAATAGATCTAGAAATACTGCAGAGTCCGAAAATTTTGAA 1140
4275   GGCGCCATTTTTAAAGAACAATAGATCTAGAAATACTGCAGAGTCCGAAAATTTTGAA 1140
4371   GGCGCCATTTTTAAAGAACAATAGATCTAGAAATACTGCAGAGTCCGAAAATTTTGAA 950
*****

4254   TTTATTTTATAAATATAAACTAAATTAATCCACTAG----- 1178
4275   TTTATTTTATAAATATAAACTAAATTAATCCACTAG----- 1178
4371   TTTATTTTATAAATATAAACTAAATTAATCCACTAGTATGAATACAAGTGAAGAAGAA 1010
*****

4254   -----
4275   -----
4371   TTTTCGAATTCGATGCGTGGCTATCCGAGCAACTGTTTGCTMATAAAGAATTAAT 1070

4254   -----
4275   -----
4371   TCAGATTATAGAGAAAAGTCGGTTGGTGATGCATCGACMACATTGTATTTCCTCCGGT 1130

4254   -----
4275   -----
4371   AGTCTCAGCTGTTGCTGAAGGAGAACCTCAGACTTAACAAAATCAGACTTGAAAAC 1190

4254   -----
4275   -----
4371   TACGAGCCTGTTTCAAATATCTACACCACTAATATATCTTCTTCGATCTGAACGAT 1250

4254   -----
4275   -----
4371   GTGTTGGATTAACATAATTAATCTGGCAGATGTAACGATTGAGCGCTGCTGGATTGGTT 1310

4254   -----
4275   -----
4371   GGGACAGTTCATTAACTCCATTGTAACTCCCGTTCCTGAGACAACATTAATGGTAAAT 1370

4254   -----
4275   -----
4371   GAGACAGTGAAACAACGGCTGAATCATCCTTTGATGTAACAGAAGAGGAATTAAGCTT 1430

4254   -----
4275   -----
4371   TTGAAATTTTGGAGTACAGCCACTACTAATCAGTTTGGTGTGATTGTATATCGGAT 1490

4254   -----
4275   -----
4371   ATACTTAATAATATCTAATTTCTTGATCTTTTCAGACACAAAATCATATGTTCAAAGTGA 1550

4254   -----
4275   -----
4371   GGTTTCACCCACTCCATATCGTATTGTCAAGTGTCAAATTGCAATGTTCTCTTTGATT 1610

4254   -----
4275   -----
4371   AATGTCTTCCAAACACATATTGTGATTATGACGAACACCACAATCTAATTGCTCCACC 1670

4254   -----
4275   -----
4371   AATAACATCAACACCTCTCAGCAACCAATAAAGAGAACCATTACTACCAGTAGAAC 1730

4254   -----
4275   -----
4371   TGCATGTATTCGTTTATTGCGTGAAAATCAAATTCGAATCCGACGACCTAGCTCG 1785

```

LISTA DE SECUENCIAS

[0276]

- <110> Oxitec Ltd
- 5 <120> Biocontrol
- <130> PN505473WO
- <160> 56
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

ES 2 683 039 T3

<211> 1859
 <212> DNA
 <213> Ceratitis capitata

<400> 1

atattttgaa aagattttag tcagacggga acgtgttaaa aattagtttt tcaaattgca	60
taacttatcc aaggatcagt aaccaactat aatatttaaa gtgtgaatgg aaattcacag	120
tatcttcgac taaagaactg cagttggatc cgatagtaaa ttgagaagcg gcaaacctt	180
aagtaaagtc caaaactttt ttgttctaaa tacatacaaa ttttttagga catttcatac	240
cagtaggagc aggtaataag atactaacgg cgtatacgtata attaaatcgg gagataattt	300
aaaagatgcg cgaaattgtg catattcaag ctggacaatg tggcaaccag attggcggca	360
aatatttggga agttatatct gatgaacatt gcatcgtatc cacaggcact tactatggcg	420
atagtgattt gcagctggaa cgtattaatg tatactacaa tgaagcgaca ggtgctaaat	480
atgtacctcg tgctattctg gtggatttag agccaggcac catggactct gtacgttccg	540
gtgccttttg tcaaattttt cgtcctgata actttgtgtt tggacagtcg ggagcgggta	600
acaattgggc caaggtcat tatactgaag gagctgaatt ggttgactca gtactcgtg	660
ttgtaaggaa agagtctgaa ggatgtgatt gctacaggg atttcaatta acacattcgc	720
ttggcggcgg tacgggttcc ggcatgggaa cattgttaat atcgaaaatt cgggaggagt	780
accgggaccg gattatgaat accttttcgg tgggtgccctc cccaaaggta tccgacacag	840
tcgtggaacc ttataatgcc aactgagtg tacatcagct ggttgaaaat acggatgaaa	900
catattgcat cgacaatgaa gctctatatg acatattgctt tcgcacattg aaacttacta	960
ccccactta tggcgattta aatcatttag tctctgcaac aatgtccgga gttacgactt	1020
gcttacgatt tccgggtcaa cttaatgcag atttgcgtaa gttggctgtg aatatggtac	1080
catttccacg tttgcatttt tttatgccgg gtttcgctcc actgacttct cgtggctcgc	1140
agcagtatcg cgcacttaca gtgcctgaat tgacacaaca gatgtttgac gccagaaca	1200
tgatggctgc ttgcgatcct cgtcatggac ggtacttaac agtggcggcc atttttagag	1260
gtcgcgatgc tatgaaggag gttgacgaac aaatgctgaa tattcaaaac aaaaatagca	1320
5 gtttctttgt tgagtggatt ccaaataact gcaaaactgc tgtttgtgat attcctcctc	1380
gcgggtttaa aatgtcagcg acatttattg gcaattcaac agctatacaa gaattattca	1440
aacgagtttc tgagcagttc acagcaatgt tcaggcgcga agcttttttg cattgggata	1500
ctggcgaagg tatggatgaa atggagttca ccgaggctga aagtaatatg aatgatttag	1560
tatctgaata ccaacagtac caagaagcca ccgccgatga agagggcgag ttcgacgag	1620
atgaagaagg aggaggggat gaataacagt tcttggtttt tggagatggt aataggaaaa	1680
aatctctata tctttactta attaatatta ttatgcgctc ctcacaattg taaaatccaa	1740
ttgtagcttt ttgttactt ctcagcaagt attttgtatt atgtactatt tgcttttctt	1800
gtgcgcaagt atacgctttt agtaaaattt aaaataaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1859

<210> 2
 <211> 1870
 <212> DNA

ES 2 683 039 T3

<213> Drosophila melanogaster

<400> 2

```

ggaaatcgta gtagcctatt tgtgaacatt cgggtgtagta atccaagcca ggttcagttc      60
acctcagtat cagctagcac gtacacgact aaaatctaaa cctgaaaaat tatacgttta      120
aatattcagt cttttgccga tttttgcccc actcagactg ttttaaaagc tcgatttttt      180
tttgtaccat tttttcgggtg tgaaaaaggg ggcctactt tactatcaaa atgcggtgaaa      240
ttgtacacat tcaggccggt caatgcbggt accagatcgg tggtaaattc tgggaggtaa      300
tctcggatga gcactgtata gatgcbgacc gaacgtacta cggcgatagt gatctccagc      360
tggagcgcac caatgtatac tacaatgaag ccaccggtgc caagtatgtg ccacgcbcaa      420
ttctcgtgga cctggagccc ggcaccatgg attcggttcg ttctggcgc tttggccaga      480
tcttccgccc ggacaatfff gtgtttggcc aatcgggagc aggcaacaac tgggccaag      540
gtcattacac cgagggtgct gaactgggtg attcctgctt ggatgtggtg cgaaaggagt      600
ccgagggatg cgattgcctt cagggcttcc agtcgacca ctcbgctgggt ggcggcactg      660
gctccggcat gggaaacctg ctgatctcga agatccgcbg gagtaccbb gaccgcbtca      720
tgaacacctt ctcbggtggt ccctcbgcca aggtgtcbga tacbggtggtg gagccctaca      780
atgccacctt gagtgtgcat cbgctgggtg agaacaccga tgagacgtac tgbatcbgca      840
acgagggcgt gtatgacatc tgbttcbgca cactgaagct gaccacgccc acctacgggt      900
acctgaacca tctggtttcg gccaccatgt ctgggtgtgac gacctgcbt gcbttcbctg      960
gccagctgaa cbctgatctt cbgaagctgg cbgtgaacat ggtacccttc ccccbgctgc      1020
acttcttcat gcccggattc gcbcbgctca cctcbgcbggb atcbgaacaa taccbggccc      1080
ttaccgttcc ggagctgacc cbgcbgatgt tcbgatcbca gaacatgatg gctgcbgtcbg      1140
atccccgaca tggctcbtat ctgaccgtcb cbgcbatctt cbgtggcbgc atgtcbatga      1200
aggaggtgga cbgcbgatg ctcaacattc agaacaagaa cbgcbgcttc tctggtggaat      1260
ggatcccbgaa taactgcaag acagcbggtg gcbgatattc gcccbagaggt ctcaagatgt      1320
cbgcbacctt cattggcaac tccaccgcca ttcagbgat attcaaacbg gtttcbgagc      1380
agttcaccgc catgttcbga aggaagcbct tcttgcbttg gtacaccbgc gagggaatgg      1440
acgaaatgga attcacagag gccgagagca acatgaacga cttggtttct gaatatcaac      1500
agtaccagga ggcgactgcb gatgagbgag gcbgaattcbga tgaagacgaa gaggggtgcbg      1560
gcbgatgaaata atagbatta ctcccbctc aagatcbacac atgaacacca aaacaggbcta      1620
gcbggggaac ccattaggaa gcbcaatac attgbatctt tgggcbttag catattgtgc      1680
ttcbgagccc gtcbggtgta catatttcbt atatgbattc ttcactgttc gattatttat      1740
cattcacaca cbtcbgagaa aattatgtcb actttgttaa gctcbatgtt caattgcbt      1800
gatttctbgg ttacgaataa atgttgattt ataagcbgac aagattacca acagcbtttt      1860
gcbatattttt

```

5 <210> 3
 <211> 2128
 <212> DNA

ES 2 683 039 T3

<213> Aedes aegypti

<400> 3

cgccaaat	ttg	atag	ttta	tgcaaagg	ac	ttgcat	gttt	ccc	ta	atgt	gggg	gt	gaat	60															
ca	gct	at	gt	tctt	gt	ggct	cat	at	at	at	cg	ttt	gt	ttc	g	ac	gt	gg	t	cat	120								
tt	tt	at	g	aa	ttt	c	ac	gt	t	ct	tt	at	g	at	ctt	tc	gc	ac	aaaa	ttt	t	ca	aa	tt	180				
tt	g	at	g	ca	c	g	t	g	at	g	ctt	t	cc	ac	cc	ac	g	ac	ca	aa	cc	ac	g	ac	g	g	ca	tt	240
at	g	g	ac	ag	cc	ca	ac	gt	ga	ca	ac	ag	ctt	cg	aa	gc	at	cc	ag	ta	gc	ac	at	g	tt	g	300		
aa	cg	cg	tc	gc	tccc	gt	ttt	g	ggg	gcc	ata	ctg	cc	cc	ac	aat	g	taa	atc	aat	ca	ca	g	tt	g	360			
tg	t	ca	t	g	g	aa	gg	aa	gg	ac	g	ac	g	tt	g	aaa	at	ttt	tc	420									
ac	tt	cg	at	tt	tc	acc	ac	cg	g	ga	g	ga	cg	t	g	aa	cc	at	t	ct	g	tt	cc	at	ctt	480			
ca	ag	ca	tc	cg	aaga	ag	ca	ta	ttt	g	aa	gc	ca	at	ttt	g	ac	cg	ta	g	aa	gt	g	cc	ag	540			
at	g	cg	t	g	aa	tc	g	at	ca	ca	t	ca	ag	cc	gg	ca	at	g	t	g	g	ca	ac	ca	g	tt	600		
t	g	g	g	ag	g	ta	a	t	cc	g	ac	g	a	tc	g	at	g	cc	ac	cg	gg	g	ct	at	t	g	660		
g	at	tt	g	ca	g	c	g	g	at	ca	ac	g	g	at	ca	ac	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	720		
cc	ac	g	t	g	cc	g	cg	tg	ct	g	g	tc	ga	tt	g	g	aa	cc	gg	ca	ct	at	g	g	at	g	780		
tt	t	g	g	ac	ag	c	g	tt	cc	gg	cc	gg	ata	at	ttt	g	tg	tt	cg	gc	aat	ct	g	g	cg	c	840		
t	g	g	g	cc	aa	gg	g	ac	att	ata	c	ga	ag	gg	gg	cc	ga	act	g	g	tt	cg	at	tc	g	t	900		
cg	ta	aa	ga	at	cc	ga	ag	g	ct	g	cg	at	t	g	t	ct	g	ag	gg	ct	tc	ag	tt	g	ac	ac	960		
tt	cg	ct	gg	gt																									

ES 2 683 039 T3

ggaggaaccg gttctggtaa gattttgggc aggtattagg ttatctttgt attaaccggt	1020
gttccttatt caggaatggg aacgctgctg atttcgaaga ttcgagaaga gtatccagat	1080
cgtattatga acacatthtc tgcgcttccct tcgccgaagg tgtctgacac cgtggttgag	1140
ccgtacaacg caacgttaag tgttcaccag ttggttgaga acacggacga atcctactgc	1200
atcgacaatg aggccctgta cgacatttgc ttccgaacgt taaaactaac aaccccaact	1260
tacggcgatt tgaaccatct tgtttcggca acgatgtccg gcgttaccac gtgtttgcgt	1320
tttctggtc agttgaatgc agatctccgt aaattggcag tcaatatggt tccattcccg	1380
cggctgcact ttttcatgac cggcttcgca ccgctgactt cccgaggatc gcagcaatac	1440
cgtgccctta ctgttccgga gctgacccaa cagatgttcg atgcgaagaa catgatggcc	1500
gcatgtgatc cacgacacgg tcgataccta acggtggccg ctatattccg cggacggatg	1560
tccatgaagg aggtcgacga gcagatgttg aacattcaaa gcaaaaatag tagctacttc	1620
gtcgaatgga tcccgaacaa tgtgaagacg gccgtctcgg acattccgcc gcgtggtttg	1680
aaaatgtcgt caacctttat cgttaactcg acggccattc aggagattht caaacgtatt	1740
gctgaacaat ttaccgctat gttccgaagg aaagctttcc tgcattggta cacgggacga	1800
ggcatggacg agatggagtt caccgaagcc gagagcaata tgaatgatct ggtgtcggag	1860
taccagcagt accaggaagc gacggccgac gaggaaggag aattcgacga agaagaggag	1920
ggtggcgagg aatagagaag gaataaaaat ggctgaaatt atccgttatc atactgtgaa	1980
ttgaagatcc tattgttgta attgctgaaa taaaatcttg tttcctaatt tgtatctgta	2040
ttatthttgc aatthctgth tttcatcacg tcaatcacgc atgaaaatth tactthtctg	2100
cacagaagta tgcagtgtcg taagagtg	2128
<210> 4	
<211> 3049	
<212> DNA	
5 <213> Bactrocera dorsalis	
<400> 4	
acaagacaaa tgctattcca tatacctgca gctattgttc ataataaggg atgcatatag	60
caatacaaat acaacttaat actactthtg taacaatata taacccttca ccagagtcga	120
ttactthttac cataagtgat acaacaacc gttaaagcga caaaactact ctgtagcaac	180
atgthgcaag agtataaaaa tatactaggg ggattatctt gctcttgcaa gattgcagat	240
tccaaaaagc ctatacctaa atatacaagg gcacgggagc acccatagca gaatctagtg	300
atatatgaac gactgattcg gtcaatthtatt tgtaaattgac taatgtgcat ggctattatg	360
aattggcgaac cctthctgcat tcattctcga caaaaaaaa ctthtaacaaa tctthtataat	420
ttaaaaaata aattataaaa tctatthtaa atthaccttc ctthcataaaa ttatthtacia	480

ES 2 683 039 T3

cggacatcaa attgtttttc agccgtggta aaagaatcag attatttata accagaaaaa 540
 tacttagagt gtgaaatatg attttgtttt tcgtaaaaat aaatgttatt taaataacaa 600
 taattacttt gcaaaaaaac actatcttgt ttctactatt ttgtggtagt aacgtatctt 660
 ttaaaactca atcaatagat cgttttttca gaattttttc acacaaaaa tattttgaaa 720
 agattttagt cagaggagag cgtattaaaa attagatttt tatttaaatt gcgaaactgg 780
 tccagtgatc aatataata tcgaaagtgt actaagaaaa cgtgtactaa gagccctgca 840
 attttcaact actaattcat acgctcgtct taaattaaat ctaatcttcg tttccaacca 900
 atccaatatt atttgctctc tagtaattta taattgataa caattaccgt agcagtatag 960
 gctcatagtt ttcagacttt aagtgttaaa ggcaatttga aaaatgcgcg aaatcgtaca 1020
 tatacaggcc ggacaatgtg gcaatcagat tggcggtaaa ttttggaag tgatatctga 1080
 tgaacattgc attgatgcca ccggcactta ttatggcgat agcgacttac aactagaacg 1140
 tattaatgtg tattataatg aagctactgg tgccaaatat gtacctcgtg ccattttggt 1200
 cgatttagaa ccgggcacta tggactcggg acgttctggg gctttcgggc aaatcttccg 1260
 tccgataat tttgtatttg gtcagtcagg agcgggtaat aattgggcca agggccatta 1320
 tacagaaggc gcagaactgg tcgactccgt acttgatggt gtacgcaaag agtctgaagg 1380
 atgtgattgt ctacaggtgt cgaattaaat gaaccgcata tatttgagta tggtaaagac 1440
 gtaacaattt tatttattta tagggatttc agttaacgca ttctcttggg ggcggcacag 1500
 gctctggcat gggcacacta ttgatatcga aaattcgtga agaatacct gatcgtatta 1560
 tgaatacatt ttctgtagt cctcgccea aagtatccga tactgtggtg gagccataca 1620
 atgctacgct cagtgtacat cagctggtag aaaacactga cgaaacatac tgcacgaca 1680
 atgaagctct atacgacatc tgtttccgta cattaaagct aactacgcca acctatggtg 1740
 acctaaatca tctggtatct gcaacaatgt ctggagtaac aacatgttta cgctttcctg 1800
 gtcagctaaa tgcagatctg cgaaagtgg ctgtgaatat ggttccattt cctcgtttac 1860
 atttctttat gcctggtttc gctcccttga cctctcgtgg ttcgcaacag tatcgtgcac 1920
 ttaccgtacc tgaattaacg caacagatgt ttgacgctaa gaacatgatg gctgcttgcg 1980
 atccgcgtca tggcgggtat ttaacgtag ccgctatatt tagagggcgt atgtcaatga 2040
 aggaagtgga cgaacaaatg ctgaatattc aaaataaaaa cagcagcttc tttgtggaat 2100
 ggatcccaa taactgcaaa acagctgttt gtgacatacc tccacgtggc ttaaaaatgt 2160
 ccgccacatt tattggaaat tcaacagcga ttcaggaatt gtttaaacga gtttccgaac 2220
 aattcacggc catgtttagg cgtaaagctt ttttgcttg gtacaccggg gagggtatgg 2280
 atgagatgga gtttaccgaa gcagagagca acatgaacga tttggtatcg gaataccaac 2340

ES 2 683 039 T3

aatatcaaga agcgaccgct gatgaagagg gagaattcga cgaggatgaa gaaggaggtg	2400
gagatgaata acagttccat cagacgtaga gatgatagct aatgtgtcta attcatgagt	2460
tttgctaaat tttactttg ggcgcagaat gcaattgtaa aattggattg tagcatactt	2520
aatttctaatt ttaccctca gtcagcactt tgtgttcata tataatattt gattcctctc	2580
tgctgtatac acgcatttca gtggaattta tttttcttgc aatctttttg aataacttgt	2640
caatagaacg aaactaaata cacaaatag tctagaccaa attaaaaaaaa taaacagatt	2700
ttgaattttg tgagggcaaa cattacttgc tatatagtgg atgtgtatat tgtaaatcaa	2760
aattaccgca atcgaactga attgagtttc tgagtgtgac aacagtttga aacactaact	2820
tacattttat gcgcatattg aaccactatt tttgttttag cgccataaaa ttcaataaaa	2880
aacaggaaaa aagtaaactt cgattgcac aggtacctt attagctgca tttcttagat	2940
taattttttg tttactaaa tctgaaaacg taactgagca acgttatata tattatata	3000
tatgaaggtc tttgtttcaa accttagttt taaatggtg ttttatgcc	3049
<210> 5	
<211> 4476	
<212> DNA	
5 <213> <i>Anastrepha suspensa</i>	
<400> 5	
cgatcgggtga acgtctgaat aaattcgcgt cagtaataat acgtcgcgcg aaacggtata	60
tgcactgcag ccaaaccgag gcaacggaaa tgaatcttat gttggcaacg ggcatgctat	120
catccatcgt tataaccact ggcgcagcag tcttttcacg ctacgagggc tggagttatt	180
tcgacagttt ctattactgc tttgtgacgc tcacaacat cggtctcggg gactatgtgg	240
cgttgcaaaa cgatcaggcg ctgatcaata aaccgggcta tgtggcgctc agtttggtgt	300
ttatactatt tgggctggcg gtggttgccg ccagtatcaa tctgctagta ctgcgcttca	360
tgacaatgta atgggaaaga aagttccgca tgcgtgagtc accacatccc taggaagtgg	420
tgaatctgta cagtgcact tgggcgccgt tatgtgatga gcgacaatga cggtcgatga	480
ttataataa cgggtgctgc gtgtcgagtt gcagcttatt gcattatttt aatcagttat	540
gttttgataa aatactaaat aaacaactac ttatttttta ggcaagccga agacgccaaag	600
cgtaacgaac aggatgctca acaagccgca gccgcagctg ctgctctctc caatcaacaa	660
ctcgcgtatg atgtcgagtc tagtaatttc aatgtgcacg gcaaattggt ggctaactca	720
cattatacga cagagtacga cgaaaccgta tcaatctggt catgcacatg cctcggcgga	780
acaaggtgcc tcaatcatga gacgttcgcc gatcctgatt ttcggccaac tgatatcatt	840
gagagtatct cgagtctgaa gcgtgcgtca gtttgatata tgtgtactcc catggtgtag	900
gaaaagaagt gttgctgtga ttgcctgaaa acattgtaaa gcacaattta cccggacaag	960

ES 2 683 039 T3

taagggtgttc gtacgcgcat acataactaac ataactggcgt acgtacatat tcatggataa 1020
 gtgcattcct tgtacttcca tatttatgca ggtacatact tagtttcata cgagatgtcc 1080
 acgctttata gaacttagtt tattgaattg tatacatatt tatggatgtg tgtacgaaca 1140
 tgtgcccata aaaaagatta atttaaacct ccaaatccg aatgatgggt aagaggaact 1200
 tctaactac acctcgcgtg tataatgatg agaatgattc cgagattggc tattttcca 1260
 cccacaattg gaatcactta gccccctatt gaaaatcaat gtataagggtg taacataaaa 1320
 tatgcatgat aaataaaata ctactccatt ttaataaaaa tactactcca tgcgtatgta 1380
 cataaacacc tatagtcgct taccaaaata gtttcacaaa ataatttaa tacttgaaga 1440
 attagaggaa tagattgtag aagttgaagc tactttaaat aaaataagtc aaaagaaaag 1500
 tgttcatata aacgctcaag gttttatgca tttactgaaa tacagtaaac tcatatctat 1560
 aacttatgta tgtatgtaca tatgtacaac acctatttga atagtatgtc ttttgaaga 1620
 tatacatatg tacgcgaatg ctgacacagt gcgtaacttc aaaagcaaat caatcagtac 1680
 tttgggcccg aagcactccc actctcatac atggttgcta gtcgcagtaa cttagctctg 1740
 agaattcaat aaaatttcag aatattttca ccttaaacat atttcgaaa gattttagtc 1800
 agacgattgg atttttaaat tgcaaaaata cgtccaaaag ataagttatc aattgttctg 1860
 acagtaaatt gctaaacgga aaaagaggtc tagtcgacac gatcgtctgc actagaaatt 1920
 ttaattttct ttgctttaca accaatagaa ttttcagcaa ctgataggtc ctgtttttag 1980
 tagcacacac ggtgtgagcta actctttaat tctaaaaaca gcagcaacag cgacattttc 2040
 aaaccaatcc taaaaaccaa taatttttg agtgtgtgta gttggcgtgc agtaagcttt 2100
 agcggaaaca ttacaatatg cgcgaaatag tacatattca agctgggcaa tgtggcaatc 2160
 agattggtgg aaagttttgg gaagtgatat ctgacgaaca ttgcatcgat gctacaggca 2220
 cctattatgg tgatagcgat ttgcaactag aacgcattaa cgtctactat aatgaagcga 2280
 ctggtgccaa atatgtacct cgtgccattc ttgtcgactt ggagccgggc accatggact 2340
 cggtagcctc tggcgccttc ggacaaatct ttcggccaga caacttcgtg tttggacagt 2400
 caggcgcggg caataattgg gctaaaggcc attacacaga aggcgctgaa ttggtcgatt 2460
 cagtccttga tgtggtaagg aaagagtctg aaggatgtga ttgcttacag gtgtgtattt 2520
 acatacatat gtattaaaa aaaaaaact tttttttttt aatttctagg ggtttcagtt 2580
 aacgcattcc cttgggggtg gtacgggctc cggcatgggc acgttgttga tatcgaaaat 2640
 tcgagaagag tatccagacc gtattatgaa cacattttca gtggtacctt cgccaaaggt 2700
 gtcggatact gtcgtagaac catataatgc cacacttagc gtccatcagc tagtggaaaa 2760
 tactgatgag acatactgta tcgacaacga ggtctctat gatatttgc tccgaacact 2820
 caaactaact acgcccactt atggcgatct taatcatttg gtttcggcaa caatgtctgg 2880

ES 2 683 039 T3

tgttacgaca tgccttcgct ttcttgcca gcttaatgca gatcttcgga agttggctgt	2940
gaatatggtg ccattcccac gattgcattt ctttatgcct ggattogctc cgttgacttc	3000
gcgtggttcg caacaatata gtgcattaac tgtgcccga ctaacgcaac aaatggtcga	3060
cgctaaaaat atgatggctg cttgcgaccc acgtcatggt cgttacttga ctgtggcagc	3120
tatctttcga ggacgtatgt ctatgaagga agttgacgaa caaatgctga atatccaaaa	3180
caaaaatagc agtttcttcg tagaatggat cccgaacaat tgcaaaacag cggtatgcca	3240
cattcctccg cgtggcctaa agatgtcagc tacattcatt ggcaattcta ctgcgattca	3300
ggaattattc aaaagagttt cagaacaatt tacggcaatg tttaggcgca aagctttttt	3360
gcattggtac accggtgaag gtatggacga gatggaattt accgaggctg aaagcaatat	3420
gaatgatttg gtatcggaat atcagcagta ccaagaagca actgctgatg aagagggaga	3480
attcgacgag gacgaggaag gaggaggcga cgaataaagc tgcatcatat caactgatac	3540
cagccagacg ctgcatcttg tggccactaa atcgtaaatt tcgattgtag catgattagt	3600
ttttaattta caccacaacg agtaacgtat gttatgctat tgatttcatt cccttctcac	3660
tctatgtaat gcgtacgctt tttagtgaat ttatthttaa aacaaatctt tttgaataga	3720
ttttctataa aaaattaaaa tacaaggaat tgtgtctgga caaaatttgc gatattagaa	3780
aaagttgttt gcttactoga caatttaagt aggacttata acgatataac ttgtcgctat	3840
ctggtgttca tcaaggagca tcaccgagcc ccaggattac ctcgatthtt atctgtagct	3900
cggcattac cgcacgtaat cagagcctaa agctgggact aactctaatt ctcatthttg	3960
aacaacctaa tctacatccc gctctgactc cgtgtgaatt tcaaatagtc gtgtgtcaag	4020
taagataata ccggaatgca accacattca tcaactacaa ctgcatccct acagcagccg	4080
gttctacgct accggaatgc ctctggthtt tcccgaccaa gggctgccgc cccagtaaac	4140
tagccctgtc tagggagcct gcgcaccacc ggcgagagga caactgactc cgthtcccc	4200
tgctgcccag ccctgcaactc gcaaccgacc cctgtggtgc gaccgcccac caccatcaga	4260
ccgcaacaac aacagcggaa cgcacagcag gcccaacgta gacaaccaca cgcgtccctc	4320
acaccccgat ttacaacagy cctaaagaga aacttcaacc aagctgcacg ctagctgttc	4380
cctgataacc agcgatgact ataacatgca cagcgttcat agtccaccac acagtgcagt	4440
atcgtctgat cccgaacaat tgcaaaacag cggtat	4476
<210> 6	
<211> 309	
<212> DNA	
5 <213> Ceratitis capitata	
<400> 6	
atathttgaa aagathtttag tcagacggga acgtgttaaa aattagthtt tcaaatgca	60
taacttatcc aaggatcagt aaccaactat aatathttaa gtgtgaatgg aaattcacag	120
tatcttcgac taaagaactg cagttggatc cgatagtaaa ttgagaagcg gcaaacctt	180
aagtaaagtc caaaactthtt ttgttctaaa tacatacaaa thttthtagga catttcatac	240
cagtaggagc aggtataaag atactaacgg cgtatacgtata attaaatcgg gagataattt	300
aaaagatgc	309

ES 2 683 039 T3

<210> 7
 <211> 232
 <212> DNA
 <213> Drosophila melanogaster

5 <400> 7
 ggaaatcgta gtagcctatt tgtgaacatt cgggtgtagta atccaagcca ggttcagttc 60
 acctcagtat cagctagcac gtacacgact aaaatctaaa cctgaaaaat tatacgttta 120
 aatattcagt cttttgccga tttttgcccc actcagactg ttttaaaagc tcgatttttt 180
 tttgtaccat tttttcggtg tgaaaaaggg ggccctactt tactatcaaa at 232

<210> 8
 <211> 1008
 <212> DNA
 10 <213> Bactrocera dorsalis

<400> 8
 acaagacaaa tgctattcca tatacctgca gctattgttc ataataaggg atgcatatag 60
 caatacaaat acaacttaat actacttttg taacaatata taacccttca ccagagtcga 120
 ttacttttac cataagtgat acaacaacc gttaagcgaa caaaactact ctgtagcaac 180
 atgttgcaag agtataaaaa tatactaggg ggattatctt gctcttgcaa gattgcagat 240
 tccaaaaagc ctatacctaa atatacaagg gcacgggagc acccatagca gaatctagtg 300
 atatatgaac gactgattcg gtcaatztat tgtaaatgac taatgtgcat ggctattatg 360
 aattggcgaa ccttctgcat tcattctcga caaaaaaaaa cttaacaaa tctttataat 420
 ttaaaaaata aattataaaa tctatttaaa atttaccttc cttcataaaa ttatttacia 480
 cggacatcaa attgtttttc agccgtggta aaagaatcag attatttata accagaaaaa 540
 tacttagagt gtgaaatatg attttgtttt tcgtaaaaat aatgttatt taaataacaa 600
 taattacttt gcaaaaaaac actatcttgt ttctactatt ttgtgtagt aacgtatctt 660
 ttaaaactca atcaatagat cgttttttca gaattttttc acacaaaaca tattttgaaa 720
 agattttagt cagaggagag cgtattaaaa attagatfff tatttaaaatt gcgaaactgg 780
 tccagtgatc aaatataata tcgaaagtgt actaagaaaa cgtgtactaa gagccctgca 840
 attttcactt actaattcat acgctcgtct taaattaaat ctaatcttcg tttccaacca 900
 atccaatatt atttgctct tagtaattta taattgataa caattaccgt agcagtatag 960
 gctcatagtt ttcagacttt aagtgttaaa ggcaatttga aaaatgcg 1008

<210> 9
 15 <211> 541
 <212> DNA
 <213> Aedes aegypti

<400> 9

ES 2 683 039 T3

cgccaaat	ttgata	tttatt	tgcaagg	acatg	tttcc	ctaat	gtggg	gtgaat	60
cacgctat	gttctt	gtggct	catatat	cgcttt	gtttcg	tccataa	accac	gtgggt	120
tttttat	gaa	ttttcac	gcttct	ttatg	atcttt	cgtc	cacacaaa	ttttcaa	180
ttgtatg	cac	cgtgat	gctt	gagcag	tacc	cttctcc	acc	cacgtgg	240
atggacag	cc	ccaacg	tga	caacag	actt	cgaagc	gaat	gcatcc	300
aacgcg	tc	gctt	gggccc	ata	ctgcc	ccac	aatgtaa	aatcac	360
tgatcat	g	ggccat	cctt	cttctt	gacg	acccgg	agga	cgacag	420
acttcg	at	tcaccac	cgga	ggaacg	cgga	cgtgat	ttgg	aaccatt	480
caagcat	c	ggaag	cata	ttttg	aagc	caat	tttgg	accgct	540
a									541
<210>	10								
<211>	2118								
<212>	DNA								
5 <213>	Anastrepha suspensa								
<400>	10								
cgatcgg	tga	acgtct	gaat	aaattc	gcgt	cagta	ataat	acgtcgc	60
tgactgc	cag	ccaaacc	gag	gcaacg	gaaa	tgaat	cttat	gttggca	120
catccat	cgt	tataacc	act	ggcgcag	cag	tctttt	cacg	ctacgag	180
tcgacag	ttt	ctattact	gc	tttgtg	acgc	tcaca	accat	cggcttc	240
cgttgca	aaa	cgatcag	gcg	ctgat	caata	aacc	gcgta	tgtggc	300
ttatact	tatt	tgggct	ggcg	gtagtt	gccg	ccagta	tcaa	tctgct	360
tgacaat	gta	atgggaa	aga	aagttc	cgca	tgcgt	gagtc	accacat	420
tgaatct	gta	cagtgac	act	tgggcg	ccgt	tatgt	gatga	gcgaca	480
ttataa	ataa	cggtgt	gcgc	gtgtcg	agtt	gcagc	ttatt	gcattat	540
gttttg	ataa	aatact	aaat	aaaca	actac	ttatt	tttta	ggcaag	600
cgtaac	gaac	aggatg	ctca	acaag	ccgca	gccgc	agctg	ctgcg	660
ctcgcg	tatg	atgtcg	agtc	tagta	at	aatgt	gcacg	gcaaatt	720
cattata	cga	cagagt	acga	cgaaac	cgta	tcaat	ctgtt	catgcac	780

ES 2 683 039 T3

	acaaggtgcc tcaatcatga gacgttcgcc gatcctgatt ttcggccaac tgatattcatt	840
	gagagtatct cgagctctgaa gcgtgcgtca gtttgatata tgtgtactcc catggtgtag	900
	gaaaagaagt gttgctgtga ttgcctgaaa acattgtaaa gcacaattta cccggacaag	960
	taaggtgttc gtacgcgcac acatactaac atactggcgt acgtacatat tcatggataa	1020
	gtgcattcct tgtacttcca tatttatgca ggtacatact tagtttcata cgagatgtcc	1080
	acgctttata gaacttagtt tattgaattg tatacatatt tatggatgtg tgtacgaaca	1140
	tgtgcccata aaaaagatta atttaaacct ccaaattccg aatgatggt aagaggaact	1200
	tctaattctac acctcgcgtg tataatgatg agaatgattc cgagattggc tattttccaa	1260
	cccacaattg gaactactta gcccctatt gaaaatcaat gtataagggtg taacataaaa	1320
	tatgcatgat aaataaata ctactccatt ttaataaaa tactactcca tgcgtatgta	1380
	cataaacacc tatagtcgct taccaaaaata gtttcacaaa ataatttaaa tacttgaaga	1440
	attagaggaa tagattgtag aagttgaagc tactttaaat aaaataagtc aaaagaaaag	1500
	tgttcatata aacgctcaag gttttatgca tttactgaaa tacagtaaac tcatatctat	1560
	aacttatgta tgtatgtaca tatgtacaac acctatttga atagtatgtc ttttgaaaga	1620
	tatacatatg tacgcgaatg ctgacacagt gcgtaacttc aaaagcaaat caatcagtac	1680
	tttgggcccg aagcactccc actctcatac atgggtgcta gtcgcagtaa cttagctctg	1740
	agaattcaat aaaatttcag aatattttca ccttaaacat atttcgaaaa gattttagtc	1800
	agacgattgg atttttaaata tgcaaaaata cggctcaaaag ataagttatc aattgttctg	1860
	acagtaaatt gctaaacgga aaaagaggtc tagtcgacac gatcgtctgc actagaaatt	1920
	ttaattttct ttgctttaca accaatagaa ttttcagcaa ctgataggtc ctgtttttag	1980
	tagcacacac ggggtgagcta actctttaat tctaaaaaca gcagcaacag cgacattttc	2040
	aaaccaatcc taaaaaccaa taaattttgg agtgtgtgta gttggcgtgc agtaagcttt	2100
	agcggaaaca ttacaata	2118
	<210> 11	
	<211> 213	
	<212> DNA	
5	<213> Ceratitis capitata	
	<400> 11	
	cagttcttgg tttttggaga tggtaatagg aaaaaatctc tatatcttta cttaattaat	60
	attattatgc gctcctcaca attgtaaaat ccaattgtag ctttttgttc acttctcagc	120
	aagtattttg tattatgtac tatttgcttt tcttgtgcgc aagtatacgc ttttagtaaa	180
	atttaaaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa	213
	<210> 12	
	<211> 299	
10	<212> DNA	
	<213> Drosophila melanogaster	
	<400> 12	

ES 2 683 039 T3

	taggattaac ttcccactca agatcacaca tgaacaccaa aacaggctag caggggaacc	60
	cattaggaag gcacaatata ttggatcttt gggccttagc atattgtgct tcgaggcccg	120
	tcggttgtac atatttcta tatggattct tcaactgtcg attatztatc attcacacac	180
	gtacagaaga attatgtcca ctttgtaag ctcatgttgc aattgctgtg atttctgggt	240
	tacgaataaa tgttgattta taagcagaca agattaccaa cagcattttg catatTTTT	299
	<210> 13	
	<211> 193	
	<212> DNA	
5	<213> <i>Bactrocera dorsalis</i>	
	<400> 13	
	agaaggaata aaaatggctg aaattatccg ttatcatact gtgaattgaa gatcctattg	60
	ttgtaattgc tgaataaaaa tcttgtttcc taatttztat ctgtattatt tttgcaattt	120
	ctgtttttca tcacgtcaat cagtcatgaa aattttactt tcctgcacag aagtatgcag	180
	tgtcgttaaga gtg	193
	<210> 14	
	<211> 638	
10	<212> DNA	
	<213> <i>Bactrocera dorsalis</i>	
	<400> 14	
	cagttccatc agacgtagag atgatagcta atgtgtctaa ttcatgagtt ttgctaaatt	60
	ttaactttgg ggcgagaatg caattgtaaa attggattgt agcatactta atttctaatt	120
	taccctcag tcagcacttt gtgttcatat ataatatattg attcctctct gctgtataca	180
	cgcatttcag tggaaatttat ttttcttgca atctttttga ataacttgtc aatagaacga	240
	aactaaatac acaaatatgt ctagacccaaa ttaaaaaaat aacagattt tgaattttgt	300
	gagggcaaac attacttctg atatagtgga tgtgtatatt gtaaatcaaa attaccgcaa	360
	tcgaactgaa ttgagtttct gagtgggtgca acagtttgaa aactaactt acatTTTTg	420
	cggatattga accactattt ttgttttagc gccataaaat tcaataaaaa acaggaaaaa	480
	agtaaacttc gattgcatca ggtaccttta ttagctgcat ttcttagatt aattttttgt	540
	ttaactaaat ctgaaaacgt aactgagcaa cgttatatat attatatatt atgaaggtct	600
	ttgtttcaaa ccttagtttt aaatggttgt tttatgcc	638
	<210> 15	
15	<211> 959	
	<212> DNA	
	<213> <i>Anastrepha suspensa</i>	
	<400> 15	

ES 2 683 039 T3

```

agctgcatca tatcaactga taccagccag acgctgcatc ttgtggccac taaatcgtaa      60
atctcgattg tagcatgatt agtttttaat ttacaccaca acgagtaacg tatgttatgc      120
tattgatttc attcccttct cactctatgt aatgcgtacg ctttttagtg aatttathtt      180
taaaacaaat ctttttgaat agattttcta taaaaaatta aaatacaagg aattgtgtct      240
ggacaaaatt tgcgatatta gaaaagttg tttgcttact cgacaattta agtaggactt      300
ataacgatat aacttgctgc tatctgttgt tcatcaagga gcatcaccga gccccaggat      360
tacctcgtat tttatctgta gctcgcgcat taccgcacgt aatcagagcc taaagctggg      420
actaactcta attctcattt tgcaacaacc taatctacat cccgctctga ctccgtgtga      480
atctcaaata gtcgtgtgtc aagtaagata ataccggaat gcaaccacat tcatcaacta      540
caactgcatc cctacagcag ccggttctac gttaccggaa tgcctctggt ttttcccgac      600
caagggctgc cgccccagta aactagccct gtctagggag cctgcgcacc accggcgaga      660
ggacaactga ctccgttgcc ccctgctgcc gagccctgca ctcgcaaccg acccctgtgg      720
tgcgaccgcc caccaccatc agaccgcaac aacaacagcg gaacgcacag caggccaac      780
gtagacaacc acacgcgtcc ctcacacccc gatttacaac agycctaaag agaaacttca      840
accaagctgc acgctagctg ttccctgata accagcgatg actataacat gcacagcgtt      900
catagtccac cacacagtgc agtatcgtct gatcccgaa aattgcaaaa cagcgggat      959
<210> 16
<211> 1014
<212> DNA
5 <213> artificial
<220>
<223> tTAV ORF
<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(1014)
<400> 16
atg ggc agc cgc ctg gat aag tcc aaa gtc atc aac tcc gcg ttg gag      48
Met Gly Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
1          5          10          15
ctg ttg aac gaa gtt ggc att gag gga ctg acg acc cgc aag ttg gcg      96
Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
          20          25          30
cag aag ctg ggc gtg gag cag ccc acc ctc tac tgg cac gtg aag aat      144
Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
          35          40          45

```


ES 2 683 039 T3

aag cgg gcg ctg ctg gat gcc ctg gcc atc gag atg ctc gac cgc cac Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His 50 55 60	192
cac acg cat ttt tgc ccg ttg gaa ggc gag tcc tgg cag gac ttc ctc His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu 65 70 75 80	240
cgc aat aac gcc aag tcg ttc cgc tgc gct ctg ctg tcc cac cga gac Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp 85 90 95	288
ggt gcc aaa gtc cat ctc ggc acg cgc ccg acc gaa aag caa tac gag Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu 100 105 110	336
aca ctg gag aac cag ctc gcg ttc ctg tgc cag caa ggc ttc agc ctg Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu 115 120 125	384
gaa aat gct ctc tac gct ctg agc gcc gtc ggt cac ttt acc ctg ggc Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly 130 135 140	432
tgc gtg ctg gag gac caa gag cat caa gtc gca aaa gag gag cgc gag Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu 145 150 155 160	480
acc cca aca acc gat tcg atg ccc cca ctg ctg cgt cag gca atc gag Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu 165 170 175	528
ctg ttc gat cat caa gga gcc gag ccg gca ttc ctg ttc ggc ttg gag Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu 180 185 190	576
ctg att atc tgc gga ttg gaa aag caa ctg aaa tgc gag tcg ggc tcg Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser 195 200 205	624
ggc ccc gcg tac agc cgc gcg cgt acg aaa aac aat tac ggg tct acc Gly Pro Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr 210 215 220	672
atc gag ggc ctg ctc gat ctc ccg gac gac gac gcc ccc gaa gag gcg Ile Glu Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala 225 230 235 240	720
ggg ctg gcg gct ccg cgc ctg tcc ttt ctc ccc gcg gga cac acg cgc Gly Leu Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg 245 250 255	768
aga ctg tcg acg gcc ccc ccg acc gat gtc agc ctg ggg gac gag ctc Arg Leu Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu 260 265 270	816
cac tta gac ggc gag gac gtg gcg atg gcg cat gcc gac gcg cta gac His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp 275 280 285	864
gat ttc gat ctg gac atg ttg ggg gac ggg gat tcc ccg ggt ccg gga Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly 290 295 300	912
ttt acc ccc cac gac tcc gcc ccc tac ggc gct ctg gat atg gcc gac Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp 305 310 315 320	960
ttc gag ttt gag cag atg ttt acc gat gcc ctt gga att gac gag tac Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr 325 330 335	1008
ggt ggg Gly Gly	1014

ES 2 683 039 T3

<210> 17
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 17

Met Gly Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
 1 5 10 15

Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
 20 25 30

Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
 35 40 45

Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
 50 55 60

His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu
 65 70 75 80

Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp
 85 90 95

Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu
 100 105 110

Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu
 115 120 125

Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu
 145 150 155 160

ES 2 683 039 T3

Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu
 165 170 175

Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu
 180 185 190

Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser
 195 200 205

Gly Pro Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr
 210 215 220

Ile Glu Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala
 225 230 235 240

Gly Leu Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg
 245 250 255

Arg Leu Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu
 260 265 270

His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp
 275 280 285

Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly
 290 295 300

Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp
 305 310 315 320

Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr
 325 330 335

Gly Gly

<210> 18

<211> 1014

<212> DNA

5 <213> artificial

<220>

<223> tTAV2 ORF

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1014)

<400> 18

ES 2 683 039 T3

atg agc cgc ctg gat aag tcc aaa gtc atc aac tcc gcg ttg gag ctg Met Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu Leu 1 5 10 15	48
ttg aac gaa gtt ggc att gag gga ctg acg acc cgc aag ttg gcg cag Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln 20 25 30	96
aag ctg ggc gtg gag cag ccc acc ctc tac tgg cac gtg aag aat aag Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys 35 40 45	144
cgg gcg ctg ctg gat gcc ctg gcc atc gag atg ctc gac cgc cac cac Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His 50 55 60	192
acg cat ttt tgc ccg ttg gaa ggc gag tcc tgg cag gac ttc ctc cgc Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg 65 70 75 80	240
aat aac gcc aag tcg ttc cgc tgc gct ctg ctg tcc cac cga gac ggt Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly 85 90 95	288
gcc aaa gtc cat ctc ggc acg cgc ccg acc gaa aag caa tac gag aca Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr 100 105 110	336
ctg gag aac cag ctc gcg ttc ctg tgc cag caa ggc ttc agc ctg gaa Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu 115 120 125	384
aat gct ctc tac gct ctg agc gcc gtc ggt cac ttt acc ctg ggc tgc Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys 130 135 140	432
gtg ctg gag gac caa gag cat caa gtc gca aaa gag gag cgc gag acc Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr 145 150 155 160	480
cca aca acc gat tcg atg ccc cca ctg ctg cgt cag gca atc gag ctg Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu 165 170 175	528
ttc gat cat caa gga gcc gag ccg gca ttc ctg ttc ggc ttg gag ctg Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu 180 185 190	576
att atc tgc gga ttg gaa aag caa ctg aaa tgc gag tcg ggc tcg ggc Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser Gly 195 200 205	624
ccc gcc tac agc cgc gcc cgc acc aag aac aac tac ggc agc acc atc Pro Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile 210 215 220	672
gag gcc ctg ctg gat ctg ccg gat gat gat gcc ccg gag gag gcg gcc Glu Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly 225 230 235 240	720
ctg gcc gcc ccg cgc ctg agc ttc ctg ccg gcc gga cac acc cgc cgc Leu Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg 245 250 255	768

ES 2 683 039 T3

ctg tcg acc gcc ccg ccg acc gac gtg agc ctg ggc gat gag ctg cac 816
 Leu Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His
 260 265 270

ctg gat ggc gag gat gtg gcg atg gcc cac gcc gat gcc ctg gac gac 864
 Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp
 275 280 285

ttc gac ctg gac atg ctg ggc gat ggc gat agc ccg gga ccg gga ttc 912
 Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe
 290 295 300

acc ccg cac gat agc gcc ccc tac ggc gcc ctg gat atg gcc gat ttc 960
 Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe
 305 310 315 320

gag ttc gag cag atg ttc acc gac gcc ctg ggc atc gat gag tac ggc 1008
 Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly
 325 330 335

ggc taa 1014
 Gly

<210> 19
 <211> 337
 <212> PRT
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Synthetic Construct
 <400> 19

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

Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala Gln
 20 25 30

Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn Lys
 35 40 45

Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His His
 50 55 60

Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu Arg
 65 70 75 80

Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp Gly
 85 90 95

Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu Thr
 100 105 110

ES 2 683 039 T3

Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu Glu
 115 120 125

Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly Cys
 130 135 140

Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu Thr
 145 150 155 160

Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu Leu
 165 170 175

Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu Leu
 180 185 190

Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser Gly
 195 200 205

Pro Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile
 210 215 220

Glu Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly
 225 230 235 240

Leu Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg
 245 250 255

Leu Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His
 260 265 270

Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp
 275 280 285

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe
 290 295 300

Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe
 305 310 315 320

Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly
 325 330 335

Gly

<210> 20

<211> 1011

<212> DNA

5 <213> artificial

<220>

<223> tTAV3 ORF

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1011)

<400> 20

ES 2 683 039 T3

atg ggc agc cgc ctg gac aag agc aag gtg atc aac agc gcc ctg gag Met Gly Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu 1 5 10 15	48
ctg ctg aac gaa gtt ggt atc gag ggc ctg acc acc cgc aag ctg gcc Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala 20 25 30	96
cag aag ctg ggc gtg gaa cag ccg acc ctg tac tgg cac gtg aag aac Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn 35 40 45	144
aag cgc gcc ctg ctg gac gcc ctg gcc atc gaa atg ctg gat cgc cac Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His 50 55 60	192
cac acc cac ttc tgc ccg ctg gag ggc gag agc tgg cag gat ttc ctg His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu 65 70 75 80	240
cgc aac aac gcc aag agc ttc cgc tgc gcc ctg ctg tcg cac cgc gat Arg Asn Asn Ala Lys Ser Phe Arg Cys Ala Leu Leu Ser His Arg Asp 85 90 95	288
ggc gcc aag gtg cac ctg ggc acc cgc ccg acc gag aag cag tac gag Gly Ala Lys Val His Leu Gly Thr Arg Pro Thr Glu Lys Gln Tyr Glu 100 105 110	336
acc ctg gag aac cag ctg gcc ttc ctg tgc cag cag ggc ttc agc ctg Thr Leu Glu Asn Gln Leu Ala Phe Leu Cys Gln Gln Gly Phe Ser Leu 115 120 125	384
gag aac gcc ctg tac gcc ctg agc gcc gtg ggc cac ttc acc ctg ggc Glu Asn Ala Leu Tyr Ala Leu Ser Ala Val Gly His Phe Thr Leu Gly 130 135 140	432
tgt gtg ctg gag gat cag gag cac cag gtg gcc aag gag gag cgc gag Cys Val Leu Glu Asp Gln Glu His Gln Val Ala Lys Glu Glu Arg Glu 145 150 155 160	480
acc ccg acc acc gat agc atg ccg ccg ctg ctg cgc cag gcc atc gag Thr Pro Thr Thr Asp Ser Met Pro Pro Leu Leu Arg Gln Ala Ile Glu 165 170 175	528
ctg ttc gat cac cag ggc gcc gag ccg gcc ttc ctg ttc ggc ctg gag Leu Phe Asp His Gln Gly Ala Glu Pro Ala Phe Leu Phe Gly Leu Glu 180 185 190	576
ctg atc atc tgc ggc ctg gaa aag cag ctg aag tgc gag agc ggc agc Leu Ile Ile Cys Gly Leu Glu Lys Gln Leu Lys Cys Glu Ser Gly Ser 195 200 205	624

ES 2 683 039 T3

gcc tac agc cgc gcc cgt acc aag aac aac tat ggc agc acc atc gag 672
Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile Glu
210 215 220

gga ctg ctg gac ctg ccg gat gac gat gcc ccg gag gaa gcc ggc ctg 720
Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly Leu
225 230 235 240

gcc gcc ccc cgc ctg agc ttc ctg ccc gcc gga cac acg cgc cgc ctg 768
Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg Leu
245 250 255

agc acc gcc ccg ccg acc gat gtg agc ctg ggc gac gag ctg cac ctg 816
Ser Thr Ala Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu
260 265 270

gat gga gag gat gtg gca atg gcc cac gcc gac gcc ctg gac gat ttc 864
Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe
275 280 285

gac ctg gat atg ctg ggc gat gga gat agc ccg gga ccg ggc ttc acg 912
Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr
290 295 300

ccc cac gat agc gcc ccg tac ggc gcc ctg gac atg gcc gac ttc gag 960
Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu
305 310 315 320

ttc gag caa atg ttc acc gac gcg ctg ggc atc gat gag tat ggc ggg 1008
Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly
325 330 335

tag 1011

<210> 21
<211> 336
<212> PRT
5 <213> artificial
<220>
<223> Synthetic Construct
<400> 21

Met Gly Ser Arg Leu Asp Lys Ser Lys Val Ile Asn Ser Ala Leu Glu
1 5 10 15

Leu Leu Asn Glu Val Gly Ile Glu Gly Leu Thr Thr Arg Lys Leu Ala
20 25 30

Gln Lys Leu Gly Val Glu Gln Pro Thr Leu Tyr Trp His Val Lys Asn
35 40 45

Lys Arg Ala Leu Leu Asp Ala Leu Ala Ile Glu Met Leu Asp Arg His
50 55 60

His Thr His Phe Cys Pro Leu Glu Gly Glu Ser Trp Gln Asp Phe Leu

ES 2 683 039 T3

```

agttcacctc agtatcagct agcacgtaca cgactaaaat ctaaacctga aaaattatac      60
gtttaaatat tcagtccttt gccgattttt gcccactca gactgtttta aaagctcgat      120
tttttttgt accatttttt cgggtgtgaaa aagggggccc tactttacta tcaaa        175
<210> 23
<211> 3960
<212> DNA
5 <213> Drosophila melanogaster
<400> 23
tcctttattg agattaacgg tcaaatcaat agataaaaaga aaacttatta catatttaaa      60
gaatgatgaa atttttaaaa ttcattgtat catatgttat tcggccactg taaccgaaat      120
caaccatttt tggcggatgc tgtgtgtttg ttttgctgac aactatcgat tttgtcagac      180
gcagcatctt taactgaacg aaaaaggcgc gtggtgcaaa atatattaat tgattataga      240
tcgtagtgat tatatttgag actatatgat gaagcgacag aatgtccgta ccctttccct      300
ggtggtatgc actttcacct atcttttaat tggagccgcc gtgttcgatt ccctggagtc      360
accaacggag gccaaaagat ggaattcct acagagtgag aagcttgttg atttattaac      420
ctaatttctt agtaatgaat ttatttaatc aattgtagcc gttaagaaca actttgttag      480
aaagtacaat gtgactgacg aggatttccg tgtgatggaa atcgtcatca ttgaaaataa      540
gccccacaag gccggacctc agtggaaatt cgctggagct ttctatttca gcacggttgt      600
actggcaatg atagtaaat taattatcta ttaaatatga tttattgaat agattataat      660
tctgttgtaa ctttctttag gatatggtca ttctacgcca gttacaattc cgggaaaagc      720
atthtgtatg ggctatgcta tggtaatga acttacaatc ccaatttcca gtcttctaaa      780
gatattccct tattaggtgg gcatcccgct gggctctggtg atgttccagt ctatcggaga      840
acgtctgaat aagtttgcat ccgtgataat aaggcgggca aagagagcca gtggagctcg      900
ctgtacggat gccaccgaaa tgaatctcat gttggccacc ggaatgctct cctccataat      960
aatcaccact ggagcagcag tcttttcccg atacgagggt tggagctact tcgatagctt     1020
ctactattgt tttgtcacct tgacgacaat tggtttcggc gattatgtgg cattgcagaa     1080
cgaccaagct ctaactaata agcctggcta tgtggcgctg agcttggctc tcatcctatt     1140
cggcttggcc gtggtggccg ccagtatcaa tctattggtg ctccgattca tgaccatgtg     1200

```

ES 2 683 039 T3

agtccatggt ctattgcagg aaatatctta tttaatggat ttttaatcac aggcaagcag 1260
 aggatgccaa gagagatgag caggatgctc agaacttggc tggaatgcc cagccggtga 1320
 ccttcgatga tgagtccacg tacaatatgc acggcaagct gctggagaac aactacacaa 1380
 cggagaacga tgagaccgcc tccctgtgtt cctgcacctg catgggtggc accaggtgcc 1440
 tgaatcatga gcagttctg gaccggact ttcagcctac cgacattatc gagagcacct 1500
 tgtgcctgaa gcgagcctcc gtctgatata cgtacagcca gctgtgggac tcctcattgt 1560
 aggagccaga gccaatggat caccaaatcg tagttacaat cctgtagaga accatccgcc 1620
 gccaaaattt ggttggttaga caaaccttcc tccctacgta gattttttaa ccaggatggg 1680
 tcataataca tataagtttg gagagcaagg ttaatagtct ttaaaaggca gtttttgctt 1740
 aagaaataat cgaccatcc cattatacac ccatataaac atttacaag gagtaaaatc 1800
 caggacatcc atgtcaatat caatcgtatc atctggctcg tagccttggc atcctctatt 1860
 gcttccaagg caccgcaaaa tccatcccat ctcgaatctt agccgtatat tcgtttatct 1920
 atgtaagtac tattaaagtt tgtgctcaa acggagaact gagttttctg aaatcggggt 1980
 gtgtgaaatg tgtcgaagtc ggaatcgtg gtagcctatt tgtgaacatt cgggtgtagta 2040
 atccaagcca ggttcagttc acctcagtat cagctagcac gtacacgact aaaatctaaa 2100
 cctgaaaaat tatacgttta aatattcagt cttttgccga tttttgccc actcagactg 2160
 ttttaaaagc tcgatttttt tttgtacat tttttcggtg tgaaaaggg gccctaactt 2220
 tactatcaaa atgcgtgaaa ttgtacacat tcaggccggt caatgcggta accagatcgg 2280
 tggtaaatcc tgggaggtaa tctcggatga gcaactgtata gatgcgaccg gaacgtacta 2340
 cggcgatagt gatctccagc tggagcgcac caatgtatac tacaatgaag ccaccggtgc 2400
 caagtatgtg ccacgcgcaa ttctcgtgga cctggagccc ggcaccatgg attcggttcg 2460
 ttctggcgcc tttggccaga tcttccggcc ggacaatctt gtgtttggcc aatcgggagc 2520
 aggcaacaac tgggccaaag gtattacac cgagggtgct gaactggtgg attccgtctt 2580
 ggatgtggtg cgaaaggagt ccgagggatg cgattgcctt caggttaagt ttgggggttt 2640
 gggaaattat ctgaaaaagt ttaccctact tttctccaac agggcttcca gctgaccac 2700
 tcgctgggtg gcggcactgg ctccggcatg ggaaccctgc tgatctcgaa gatccgcgag 2760
 gagtaccggg accgcatcat gaacacctc tcggtggtgc cctcgccaa ggtgtccgat 2820
 acggtggtgg agccctacaa tgccacctg agtgtgcatc agctggtgga gaacaccgat 2880
 gagacgtact gcatcgacaa cgaggcgttg tatgacatct gcttcgcac actgaagctg 2940
 accacgcca cctacggtga cctgaacat ctggtttcgg ccaccatgtc tgggtgacg 3000
 acctgcctgc gttccctgg ccagctgaac gctgatcttc gcaagctggc cgtgaacatg 3060
 gtacccttcc cccggctgca cttcttcag cccggattcg caccgctcac ctcgcgagga 3120

ES 2 683 039 T3

tcgcaacaat accgggccct taccgttccg gagctgaccc agcagatgtt cgatgccaaag	3180
aacatgatgg ctgcgtgcca tccgcgacat ggctcgctatc tgaccgtcgc cgccatcttc	3240
cgtggccgca tgtccatgaa ggaggtggac gagcagatgc tcaacattca gaacaagaac	3300
agcagcttct tcgtggaatg gatcccgaat aactgcaaga cagcgggtg cgatattccg	3360
cccagaggtc tcaagatgtc ggccaccttc attggcaact ccaccgcat tcaggagcta	3420
ttcaaaccggg tttcggagca gttcacccgc atgttccgaa ggaaggcctt cttgcattgg	3480
tacaccggcg agggaaatgga cgaaatggaa ttcacagagg ccgagagcaa catgaacgac	3540
ttggtttctg aatatcagca gtaccaggag gcgactgccg atgaggagg cgaattcgat	3600
gaagacgaag aggggtggcg cgatgaataa taggattaac ttcccactca agatcacaca	3660
tgaacaccaa aacaggctag caggggaacc cattaggaag gcacaacaca ttggatcttt	3720
gggccttagc atattgtgct tcgaggcccg tcggttgtac atatttcta tatggattct	3780
tcactgttcg attatttacc attcacacac gtacagaaga aatatgtcca cctttgttaa	3840
gctcatgttg caattgctgt gatttctggg ttacgaataa atgttgattt ataagcagac	3900
aagattacca acagcatttt gcatatTTTT ataccgttca aaaggcattg cataaaccta	3960
<210> 24	
<211> 1870	
<212> DNA	
5 <213> Drosophila melanogaster	
<400> 24	
ggaaatcgta gtagcctatt tgtgaacatt cgggtgtagta atccaagcca ggttcagttc	60
acctcagtat cagctagcac gtacacgact aaaatctaaa cctgaaaaat tatacgttta	120
aatattcagt cttttgccga tttttgccc actcagactg ttttaaagc tcgatttttt	180
tttgtaccat ttttcgggtg tgaaaaagg ggcctactt tactatcaaa atgcgtgaaa	240
ttgtacacat tcaggccggt caatgcggta accagatcgg tggtaaattc tgggaggtaa	300
tctcggatga gcaactgtata gatgcgaccg gaacgtacta cggcgatagt gatctccagc	360
tggagcgcac caatgtatac tacaatgaag ccaccggtgc caagtatgtg ccacgcgcaa	420
ttctcgtgga cctggagccc ggcacccatgg attcggttcg ttctggcgcc tttggccaga	480
tcttccggcc ggacaatttt gtgtttggcc aatcgggagc aggcaacaac tgggccaagg	540
gtcattacac cgagggtgct gaactggtgg attccgtctt ggatgtggtg cgaaaggagt	600
ccgagggatg cgattgcctt cagggcttcc agtcgaccca ctcgctgggt ggcggcactg	660
gctccggcat gggaaacctg ctgatctcga agatccgcga ggagtacctg gaccgcatca	720
tgaacacctt ctcggtggtg ccctgcacca aggtgtccga tacggtggtg gagccctaca	780
atgccaccct gagtgtgcat cagctggtgg agaacaccga tgagacgtac tgcacgcaca	840

ES 2 683 039 T3

acgagggcgtt gtatgacatc tgcttccgca cactgaagct gaccacgccc acctacggtg 900
 acctgaacca tctggtttcg gccaccatgt ctgggtgtgac gacctgcctg cgcttccctg 960
 gccagctgaa cgctgatcct cgcaagctgg ccgtgaacat ggtacccttc ccccggtgc 1020
 acttcttcat gcccggttc gcaccgctca cctcgcgagg atcgcaacaa tacggggccc 1080
 ttaccgttcc ggagctgacc cagcagatgt tcgatgcaa gaacatgatg gctgctgctg 1140
 atccccgaca tggctcgtat ctgaccgtcg ccgccatctt ccgtggccgc atgtccatga 1200
 aggaggtgga cgagcagatg ctcaacattc agaacaagaa cagcagcttc ttcgtggaat 1260
 ggatcccgaa taactgcaag acagcgggtg gcgatattcc gccacagagt ctcaagatgt 1320
 cggccacctt cattggcaac tccaccgcca ttcaggagct attcaaacgg gtttcggagc 1380
 agttcaccgc catgttccga aggaaggcct tcttgcatg gtacaccggc gagggaatgg 1440
 acgaaatgga attcacagag gccgagagca acatgaacga cttggtttct gaatatcaac 1500
 agtaccagga ggcgactgcc gatgaggagg gcgaattcga tgaagacgaa gaggggtggc 1560
 gcgatgaata ataggattaa ctcccactc aagatcacac atgaacacca aaacaggcta 1620
 gcaggggaac ccattaggaa ggcacaatac attggatctt tgggccttag catattgtgc 1680
 ttcgaggccc gtcggttgta catatttctt atatggatc ttcactgttc gattatttat 1740
 cattcacaca cgtacagaag aattatgtcc actttgtaa gctcatgttg caattgctgt 1800
 gatttctggg ttacgaataa atgttgattt ataagcagac aagattacca acagcatttt 1860
 gcatattttt 1870
 <210> 25
 <211> 516
 <212> DNA
 5 <213> Ceratitis capitata
 <400> 25
 atgtctgaag aagtggaaac cttcgctttc caagctgaaa ttgctcagct tatgtcgttg 60
 atcatcaaca cattctactc gaacaaagaa atttttcttc gtgagttgat ctctaacgct 120
 tccgatgcac tcgataaaat ccgttacgag tctttgaccg accccaccaa gttggacagt 180
 ggcaaagaat tgtatattaa gcttattccc aataaaacgg caggcacttt gaccattatt 240
 gatactggta ttggtatgac taaatccgat ttgggtcaaca atttgggtac aattgccaaag 300
 tccggcacta aagcattcat ggaagcattg caagctgggtg ctgatatttc tatgattggt 360
 caatttggtg ttggtttcta ctcggcttac ttggttgctg acaaagtaac cgttacgtca 420
 aagcacaacg atgacgaaca atacatttgg gaatcgtcgg ccggtggctc gttcacagtt 480
 aaaccagaca acacagaacc attgggacgt ggtacc 516
 <210> 26
 <211> 144
 10 <212> DNA
 <213> artificial
 <220>
 <223> artificial
 <400> 26

ES 2 683 039 T3

atcaattgaa ttggaaaaat acgcttgaaa gcacttttgc gcggagcaac aaagaaagtg 60
 ttcttaaact attataattg caagtgatta ataaaggaat tttatatttt gttctacgaa 120
 gttgatacat tgaataaaaa caag 144
 <210> 27
 <211> 221
 <212> DNA
 5 <213> Ceratitis capitata
 <400> 27
 tagaacaatc tcgtagcttc tacacttttg acatttggtt tttgtgcctc tataaatagg 60
 gctgttcgct tgcaaccggc atcaattgaa ttggaaaaat acgcttgaaa gcacttttgc 120
 gcggagcaac aaagaaagtg ttcttaaact attataattg caagtgatta ataaaggaat 180
 tttatatttt gttctacgaa gttgatacat tgaataaaaa c 221
 <210> 28
 <211> 172
 10 <212> PRT
 <213> Ceratitis capitata
 <400> 28
 Met Ser Glu Glu Val Glu Thr Phe Ala Phe Gln Ala Glu Ile Ala Gln
 1 5 10 15
 Leu Met Ser Leu Ile Ile Asn Thr Phe Tyr Ser Asn Lys Glu Ile Phe
 20 25 30
 Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu Asp Lys Ile Arg
 35 40 45
 Tyr Glu Ser Leu Thr Asp Pro Thr Lys Leu Asp Ser Gly Lys Glu Leu
 50 55 60
 Tyr Ile Lys Leu Ile Pro Asn Lys Thr Ala Gly Thr Leu Thr Ile Ile
 65 70 75 80
 Asp Thr Gly Ile Gly Met Thr Lys Ser Asp Leu Val Asn Asn Leu Gly
 85 90 95
 Thr Ile Ala Lys Ser Gly Thr Lys Ala Phe Met Glu Ala Leu Gln Ala
 100 105 110
 Gly Ala Asp Ile Ser Met Ile Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser
 115 120 125
 Ala Tyr Leu Val Ala Asp Lys Val Thr Val Thr Ser Lys His Asn Asp
 130 135 140
 Asp Glu Gln Tyr Ile Trp Glu Ser Ser Ala Gly Gly Ser Phe Thr Val
 145 150 155 160
 Lys Pro Asp Asn Thr Glu Pro Leu Gly Arg Gly Thr
 165 170

ES 2 683 039 T3

<210> 29
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Drosophila melanogaster

5 <400> 29
 atatgtcaaa tggcgtgaga cttttaacaa aaaaaacatt tggttcagaa aaacttcgct 60
 taaattacta aagaaaaact tagtagacca tttcagc 97

<210> 30
 <211> 2000
 <212> DNA
 10 <213> Drosophila melanogaster

<400> 30
 aatcgtgctt taaagaccga actctcgaat caattaatgc gctccatggc catgaaagtg 60
 gcgagtggcg ataagccagc tccaacccat gtggccccc aactgggagc tggcgataca 120
 aactgcttca attttaatgt cctcaaactg tcataaactg taaatgcaca gtaaaagcca 180
 tgagtataag gcgggcaagc tgcgacagat tctgtcgtgt agatggccaa gaagctaaag 240
 ctgtcagctc aagagttaa gttcgacaag ctgggtgaaac tattgtatct tacactgaag 300
 tccgattttc acttaaatat tatatgtact tcgtttattt aaacctaata taaaagtggg 360
 aaattaattg cccactaag tgtaatcct tttcatacta acgctgtata ccttttgaca 420
 ccttcatggt tgacttctga ttcacatacg cccatttaaa acaccctca ctctttgaac 480
 tcgatttttt aggttactg agcaaacctt ttttttaac acgcttgcgt tgccggttca 540
 acatttagcc agttttttgg gccagtgcaa agacgaccg caggctgaaa gccaacattc 600
 gctatacagg gtacaatata gccgcatgag aataccatt catatgtata tgtatgtatg 660
 tatgaatgaa gtcgtgcaca tgagtaacct gttggcacga cctatcatcg cccattccgc 720
 tggctaaggc ctcctggctg ggcgatgggc ggtgggtggt aggtgggctg ggcacgtgtc 780
 gcctgcagct ttcattagtt caatgtcaat gttttgtttt gtgatcctgg aacacaaaaa 840

ES 2 683 039 T3

	ctgaagaaca tgggaacccat ccagctgtct gccttggggtt ttttaatttta agcgcgatggt	900
	gctggcctcc agccagccac ctgcatcacc tttgcctgtc tgctgattaa gtgagtacaa	960
	gctgcaggtg tcctgcatta ggacatcccg ctgctccttc gaggcgaaag gaatgcaaat	1020
	taaaactggt atctcttctct tctgtcaccg attctgcgga agctctgtgt gcacagcaaa	1080
	ttgaatgagg tgcacagacg gcaatcgata tctcgatgga ggaagtaatc ttttaagttcc	1140
	tttaagtctg aatatctgga tatccaatth cctttttccc agaaaaacgac cgcaacacat	1200
	gtcgaaagt tgcgggcaca aaccattggc atacactgag gtgtatthtat aatthtaatth	1260
	aatthtaatth agaathccgt tttatataat taaatgga atthtgatgt taaaacaagt	1320
	gtgtgthtca gcgthtctaa ctaaatactc toggaatthc attagcaath ctcttgtctt	1380
	tgtaccctth tthtttgacg tgcacaggcg tacttaccac atcacagaca tggaaathag	1440
	gcaaaaagt cgcaggcaat aatgctgaaa tccatthacg taathcgaaa tccgctggcg	1500
	gcgthtttagc cacgacaaca gtcgtatgca aactthatta attacgagcc ccgatgacca	1560
	ttaccacat atcgaccatc tactatthgac catgaagcca thcttgacgt ccggcgaaac	1620
	thtggtgtt tactatthtg ctaggctgag thtccggccac ccattgttgt gthgagcaat	1680
	tggcaccagc tatgaaaatc acgcaaaagt thttcaaath aaaaathcaa cagatthcac	1740
	toggaaaatc aacaaccctg gaaagcggca tataacaaaa acaaaaatca atgaathaaa	1800
	aaaaaaaaat tacataathc gattgagcct gctgthcata aaaaathatg atactgthta	1860
	thaaaatcca tgtaagactt tagthgthtt aatthathth atcagaactg thactthaat	1920
	aatgactthta gthtagtacct tagaaaatath ggcaaccctt gacagaathg aathatgtht	1980
	gcaacccaag thtgaggcc	2000
	<210> 31	
	<211> 624	
	<212> DNA	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> TETR of TTAV sequence	
	<400> 31	
	cgagcccagc tgcattthca gthgctthtc caatccgag ataatcagct ccaagccgaa	60
	caggaatgcc ggctcggctc cthgatgac gaacagctc attgcctgac gcagcagtg	120
	ggcatcgaa tgggtgttg ggtctcgcg ctctcttht gcgacttgat gctcttggtc	180
	ctccagcacg cagcccaggg taaagtgacc gacggcgcctc agagcgtaga gagcaththc	240
	caggctgaag ccttgctggc acaggaacgc gagctggttc tccagtgtct cgtatthgctt	300
	thcggctcggg cgcgtgcoga gatggactth ggcaccgtct cggthggaca gcagagcgca	360
	gcggaacgac thggcgttat tgcggaggaa gtcctgccag gactcgcctt ccaacgggca	420
	aaaatgcgtg tggthggcggc cgagcatctc gatggccagg gcatccagca gcgcccgcctt	480
	atthctcacg tgccagtaga ggtgggctg ctccacgccc agctthctgcg ccaactthgcg	540
	ggtcgtcagc ccctcaatgc caactthcgt caacagctcc aacgcggagt tgatgactth	600
10	ggactthacc aggcggctga ccat	624

ES 2 683 039 T3

<210> 32
 <211> 624
 <212> DNA
 <213> artificial

5 <220>
 <223> VP16 of TTAV sequence

<400> 32
 atggtcagcc gcctggataa gtccaaagtc atcaactccg cgttggagct gttgaacgaa 60
 gttggcattg agggactgac gacccgcaag ttggcgcaaga agctgggctt ggagcagccc 120
 accctctact ggcacgtgaa gaataagcgg gcgctgctgg atgccctggc catcgagatg 180
 ctogaccgcc accacacgca tttttgcccg ttggaaggcg agtcctggca ggacttcctc 240
 cgcaataacg ccaagtcggt ccgctgctgt ctgctgtccc accgagacgg tgccaaagtc 300
 catctcggca cgcgcccggc cgaaaagcaa tacgagacac tggagaacca gctcgcgttc 360
 ctgtgccagc aaggcttcag cctggaaaat gctctctacg ctctgagcgc cgtcgggtcac 420
 tttaccctgg gctgctgctt ggaggaccaa gagcatcaag tcgcaaaaga ggagcgcgag 480
 accccaacaa ccgattcgat gccccactg ctgctgcagg caatcgagct gttcgatcat 540
 caaggagccg agccggcatt cctgttcggc ttggagctga ttatctgagg attggaaaag 600
 caactgaaat gcgagtcggg ctcg 624

10 <210> 33
 <211> 2652
 <212> DNA
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 33
 caaacgtttc gttaaaattt ccgaacaaat tattcctgcg atagaaactg taaaaatttg 60
 aacttttttc gaattcggcc aactgccatt gagttttaa aactttgaat cgcttttgag 120
 agagagcaat tttctgcgaa agatacgcga tcggactagc gccatgaaag tcaaagtttc 180
 ggggtgaatat acgctggccg agatcgaagt cgagttggac cagcagttga cgccagacga 240
 cctgcaacct ggagccacag tgctggccac caacgagagt actggcggct tagagcggat 300
 tgtcagccat gaggagctgt ccagattctt cgccgtgggg ccagcgggcg ccttaccat 360
 gccacggat gttgtagtgg agcgaacatt ggcggatccg gctttcaagc aaatcctgca 420

ES 2 683 039 T3

ggaggccgac gaaagaaag gcttcgatcc ccaggcggag caaatgaaga ttcgcgactt 480
 tttggccggc gtcaccagca gcaagatgac cactgagcaa tcggtctttc atggatctcg 540
 ttccaattcc tctgctcca ctgtcaaccg tataaagtgt ccaacatggt tggccagtt 600
 cgatgccgtg gcctttcaaa atcattcctg tgaagcgaag ccgatcgagg tggcggtgcc 660
 tcagcaggag aagccacatc ttgtgcctac tgtatctgct cctccggctc cgctaagcaa 720
 accggctagc gagcgggtaa ttcgggagaa ccaagtgcgt ctgcgccgtt acatcaaaga 780
 tgagatgaag tacgatctgg ccacaggcat cgaagactcg cgcaaaaacg cggccaaggg 840
 tcccaacgag tgcaccatgt gcgaccgcaa atttgtccac gcctctgggc tggcgcgcca 900
 catggagaag catgccctgg acttgatccc ttcgcaaacc agcgagcaac cacatacgat 960
 tccggctgcc ggactgcatg tggcgggtaa gtgcaactcg tgtggccgca tcttctatga 1020
 tccgcagggt gcttttagac acggccttat tcacgattcg gagcattcaa cgatgcgtca 1080
 aagtccaatg acccaagtac cctccaatag agcagatttc aatgagctgc tgctggatgg 1140
 cgagatgctg atagacaacg atcccgatt tgcaacgagc aatcaaaaca caaacccacc 1200
 gaagaaggaa atgttttagca gcctgatctt ggaagtggt ttgcagtgcg agttttgca 1260
 gtacattttc gctgacatag ccgagctgct tgtccattcc gcttccatg tggcggagcg 1320
 gcgctttgag tgcaccgcct gcgacattca gatgaacacg gccaaaggaag ccagcatcca 1380
 cttccagacg gactgcattt tcatgcccga agcaatcagg tccctaaatg tcacgcttag 1440
 tcgctacttt gtgtgtaatg tgtgcgagct gaagtttgcc aacacggacc tgctccagga 1500
 gcatcggtgt acctccttcc actactttcc tcgctcaac gagaatggca agaagctcct 1560
 gctgccctgt gacttttgcg acgtcaactt tgagttcgcc cacgattttc tggcgcacag 1620
 cgaggagaag catctcaaca aaaagaagcg cgaagaggaa acgcgcaaca cggcgcggcg 1680
 ccgaatacgt caatatctct gcgatatctg cggcaaatcg tacaccaggt caagccatct 1740
 gtggcagcat ctacgcttcc accaggggtg gaagcccttc gtttgccagg aggaaaactg 1800
 tgatcggaag ttcaccatc gccagatct gaacgaccac attcgcaagt gccacacggg 1860
 cgagcgtcca tatctttgct tggcgtgtgg aaagcgcttt ctaccggat ccgtcttcta 1920
 tcagcaccgt ctgatccatc gcggcgagcg gcgctatgag tgcgaggagt gtggtaaacg 1980
 tttctatcgc cgggacgcgc tcaagaatca ccaacgcac cacaccggag agaagccgta 2040
 cagctgcctc ttctgcaaga agacttttcc ccagcgcggc gaccgtgaca agcaccatccg 2100
 agctcgacac tctcacctgg atgccaactc gcgtctcatg atgcagatgc agaagttcca 2160
 actggagacg gccgctgccc agaaggctca aagtcataat cccgagcagc aggataatga 2220
 tgttgctggg ggtgccagca cctcagatgt gccctcgggc tcgggattca tgtcgactga 2280
 gccaaagcgtc gcggagatgc agtactctat tacgcccggag cagcaggag aaatggtgtg 2340

ES 2 683 039 T3

	tgtgccatt gacgaggtca ataacagttt ctttatgtcg cactacatgc aagctgtccc	2400
	catggaggag gatggttcgg gccagcatat cattgtcttc gagcagccag gccagaatat	2460
	ggacatgatg tccatttacg atcagcaaca ggttggggaa ccaatgcatg agagcggcgt	2520
	gcccagcgg cgggctgagg aaaatgctag ggtggtggtt gtcaaaaaca atccaactaa	2580
	gccgatattt tcggatacct atttgtaaaa atcatattca aattcgaatt taaataaagc	2640
	ggcaagatag cg	2652
	<210> 34	
	<211> 701	
	<212> DNA	
5	<213> Drosophila melanogaster	
	<400> 34	
	gattaacaac gtcggtgtgc catgtaggc actgcgttta ctcatctcgc gaggcgtctt	60
	atctgtaacc gaagtgtgga atgcagataa ctggcggcca gtaatcacct ggccaacta	120
	cgacgactcc gactctgaca gcctgagcca aaggaaaaca taaacaaatg gcgttaacta	180
	cactttgcgg tctacgatat gcgccttggc tgtcagaagt ctgcaaaatg ttgggtaagt	240
	ccaaaattta aaaattagct aatgactaat gtgtttaga agcggaaacg gctttataaa	300
	tcattttatt tttaaagatg aatgcatatg cagggactta aaaacacagt ttcaaatgt	360
	ataactacga acccattggt ttgagtttct cattattgag atgtacttta aatcttatgt	420
	gatattagaa attaaaattc aaagcaattt aaagactaca tttatattat acatataat	480
	tttacgatat acgtatttat aatattcagt tgattctcag gtcatttaag ttataaacat	540
	atcggtaagt tgtcagatgt tttactttag caaacatttt agtattgccg tctttgttag	600
	aaacccttta gagttgtcca atgccttggg gccaaactgtc agttgagcca atttccagc	660
	gacggagaaa gcaaatctca tatccctact tatcagcagt a	701
	<210> 35	
	<211> 1178	
10	<212> DNA	
	<213> Ceratitis capitata	
	<400> 35	
	gccgttcagt caaatgtgat attcacaact attgagcaga gaattccatt aatgtacata	60
	tgtattttga ttgctgcaac aaaaaatatt aaaatggttt agcaaggtta attaagtgt	120
	aatgacagat ttttttttac ataccaccacc ttcgcctgt agctagttgc gagtttactt	180
	cagtttctat ctaattcgtt tgaatccata tggcagaatt acagtgtaat ggacgctctc	240
	ttactttttt aggcttaaaa aacacattaa agatcaatta attttaagga ataagcaaat	300
	aaaattactc cggcgttcag atattggaaa tatagaataa tgtaacattt aaaataaggc	360

ES 2 683 039 T3

ctaataattta tcaattatca agacatatgt atatacatga ttcattgcaaa aggtattcat	420
ttttaataat gcagggaaaa actacagcta aacaacaacg taatcaattc ctacttggtgta	480
tttcttcggt tccctttaac attttttcat aacagtaggt tttcaatatt ttagatgtaa	540
atgaaaaatg tacggtttcc gtggcaagct taacttgcca ttcttctgaa caatttaatc	600
taataatfff tcattatcta aggcgtcaat ttaaatggca aagtattaat attcttgatg	660
gttgccctaaa ttttagaaat aaacactgaa tgctattaac taaggaagtt gaggtaaaag	720
ttttgtttaa attccacata tgttgggaata tcgtcatcaa aaataaatgt gtcctgtaat	780
taatatgfff atcgttttagt tttaaaatta aaattaatff aagttaactg taatgggtgt	840
actcaatcgt tggattagaa attgaaagcg gaggcaaata taatffffcg gtgttggtgta	900
agtgttaciaa ttcgaacagt tttaaattag aactaataa atatatgaaa atgcattaaa	960
atcaaaaaata tccatgatta aatcatatff aaaatgtaga aattaataac actaaaatat	1020
tttggtaaat taagacacta tcaaaaaact cgaaaaaagt aggctagctt tctatgtcaa	1080
ggcgccatff tttaaagaac aatagatcta gaaatactgc agagtccgca aaatffffgaa	1140
ttatffffta taaatataaa ctaaattaaa tccactag	1178
<210> 36	
<211> 1178	
<212> DNA	
5 <213> Ceratitis capitata	
<400> 36	
gocgttcagt caaatgtgat atccacaact attgagcaga gaattccatt aatgtacata	60
tgtatffffga ttgctgcaac aaaaaatatt aaaatggtff agcaaggfta attaagtgta	120
aatgacagat ttttttttac ataccacc ttcgccctgt agctagttgc gagtttactt	180
cagtttctat ctaattcgtt tgaatccata tggcagaatt acagtgtaat ggacgctctc	240
ttactfffft aggcttaaaa aacacattaa agatcaatta atfftaagga ataagcaaat	300
aaaattactc cggcgttcag atattggaaa tatagaataa tgtaacatff aaaataaggc	360
ctaataattta tcaattatca agacatatgt atatacatga ttcattgcaaa aggtattcat	420
ttttaataat gcagggaaaa actacagcta aacaacaacg taatcaattc ctacttggtgta	480
tttcttcggt tccctttaac attttttcat aacagtaggt tttcaatatt ttagatgtaa	540
atgaaaaatg tacggtttcc gtggcaagct taacttgcca ttcttctgaa caatttaatc	600
taataatfff tcattatcta aggcgtcaat ttaaatggca aagtattaat attcttgatg	660
gttgccctaaa ttttagaaat aaacactgaa tgctattaac taaggaagtt gaggtaaaag	720
ttttgtttaa attccacata tgttgggaata tcgtcatcaa aaataaatgt gtcctgtaat	780
taatatgfff atcgttttagt tttaaaatta aaattaatff aagttaactg taatgggtgt	840

ES 2 683 039 T3

actcaatcgt tggattagaa attgaaagcg gaggcaaata taatTTTTcg gtgttgggta	900
agtgttaciaa ttcgaacagt tttaaattag aactaattaa atatatgaaa atgcattaaa	960
atcaaaaata tccatgatta aatcatatTT aaaatgtaga aattaataac actaaaatat	1020
tttggtaaat taagacacta tcaaaaaact cgaaaaaagt aggctagctt tctatgtcaa	1080
ggcgccattt tttaaagaac aatagatcta gaaatactgc agagtccgca aaattttgaa	1140
tttattttta taaatataaa ctaaattaa tccactag	1178
<210> 37	
<211> 1785	
<212> DNA	
5 <213> Ceratitis capitata	
<400> 37	
ctaattcgtt tgaatccata tggcagaatt acagtgtaat ggacgctctc ttactTTTT	60
aggcttaaaa aacacattaa agatcaatta attttaagga ataagcaaat aaaattactc	120
cgcggttcag atattggaaa tatagaataa tgtaacattt aaaataaggc ctaatatTTa	180
tcaattatca agacatatgt atatacatga ttcatgcaaa aggtattcat ttttaataat	240
gcagggaaaa actacagcta aacaacaacg taatcaattc ctacttggtta tttcttcggt	300
tccctTTaac atTTTTcat aacagttagt tttcaatatt ttagatgtaa atgaaaaatg	360
tacggtttcc gtggcaagct taacttgcca ttcttctgaa caatttaatc taataatttt	420
tcattatcta aggcgtcaat ttaaattggca aagtattaat attcttgatg gttgcctaaa	480
ttttagaaat aaacactgaa tgctattaac taaggaagtt gaggtaaaag ttttgTTaa	540
attccacata tgttggaaata tcgtcatcaa aaataaatgt gcctgtaat taatatgTTt	600
atcgtttagt tttaaaatta aaattaattt aagttaactg taatgggtgt actcaatcgt	660
tggattagaa attgaaagcg gaggcaaata taatTTTTcg gtgttgggta agtgttaciaa	720
ttcgaacagt tttaaattag aactaattaa atatatgaaa atgcattaaa atcaaaaata	780
tccatgatta aatcatatTT aaaatgtaga aattaataac actaaaatat tttggtaaat	840
taagacacta tcaaaaaact cgaaaaaagt aggctagctt tctatgtcaa ggcgccattt	900
tttaagaac aatagatcta gaaatactgc agagtccgca aaattttgaa tttattttta	960
taaataataa ctaaattaa tccactagta tgaatacaag tgaagaagaa ttttcgaatt	1020
ccgatgcgtg gctatccgag caactgTTtg ctcMattaaa agaatttaat tcagattata	1080
gagaaaagtc ggttgggtgat gcatcgacma catttgTatt tccttccggt agtctcagct	1140
gTTTgcctga aggagaacct cacgacttaa caaaatcacg acttgaaaac tacgagcctg	1200
ttttcaaat atctacacca actaatatat cttctttcga tctgaacgat gtgttgatt	1260
taactaatat tactggcaga tgtaacgatt cagcgtgctt ggatttggtt gggacagttc	1320

ES 2 683 039 T3

cattaactcc atttctaact cccgttcctg agacaacatt aatggtaa at gagacagtga 1380
 aacaaacggc tgaatcatcc tttgatgtaa cagaagagga attaaagctt ttgaaatfff 1440
 tggagtcaca gccaaactact aatcagtttg gtgtgtattg tatatcggat atacttaata 1500
 atatctaatt tcttgatcct ttcagacaca aaatcatatg ttcaaactga ggtttcaccc 1560
 actccatata gtattgtcaa gtgttcaaat tgcaatgttc tctttgattt aatgtctttc 1620
 caaacacata tttgtgatta tgacgaacac cacaatctaa ttgctccacc aataacatca 1680
 acacctctca gcaaaccaat aaaagaagaa ccattactac cagtagaacc tgcattgtatt 1740
 cgtttattgc gtgaaaatca aattcgaatc cgacgaccta gctcg 1785
 <210> 38
 <211> 1238
 <212> DNA
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> Plasmid
 <400> 38
 gccgttcagt caaatgtgat attcacaact attgagcaga gaattccatt aatgtacata 60
 tgtatfffga ttgctgcaac aaaaaatatt aaaatggfff agcaaggffa attaatgtga 120
 aatgacagat ffffftttac atacaccacc ttcgccctgt agctagttgc gagtttactt 180
 cagtttctat ctaattcgtt tgaatccata tggcagaatt acagtgtaat ggacgctctc 240
 ttactfffft aggcttaaaa aacacattaa agatcaatta atfftaagga ataagcaaat 300
 aaaattactc cggcgttcag atattggaaa tatagaataa tgtaacattt aaaataaggc 360
 ctaatattta tcaattatca agacatatgt atatacatga ttcattgcaaa aggtattcat 420
 ctaatattta tcaattatca agacatatgt atatacatga ttcattgcaaa aggtattcat 480
 ffftaataat gcagggaaaa actacagcta aacaacaacg taatcaattc ctacttggtg 540
 fffcttcggt tccctttaac atfffftcat aacagtaggt fffcaatatt ttagatgtaa 600
 atgaaaaatg tacggfffcc gtggcaagct taacttgcca fffctctgaa caatttaatc 660
 taataatfff tcattatcta aggcgtcaat ffaaatggca aagtattaa attcttgatg 720
 gttgcctaaa ffftagaaat aaacactgaa tgctattaac taaggaagtt gaggtaaaag 780
 ffftgfftaa attccacata tgttggaaata tcgtcatcaa aaataaatgt gtcctgtaat 840
 taatatgfff atcgtfftagt fffaaaatta aaatfaattt aagffaacctg taatgggtgt 900
 actcaatcgt tggattagaa attgaaagcg gaggcaata taatffffcgt gtgttggtgta 960
 agtgfftaaa ffcgaacagt fffaaattag aactaattaa atatatgaaa atgcattaaa 1020
 atcaaaaaata tccattgatta aatcatatff aaaaatgtag aattaataac actaaaatat 1080
 fffggtaaat taagacacta tcaaaaaact cgaaaaaagt aggctagctt fctatgtcaa 1140
 ggccgcatff fffaaagaac aatagatcta gaaactctgc agagtcgca aaatfffcaa 1200
 10 fffatfffta taaatataaa ctaaattaa tccactag 1238
 <210> 39
 <211> 1178
 <212> DNA
 <213> artificial

ES 2 683 039 T3

<220>

<223> plasmid

<400> 39

```

gccgttcagt caaatgtgat attcacaact attgagcaga gaattccatt aatgtacata      60
tgtatdddga ttgctgcaac aaaaaatatt aaaatggdtt agcaaggdta attaagtgta      120
aatgacagat ddttdtttac atacaccacc ttcgccctgt agctagttgc gagdttactt      180
cagtdttctat ctaattcgdt tgaatccata tggcagaatt acagtgtaat ggacgctctc      240
tdacttdtttt aggdcttaaaa aacacattaa agatcaatta attdttaagga ataagcaaat      300
aaaattactc cggcgdtcag atattggaaa tatagaataa tgtaacattt aaaataaggc      360
ctaataattda tcaatatca agacatatgt atatacatga ttcatgcaaa aggdattcat      420
tdtdtaataat gcagggaaaa actacagcta aacaacaacg taatcaattc ctacttggtta      480
tdtcttcgdt tccctttaac attdtdtcat aacagtaggt ttdcaatatt ttagatgtaa      540
atgaaaaatg tacgdtdtcc gtggcaagct taacttgcca ttdtctgaa caattdaatc      600
taataatddd tcattatcta aggcgtcaat ttaaatggca aagtattaat attdctgatg      660
gdtgcctaaa ttdtagaaat aaacactgaa tgctattaac taaggaagdt gaggtaaaaag      720
tdtdgttdtaa attdcacata dttdtgaata dtgtcatcaa aaataaatgt dtcctgtaat      780
taatatgdt atcgttdtagt ttdaaaatta aaattdattd aagtdtaactg taatgggtgt      840
actcaatcgt tggattagaa attdgaaagcg gaggcaataa taattdttdc dtgtdtgggta      900
agtdgttacia ttdgaacagdt ttdaaattdag aactaattaa atatatgaaa atgcattaaa      960
atcaaaaata tccatgatta aatcatattd aaaaatgtaga aattaataac actaaaatat      1020
tdtdgtdaaat taagacacta tcaaaaaact cgaaaaaagt aggdtagctt tctatgtcaa      1080
ggcgccattd ttdaaagaac aatagatcta gaaatactgc agagtcogca aaattdtgaa      1140
tdtdattdtda taaatataaa ctaaattaaa tccactag      1178

```

5 <210> 40
 <211> 1785
 <212> DNA
 <213> artificial

10 <220>
 <223> plasmid
 <400> 40

ES 2 683 039 T3

ctaattcgtt tgaatccata tggcagaatt acagtgtaat ggacgctctc ttactttttt 60
aggcttaaaa aacacattaa agatcaatta attttaagga ataagcaaat aaaattactc 120
cggcggttcag atattggaaa tatagaataa tgtaacattt aaaataaggc ctaatatatta 180
tcaattatca agacatatgt atatacatga ttcatgcaaa aggtattcat ttttaataat 240
gcagggaaaa actacagcta aacaacaacg taatcaattc ctacttggtta tttcttcggt 300
tccctttaac attttttcat aacagtaggt tttcaatatt ttagatgtaa atgaaaaatg 360
tacggtttcc gtggcaagct taacttgcca ttcttctgaa caatttaatc taataatfff 420
tcattatcta aggcgtcaat ttaaatggca aagtattaat attcttgatg gttgcctaaa 480
ttttagaaat aaacactgaa tgctattaac taaggaagtt gaggtaaaag ttttgtttaa 540
attccacata tgttggaaata tcgtcatcaa aaataaatgt gtcctgtaat taatatgfff 600
atcgtttagt tttaaaatta aaattaatff aagttaactg taatgggtgt actcaatcgt 660
tgatttagaa attgaaagcg gaggcaaata taatffffcg gtgttgggta agtgttacaa 720
ttcgaacagt tttaaattag aactaattaa atatatgaaa atgcattaaa atcaaaaata 780
tccatgatta aatcatatff aaaatgtaga aattaataac actaaaatat tttggtaaat 840
taagacacta tcaaaaaact cgaaaaaagt aggctagctt tctatgtcaa ggcgccattt 900
tttaagaac aatagatcta gaaatactgc agagtcgcga aaatfffaga tttatfffta 960
taaatataaa ctaaattaa tccactagta tgaatacaag tgaagaagaa ttttcgaatt 1020
ccgatgcgtg gctatccgag caactgfff gctcmtaaa agaatffaaf tcagattata 1080
gagaaaagtc ggttgggtgat gcatcgacma catttgatff tccttccggt agtctcagct 1140
gtttgcctga aggagaacct cacgacttaa caaaatcacg acttgaaaac tacgagcctg 1200
ttttcaaatt atctacacca actaatatat cttctttcga tctgaacgat gtgttggatt 1260
taactaatat tactggcaga tgtaacgatt cagcgcctgct ggatttggtt gggacagttc 1320
cattaactcc atttgtaact cccgttcctg agacaacatt aatggtaaat gagacagtga 1380
aacaacggc tgaatcatcc tttgatgtaa cagaagagga attaaagctt ttgaaatfff 1440
tgaggtcaca gccaaactact aatcagfff gtgtgtattg tatatcggat atacttaata 1500
atatctaatt tcttgatcft ttcagacaca aaatcatatg ttcaaaactga ggtttcacc 1560
actccatate gtattgtcaa gtgttcaaat tgcaatgttc tctttgattt aatgtctttc 1620
caaacacata tttgtgatta tgacgaacac cacaatctaa ttgctccacc aataacatca 1680
acacctctca gcaaaccaat aaaagaagaa ccattactac cagtagaacc tgcatgtatt 1740
cgtttattgc gtgaaaatca aattogaatc cgacgaccta gctcg 1785

- <210> 41
- <211> 1168
- <212> DNA
- 5 <213> Aedes aegypti
- <400> 41

ES 2 683 039 T3

gcgagtaact gtcaaagtgc ttcccgatca gctgatttga gacgtcatgt gaatatattc 60
 atatggtttt cggcagatgt tgtttccata atacacctcg aaggaatttc gtaagatgat 120
 cttatgaacc agcattgact tgataacaaa atccatagat agtcttatga attatgttct 180
 gatccattct tggttccata agactgtcct gtgtaatttg agcttttagat tataaatttc 240
 aatgaatgaa taataactaat ccgcggtgaa aaataggtta accaacttgg gaaaatcaaa 300
 ttttgatcca ttttgtcatg ccgcaattcg attaaagcac tttactgtaa gcattagaat 360
 cgatttgcca tacgacaaaa tggatgaaaa ttcgattttc tctagtggc taacctattt 420
 tgaacgcgaa gaagtatatt atagcagcga aacattattg agaaaagttg tgaagaacgc 480
 ctgaattggt gcaggtttac gttaggggcg gattaattga tggggggggg tttgtgattt 540
 cttacgcgtc atacaaattg ttttgaattt tcagtcaaaa atcttattct ttggatccaa 600
 ttccttaatc tgatcgaaag aaagttttag ttacagcga attgatgata aatagaaaat 660
 atttaccctt tgatgcatta aaaacggagt cagccagcga caaatcagca aacacgtcca 720
 tttcggaaagc catattgaat ttctgatagt gaaatggctg taccgagaaa atttgcctca 780
 cgtggttctt cacaatgatg agcaatgggg ttcataagca ttcttatgac attgacaatt 840
 gattgttatg aaaaaattac acttgtctta tgaatctcaa tctcgtcgaa tgaaatacgc 900
 aagtgtctta tgaaccaaca aaaaaataat aaaaaacgcg ttcattagtg tgatcttatg 960
 aaaatcatgc gagatttttg cctcagtgta ggcctatcag ctggtgggag ggggtggggg 1020
 tgggtggtag tttcgtctct agtctgagct cacggagctc acattcactg gcgatcgttg 1080
 cccttccgtc gctaggcaac ccaacgaaac tagcgtctct cggtcacttc tccgccaac 1140
 caacctctaa acccaagcaa tcggattc 1168
 <210> 42
 <211> 65
 <212> DNA
 5 <213> Aedes aegypti
 <400> 42
 acttttttcg caaccggccc cttgtcaaga cctactgctg cccgttttcc gcacgtaga 60
 aaaaa 65
 <210> 43
 <211> 2445
 10 <212> DNA
 <213> Drosophila melanogaster
 <400> 43

ES 2 683 039 T3

atgaaagtca aagtttcggg tgaatatacg ctggccgaga tcgaaagtca gttggaccag 60
 cagttgacgc cagacgacct gcaacccgga gccacagtgc tggccaccaa cgagagtact 120
 ggcggcttag agcggattgt cagccatgag gagctgtcca gattcttcgc cgtggggcca 180
 gcgggagcct taccaatgcc cacggatggt gtagtgagc gaacattggc ggatccggct 240
 ttcaagcaaa tcctgcagga ggccgacgga aagaaaggct tcgatcccca ggcggagcaa 300
 atgaagattc gcgacttttt ggccggcgtc accagcagca agatgaccac tgagcaatcg 360
 gtctttcatg gatctcgttc caattcctct gcgtccactg tcaaccgtat aaagtgtcca 420
 acatgtttg tccagttcga tgccgtggcc tttcaaaatc attcctgtga agcgaagccg 480
 atcgaggtgg cggtagcctca gcaggagaag ccacatcttg tgcctactgt atctgctcct 540
 ccggctccgc taagcaaacc ggctagcagc cgggtaattc gggagaacca agtgcgctcg 600
 cgccgttaca tcaaagatga gatgaagtac gatctggcca caggcatcga aagctcgcgc 660
 aaaaacgcgg ccaagggctc caacgagtgc accatgtgcy accgcaaatt tgtccacgcc 720
 tctgggctgg tgcgccacat ggagaagcat gccctggact tgatcccttc gcaaaccagc 780
 gagcaaccac atacgattcc ggctgccgga ctgcatgtgg tggttaagtg caactcgtgt 840
 ggccgcatct tctatgatcc gcaggtggct tttagacacg gccttattca cgattcggag 900
 cattcaacga tgcgtcaaag tccaatgacc caagtaccct ccaatagagc agatttcaat 960
 gagctgctgc tggatggcga gatgctgata gacaacgatc ccgcatctgc aacgagcaat 1020
 caaaacacaa acccaccgaa gaaggaaatg tttagcagcc tgatcttggg aagtgttttg 1080
 cagtgcgagt tttgcgagta cattttcgtc gacatagccg agctgcttgt ccattccgct 1140
 tcccatgtgg cggagcggcg ctttgagtgc accgcctgcy acattcagat gaacacggcc 1200
 aaggaagcca gcattccact ccagacggac tgcattttca tgcgcgaagc aatcaggtcc 1260
 ctaaagtca cgcttagtgc ctactttgtg tgtaatgtgt gcgagctgaa gtttgccaac 1320
 acggacctgc tccaggagca tcgggtgacc tcctttcact actttcctcg cctcaacgag 1380
 aatggcaaga agctcctgct gccctgtgac ttttgcyagc tcaactttga gttcgcccac 1440
 gatcttctgg cgcacagcga ggagaagcat ctcaacaaaa agaagcgcga aaaggaaacg 1500
 cgcaacacgg gcgcccggcc aatacgtcaa tatctctgcy atatctgcyg caaatcgtac 1560
 acccagtcaa gccatctgtg gcagcatcta cgctttcacc aggggtgtgaa gcccttcgct 1620
 tgccaggagg aaaactgtga toggaagttc accattcgcc cagatctgaa cgaccacatt 1680
 cgcaagtgcc acacgggcga gcgtccatat ctttgtctgg tgtgtggaaa gcgctttctc 1740
 accggatccg tcttctatca gcaccgtctg atccatcgcy gcgagcggcy ctatgagtgc 1800
 gaggagtgtg gtaaacgttt ctatcgcyg gacgcgctca agaatcacca acgcatccac 1860

ES 2 683 039 T3

	accggagaga agccgtacag ctgcctcttc tgcacgaaga cttttcgcca gcgcgggcgc	1920
	cgtgacaagc acatccgagc tcgacactct cacctggatg ccaactcgcg tctcatgatg	1980
	cagatgcaga agttccaact ggagacggcc gctgcgcaga aggctcaaag tcataatccc	2040
	gagcagcagg ataatgatgt tgctggtggt gccagcacct cagatgtgcc ctcgggctcg	2100
	ggattcatgt cgactgagcc aagcgtcgcg gagatgcagt actctattac gccggagcag	2160
	caggaggaaa tgggtgtgtgt gccattgac gaggtcaata acagtttctt tatgtcgcac	2220
	tacatgcaag ctgtcccat ggaggaggat ggttcggggc agcatatcat tgtcttcgag	2280
	cagccaggcc agaatatgga catgatgtcc atttacgac agcaacaggt tggggaacca	2340
	atgcatgaga gcggcgtgcc caagcggccg gctgagaaa atgctagggt ggtggttgc	2400
	aaaaacaatc caactaagcc gatattttcg gatacctatt tgtaa	2445
	<210> 44	
	<211> 1707	
	<212> DNA	
5	<213> Drosophila melanogaster	
	<400> 44	
	atgtcagttg atccactatc aatcgataat ttcacaatcc aatctgagat ctgogaagaa	60
	aacgagtttc tggcaaatat aggattacta tctacgaca caatgtcgcg tcatcaattg	120
	aagaaacca gaaagatggt ggcggcatgg caaacgatg aattatttat taaacgcca	180
	aatttcgccc cgcgtattag gatttccgaa aagccagaga tccagggaag aattaaacca	240
	ggcgtggcgt ccaaaaggac tgagaacttt acaaagaagc cgtccaatat atctgtagat	300
	gtttcggagg acgagaaagc gaaggaaaag gaaaaggagc aggatcccta ctccaatgac	360
	tttatacttg gcaagagatt gtacaatttc ctgaagtatc tcagctctca ccgttgatt	420
	tgggtgtgagt tcgtcgactc cttcctggac aagccgaccc tgaccatggg ctacgatatg	480
	aagcgcttca tagcggagta ctgtccgctc ctgcaactct gttcatgcc ccgcagagga	540
	tggcaattgg tacgtcggaa tatggggaag gcgcgtcgat tttcggccgc cttcatcgag	600
	ctggaacgcg aagaattgga gtgccagcgc cgcattgtgc gccagttgca gcagcataag	660
	ttcaatccca aggagaacgt gggctacttg gaccagatac ccaagcgtgt gccoctgcca	720
	ctggccaagg atgccacggt cagcagtttt ctgcacggaa actccttga gggcatcgtc	780
	aatggcactg tcatgggcta cgatccgcag gactacacct atctggttcg attcaataga	840
	aacgacaatg cagtcgtgct cagtottccg gattcacagc tctattccga cgaggaaacc	900
	gcggcggttc ccttgtaaat tattatgcgc ggcaacaaat cgtcctcggg tatttcggag	960
	agcgccaaga ccgagaagtt cggaaacaag aggtacacca aggaacttct ggaatcagtg	1020
	ctaagggttg gtaaactaca ggatgtcaag cacaagatcc tcatggactt ggcccgaatg	1080

ES 2 683 039 T3

	aatgaggatt tcgagacatt caaggagatt ggttcttcaa gtagtcgtcg cgatgccaa	1140
	gtcacacctc agcgtgagaa tctccagcgt cgctattcgg ccagcatgat aacgctgcac	1200
	cgagtgaacg ctgatatcct tgaaccgctg cgcacacctc acgactacct ggtcgagtat	1260
	cagaagcagg acgaggagga ggagtccaaa agaggctcgt cgcaccagca agtctatcag	1320
	aagtgtcgc tgcaggcggg acaggacctc aagactgccg cggatgagaa attcctgaag	1380
	atagaatcgg atcgcacgca ggagttcgtc cgcaaccttc acaccatact gtatctcaat	1440
	ggaaagctgg ggcgcgagaa cagctccaat ttggagacga ttatcgctga tctggttacc	1500
	cacatggtgg acaacatcca gccatcgctg ggccggaaat taaaagatgg cgtcgattcc	1560
	ctggagcctc tgcgtcagca ggtggtgcaa atattttaaag acgtcaaaaa accagagcgc	1620
	ttccaaatca cccagcaggc tccgatgcaa accgaggatg gtatctacaa ctttgtggtc	1680
	gaggcacagc cggataactcc cagctaa	1707
	<210> 45	
	<211> 1030	
	<212> DNA	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> plasmid	
	<400> 45	
	ccccatgta caaggtgca atcctttcga aaaccaatag cttcgtttgc agctgtacgt	60
	agggagtttg agaagagagc aggtgtgcaa aacgagtaga aaacaacttt tcaacgtcga	120
	accttccttg tgtttgttga cgggctgttt tgagtatatt ccatatgaca agtttgtgat	180
	ccgggtcgag tcgaaaaatata cataaaaaaca taatcacaat catgaaagct atgcttttgt	240
	accttttct ttcgctgtt atattcaagg gaccattatt aaaaacactt tctattttga	300
	tctttaaata acggttggtt agtgagcagt tgggtcaaaaa cgttgcttaa agttattgct	360
	acgtgagaga taattgtact gtgatcaact gaagactgaa agagaaacat aataaaatgg	420
	taactaaatt caccaaaaat gaatgtgaga gatttaaaaa aatattttga tagtcattta	480
	tactggcata caagggcgtg ccttgaaggg gttcctactg gacacactgg tactgggaat	540
	tttaataact ttgaagctaa aatactccca ttttcatttg tagcttttcg ttaaagtaac	600
	aatatatata tatttcaaat aatgtatcaa aaattttcca tataagcata ttttgaaaag	660
	atthtagtca gacgggaacg tgttaaaaat tagtttttca aattgcataa cttatccaag	720
	gatcagtaac caactataat atttaaagtg tgaatgaaa tccgcagtat cttcgactaa	780
	agaactgcag ttgatccga tagtaaattg agaagcggta aaaccttaag taaagtccaa	840
	aacttttttg ttctaataac atacaatgt acgtttcaaa tacttctttt gaatttctat	900
	cttgcacaa ttttctatct aactcaattt ttggttattg atttaagttt ttaggacatt	960
	tcataccagt aggagcaggc aataagatac taacggcgta tacgtaattg aatcgggaga	1020
10	taatttaaaa	1030
	<210> 46	
	<211> 795	
	<212> DNA	
	<213> artificial	

ES 2 683 039 T3

<220>

<223> plasmid

<400> 46

```

cccatgttac aaggctgcaa tccttcgaaa accaatagct tcgtttgag ctgtacgtag      60
ggagtttgag aagagagcag gtgtgcaaaa cgagtagaaa acaacttttc aacgtcgaac      120
cttccttgag tttgttgacg ggcgtttttg agtatattcc atatgacaag tttgtgatcc      180
gggccgagtc gaaaatatca taaaaacata atcacaatca tgaaagctat gcttttgtac      240
ccttttcttt cgcttggtat attcaagga ccattattaa aaacactttc tattttgatc      300
tttaataaac ggttgtttag tgagcagttg gtcaaaaacg ttgcttaaag ttattgctac      360
gtgagagata attgtactgt gatcaactga agactgaaag agaaacataa taaaatggtg      420
actaaattca ccaaaaatga atgtgagaga tttaaaaaaa tattttgata gtcatttata      480
ctggcataca agggcgtgcc ttgaaggggt tcctactgga cactctggta ctgggaattt      540
taataacttt gaagctaaaa tactccatt ttcatttcta gcttttcggt aaagtaacaa      600
tatatatata tttcaataa tgtatcaaaa attttccata taagcatatt ttgaaaagat      660
tttagtcaga cgggaacgtg ttaaaaatta gtttttcaa ttgcataact tatccaagga      720
tcagtaacca actataatat ttaaagtgtg aatggaaatc cgcagtatct tcgactaaag      780
aactgcagtt ggatc      795

```

5 <210> 47
 <211> 221
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>

10 <223> plasmid

<400> 47

```

tagaacaatc tcgtagcttc tacacttttg acatttggtt tttgtgcctc tataaatagg      60
gctgttcgct tgcaaccggc atcaattgaa ttggaaaaat acgcttgaaa gcaacttttc      120
gcgagcaac aaagaaagtg ttcttaaact attataattg caagtgatta ataaaggaat      180
tttatatttt gttctacgaa gttgatacat tgaaataaaa c      221

```

<210> 48
 <211> 233
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>

<223> plasmid

<400> 48

```

cgatagtaaa ttgagaagcg gtaaaacctt aagtaaagtc caaaactttt ttgttctaaa      60
tacatacaaa tgtacgtttc aaatacttct tttgaatttc tatcttgcac caattttcta      120
tctaactcaa tttttgggta ttgatttaag tttttaggac atttcatacc agtaggagca      180

```

20 ggtaataaga tactaacggc gtatacgtaa ttgaatcggg agataattta aaa 233

<210> 49
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Aedes aegypti

ES 2 683 039 T3

<400> 49

gccaacggat gtccacctcg acgacgacga tcaacctgcc ggcctgggaa gatgtcaaga 60
aatccttaca ttaacttctt cccgggatttc cgtaagaagc attgcggact ccaccccgtg 120
caagtgatcc ggatgggagc ccaagcttgg aactgtctcc gggatcaaga acgtcttccg 180
tacatccgga tggcgttcta caaacccatt cgtaggatgc cgtgccaac aagaattcgc 240
cgtcagcgtc gtagaccaag ccgtagcagg agccaaagcc gctgcagaat gagctgccct 300
atgccgaaga aacgacgacg atgc 324

<210> 50

<211> 30

5 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> Spacer sequence

<400> 50

10 tctggaggcg gtgctcagg cggaggaggc 30

<210> 51

<211> 591

<212> DNA

<213> Planomicrobium okeanokoites

15 <400> 51

cagctgggta agagcgagct ggaggaaaag aagtccgagc tgcgccacaa gctgaagtac 60
gtgccccacg agtacatcga gctgatcgag atcgccccga atagcaccca ggaccgcatc 120
ctggagatga aggtgatgga attcttcatg aaggtgtacg gctaccgagg caagcacctg 180
ggcggcagcc gcaagcccga cggagccatc tacaccgtgg gcagcccat cgattacggc 240
gtgatcgtgg ataccaaggc ctacagcggc ggctacaacc tgcccattgg acaggccgac 300
gagatgcagc gctacgtgga ggaaaaccag acccgcaaca agcacatcaa ccccaacgag 360
tgggtggaag tgtaccccag cagcgtgacc gagttcaagt tcctgttcgt gagcggccac 420
ttcaagggca actacaaggc ccagctgacc cgcctgaacc acatcaccaa ctgcaacgga 480
gccgtgctgt ccgtggagga actgctgatc ggcggcgaga tgatcaaggc cggcaccctg 540
accctggaag aagtgcgccg caagttcaac aacggcgaga tcaacttcta a 591

<210> 52

<211> 945

20 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Aeprotamine from Aedes aegypti, Fok1 from Planomicrobium okeanokoites

<400> 52

ES 2 683 039 T3

gccaacggat gtccacctcg acgacgacga tcaacctgcc ggctgggaa gatgtcaaga 60
aatccttaca ttaacttctt ccgggatttc cgtaagaagc attgctggact ccaccccgctg 120
caagtgatcc ggatgggagc ccaagcttgg aactgtctcc gggatcaaga acgtcttccg 180
tacatccgga tggcgttcta caaacccatt cgtaggatgc cgtgccaac aagaattcgc 240
cgtcagcgtc gtagaccaag ccgtagcagg agccaaagcc gctgcagaat gagctgcctt 300
atgccgaaga aacgacgacg atgctctgga ggcggtggct caggcgggtg aggccagctg 360
gtgaagagcg agctggagga aaagaagtcc gagctgcgcc acaagctgaa gtacgtgcc 420
cacgagtaca tcgagctgat cgagatcgcc cgcaatagca cccaggaccg catcctggag 480
atgaaggtga tggaattctt catgaaggtg tacggctacc gcgcaagca cctgggcggc 540
agccgcaagc ccgacggagc catctacacc gtgggcagcc ccatcgatta cggcgtgatc 600
gtggatacca aggcctacag cggcggctac aacctgccca ttggacaggc cgacgagatg 660
cagcgtacg tggaggaaaa ccagaccgc aacaagcaca tcaaccccaa cgagtgggtg 720
aaggtgtacc ccagcagcgt gaccgagttc aagttcctgt tcgtgagcgg cacttcaag 780
ggcaactaca aggccagct gaccgcctg aaccacatca ccaactgcaa cggagccgtg 840
ctgtccgtgg aggaactgct gatcggcggc gagatgatca agccggcac cctgaccctg 900
gaagaagtgc gccgcaagtt caacaacgac gagatcaact tctaa 945

<210> 53
<211> 38
<212> DNA
5 <213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 53
ctcccgtgc atatcctagg ccccatgta caaggctg 38
10 <210> 54
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
15 <223> Primer
<400> 54
agccatttg gtaattgaa atccctaaaa taaatgta tcatcttcg 50
<210> 55
<211> 24
20 <212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> Primer
<400> 55
25 gtaactccg ttctgagac aaca 24
<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
30 <220>

ES 2 683 039 T3

<223> Primer

<400> 56

cgatatggag tgggtgaaac ctca 24

REIVINDICACIONES

1. Sistema de expresión génica de la línea germinal masculina de artrópodo adecuado para la expresión condicional de un gen efector en una línea germinal masculina de artrópodo, comprendiendo el sistema:
- 5 - una primera unidad de expresión comprendiendo un gen efector y un promotor para este ligado de forma funcional al mismo;
 - una segunda unidad de expresión comprendiendo una secuencia de codificación para un factor de transcripción y un elemento regulador en la dirección 5' ligado de forma funcional a este, siendo capaz el factor de transcripción de actuar sobre el promotor en la primera unidad de expresión para conducir la expresión del gen efector, incluyendo el elemento regulador en la dirección 5':
 - 10 - un promotor para el factor de transcripción, donde el promotor es de *Beta-2 Tubulin (B2T)*, *matotopetli (topi)* o *always early (aly)*; y
 - una 5'-UTR adyacente a un sitio de inicio para la secuencia de codificación del factor de transcripción, donde la 5'-UTR es de *heat shock protein 83 (hsp83)*, *aly*, o *topi*;
 - 15 conduciendo el elemento regulador en la dirección 5' la suficiente expresión del factor de transcripción de tal forma que la proteína del factor de transcripción conduce a su vez la transcripción del gen efector antes de la meiosis.
2. Sistema de expresión génica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el factor de transcripción es un activador transcripcional, como tTA, GAL4 o sus variantes.
3. Sistema de expresión génica de acuerdo con la reivindicación 1, donde el efector es una endonucleasa, más preferiblemente una nucleasa de dedos de 3-Zn.
- 20 4. Sistema de expresión génica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el promotor de la primera unidad de expresión es un promotor mínimo.
5. Sistema de expresión génica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la 5'-UTR de *hsp83* en el elemento regulador en la dirección 5' en la segunda unidad de expresión es la de la mosca mediterránea de la fruta o el artrópodo objetivo.
- 25 6. Sistema de expresión génica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde se utiliza el sistema Gal4-UAS, de tal forma que el factor de transcripción es GAL4.
7. Sistema de expresión génica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el sistema es un sistema inducible, donde la inducción tiene lugar mediante el suministro o ausencia de una entidad química, como tetraciclina o uno de sus análogos incluida doxiciclina.
- 30 8. Sistema de expresión génica de acuerdo con la reivindicación 7, donde el factor de transcripción en la segunda unidad de expresión es tTA o una variante de este (tTAV, tTAV2, tTAV3).
9. Sistema de expresión génica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el factor de transcripción de la segunda unidad de expresión es tTA o una variante y la primera unidad de expresión incluye el operador tet (tetO).
- 35 10. Sistema de expresión génica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el artrópodo es un insecto, preferiblemente un díptero, incluido un tefrítido, como una mosca mediterránea de la fruta o una mosca del olivo.
11. Sistema de expresión génica de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la nucleasa confiere o transmite letalidad de efecto paternal.
- 40 12. Método para expresar una proteína efectora en una gónada de un artrópodo o esperma de un artrópodo comprendiendo la transformación de la gónada con el sistema de expresión de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
13. Método de control de población de artrópodos comprendiendo la expresión de la proteína efectora del sistema de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en las gónadas de un artrópodo macho.
- 45 14. Método de gestión de la resistencia en artrópodos comprendiendo el uso del sistema de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
15. Método de control de calidad, comprendiendo la inclusión de un indicador, como una proteína fluorescente como, o además de, la proteína efectora en el sistema de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, de tal forma que los individuos de artrópodo en los que se ha inducido o desreprimido la expresión del sistema se tornan visibles con longitudes de onda de luz adecuadas.
- 50

- 5 **16.** Método de determinación de un estado de apareamiento de un artrópodo hembra, comprendiendo el uso del sistema de expresión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en una población de machos transgénicos, donde dicho sistema comprende un marcador como una proteína indicadora fluorescente; y donde el esperma está presente, evaluando la presencia de dicho marcador en la hembra; siendo la presencia del marcador indicativa de que la hembra se ha apareado con un macho transgénico portador del sistema.

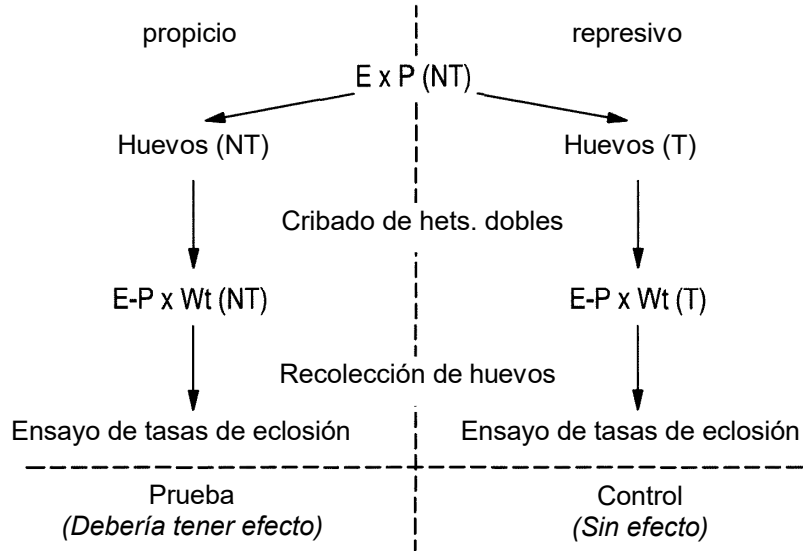


Figura 1. Diseño del ensayo de tasa de eclosión de huevos

OX4282 (PB-HrIE-AmCyan-SV40-TurboGFP-teto14-ccTubulin-hsp83-tTAV-SV40) x
OX4104 (PB-YAFN-hsp83-tetO21-Hr5-IE1-Red)

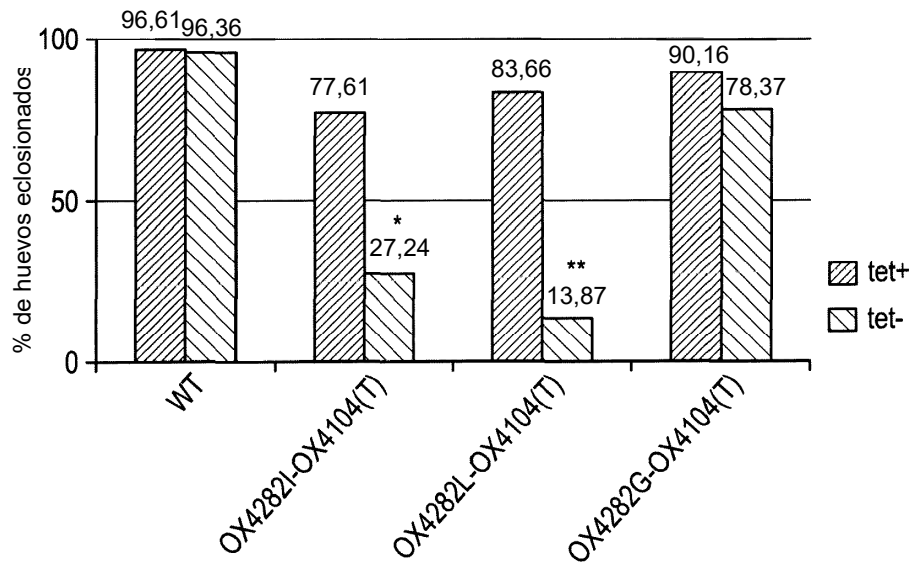


Figura 2. Porcentaje de esterilidad masculina de OX4282-OX4104 con y sin Tetraciclina

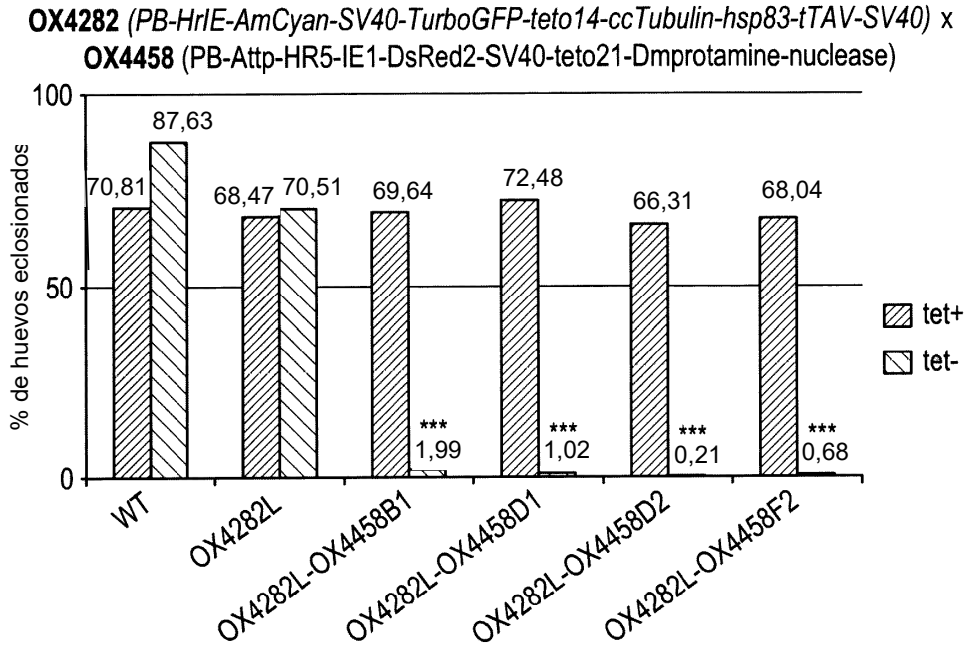


Figura 3. Porcentaje de esterilidad masculina de OX4282-OX4458 con y sin Tetraciclina

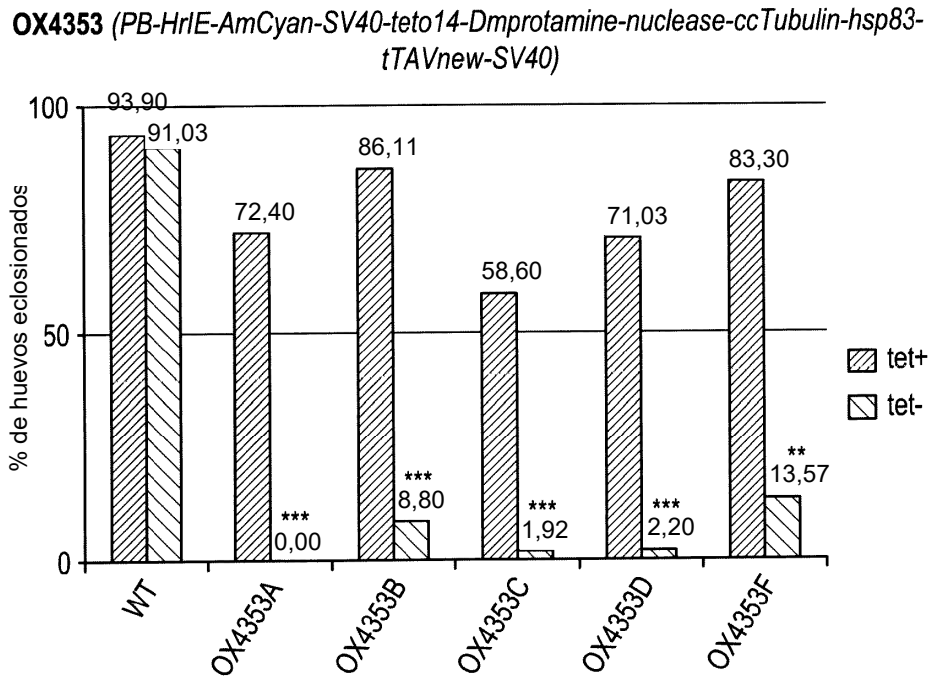


Figura 4. Porcentaje de esterilidad masculina de OX4353 con y sin Tetraciclina

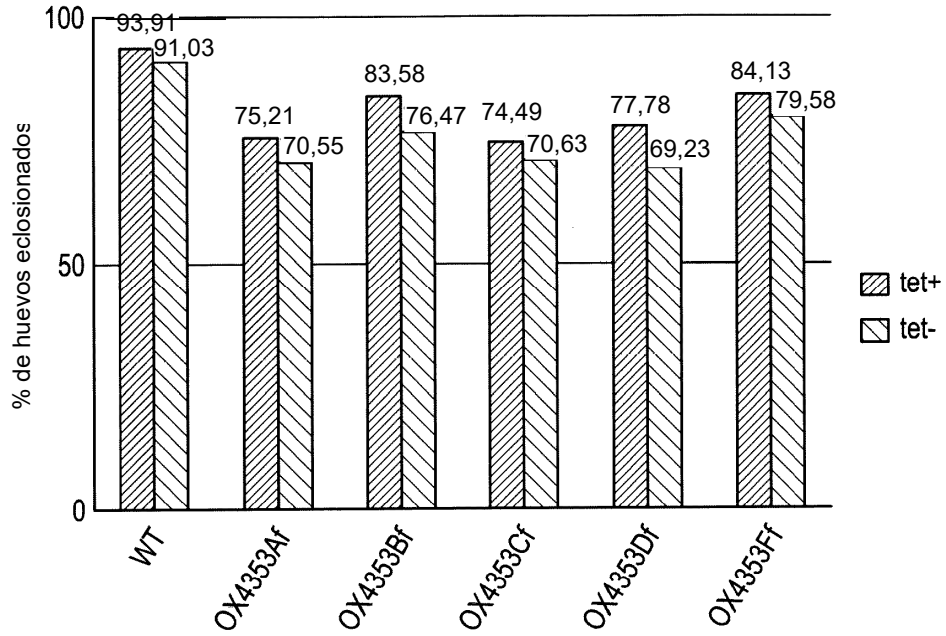


Figura 5. Porcentaje de esterilidad femenina de OX4353 con y sin Tetraciclina

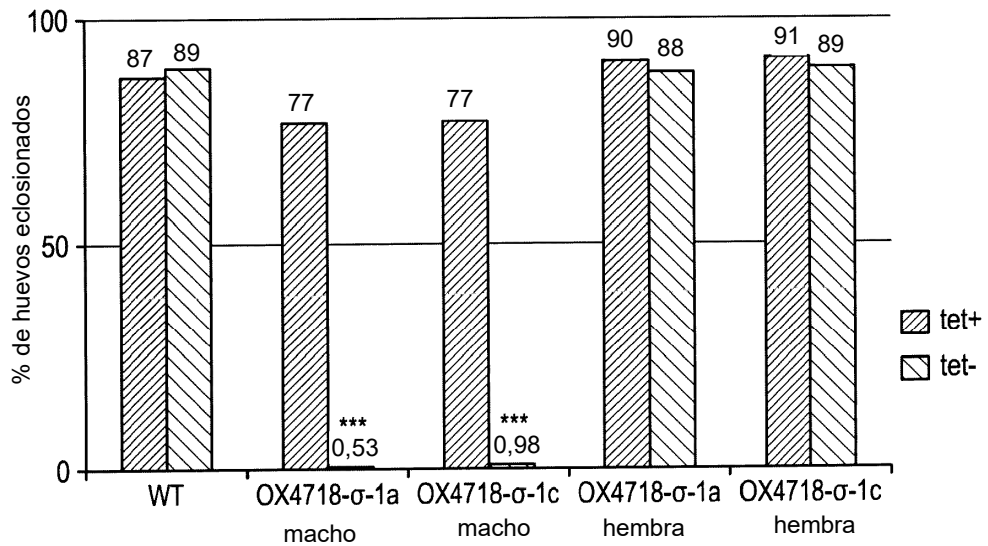


Figura 6. Esterilidad reprimible específica en machos en las líneas OX4718-σ1

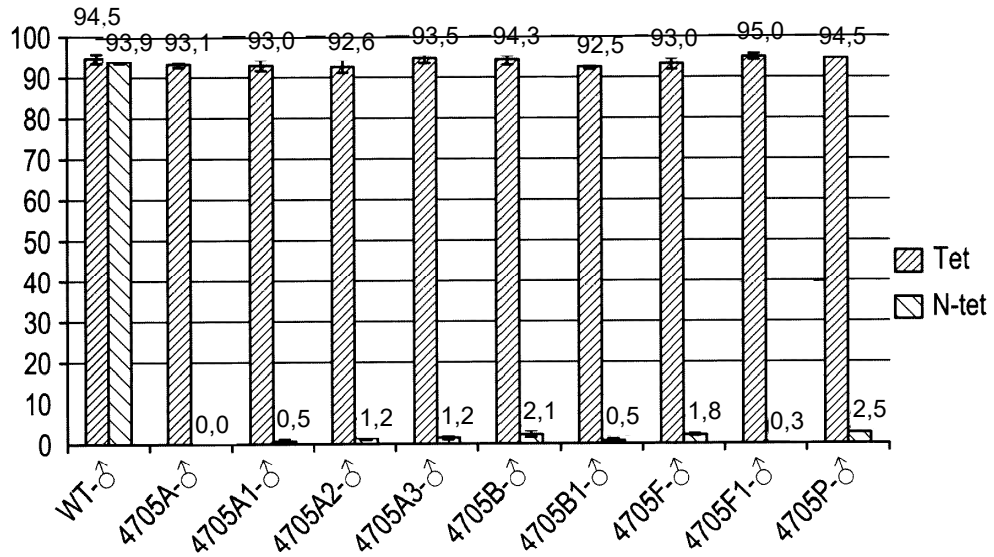


Figura 7. Porcentaje de esterilidad masculina de la mosca del olivo OX4705 con y sin Tetraciclina

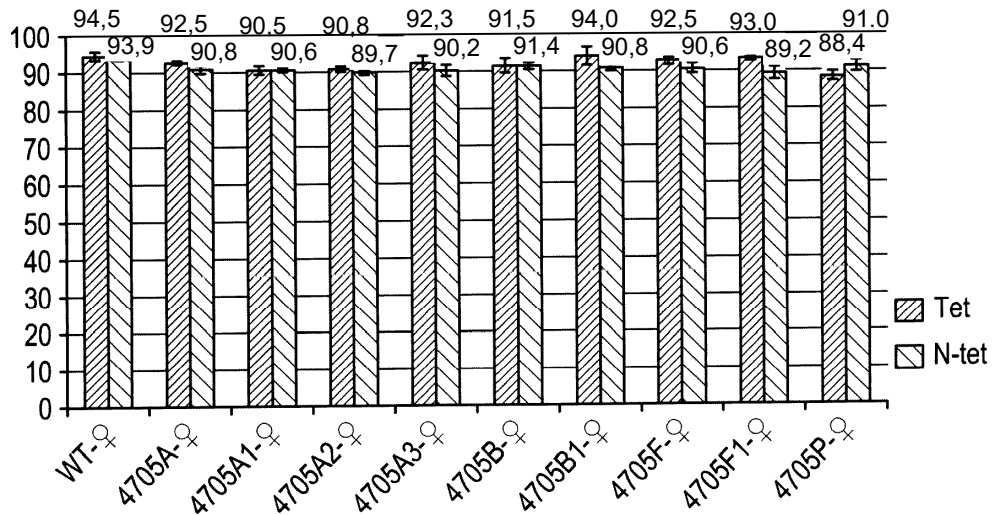


Figura 8. Porcentaje de esterilidad femenina de OX4705 con y sin Tetraciclina

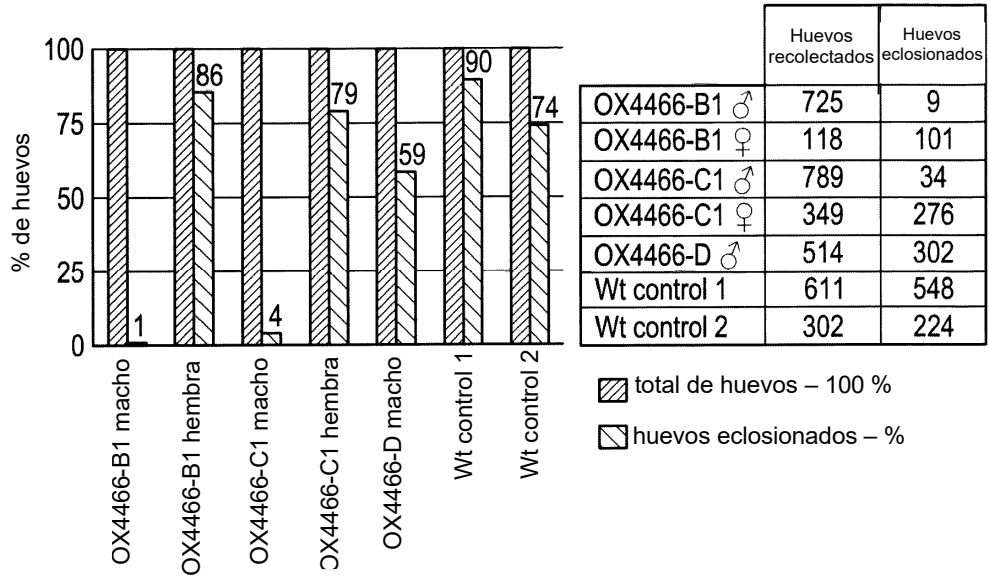


Figura 9. Ensayo de tasa de eclosión de huevos en la cepa OX4466

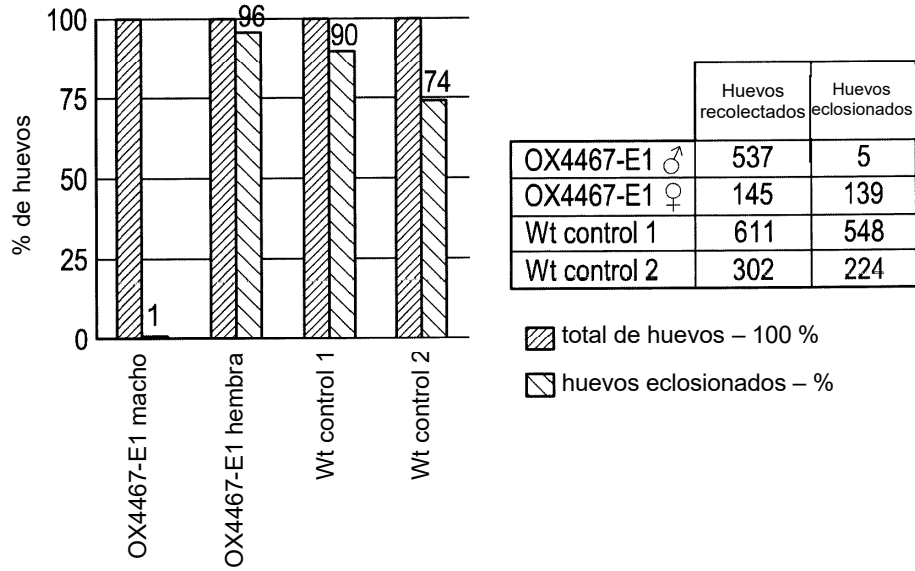


Figura 10. Ensayo de tasa de eclosión de huevos en la cepa OX4467-E1

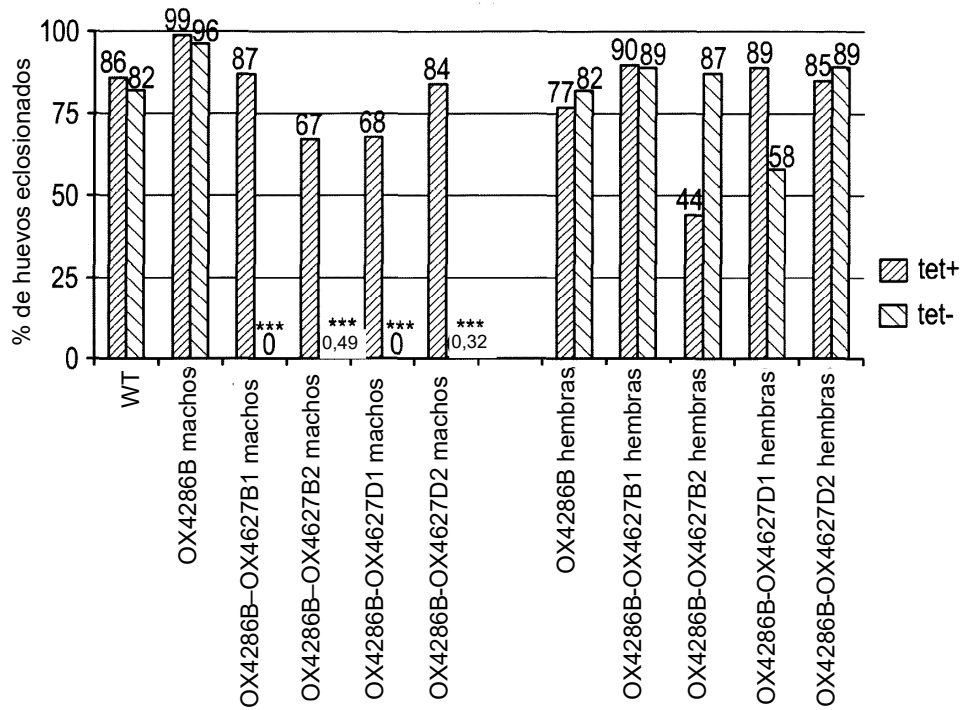


Figura 11. Ensayo de tasa de eclosión de las líneas de *Aedes aegypti* portadoras de los alelos tanto *topi-tTav* como *tetO-Dm-Protamine-FokI*

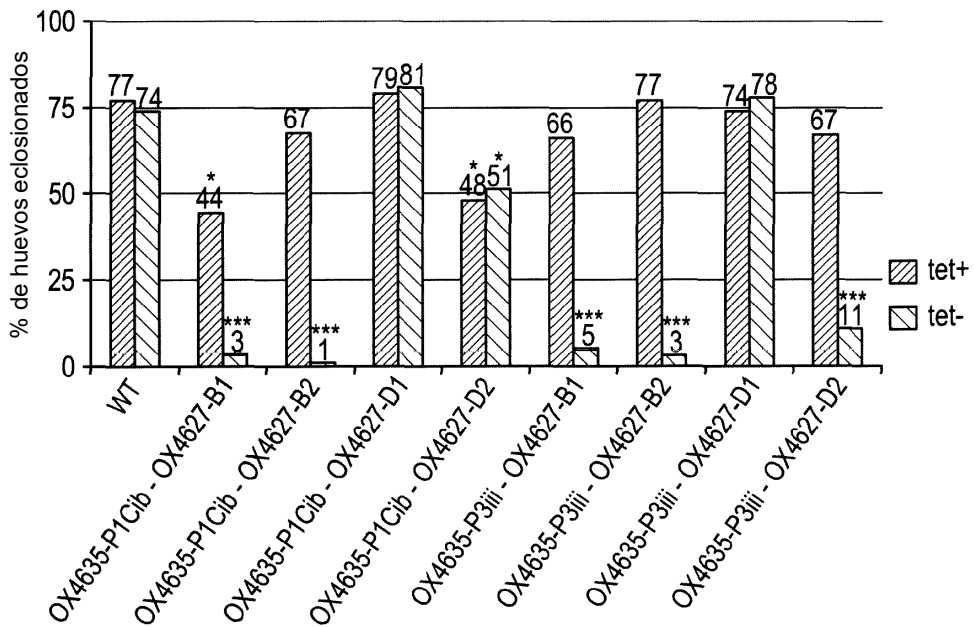


Figura 12. Ensayo de tasa de eclosión de las líneas de *Aedes aegypti* portadoras de los alelos tanto $\beta 2$ -tubulin-*tTav* como *tetO-Dm-Protamine-FokI*

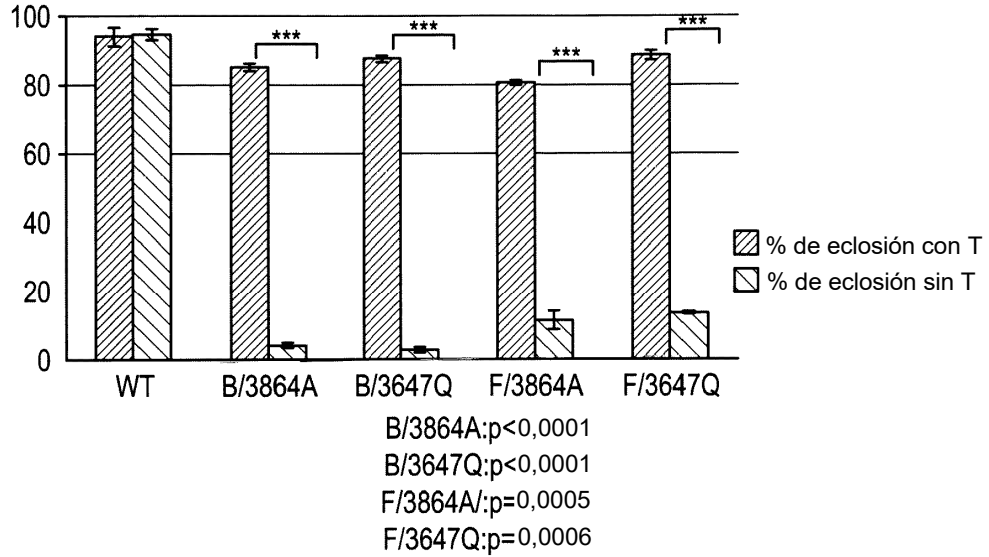


Figura 13. Cepas de OX4353 cruzadas con dos líneas letales femeninas de RIDL principales (OX3864A y OX3647Q).

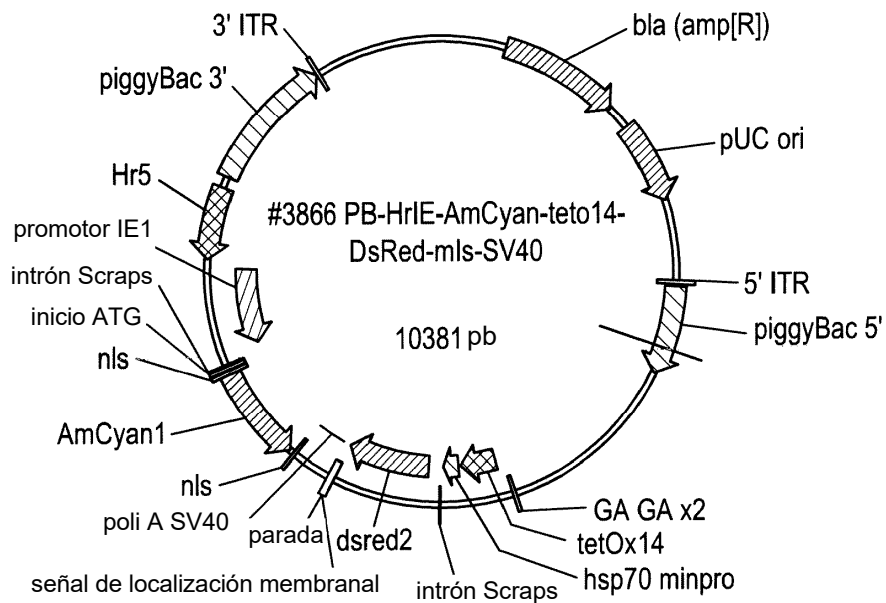


Figura 14. Mapa de plásmido de OX3866

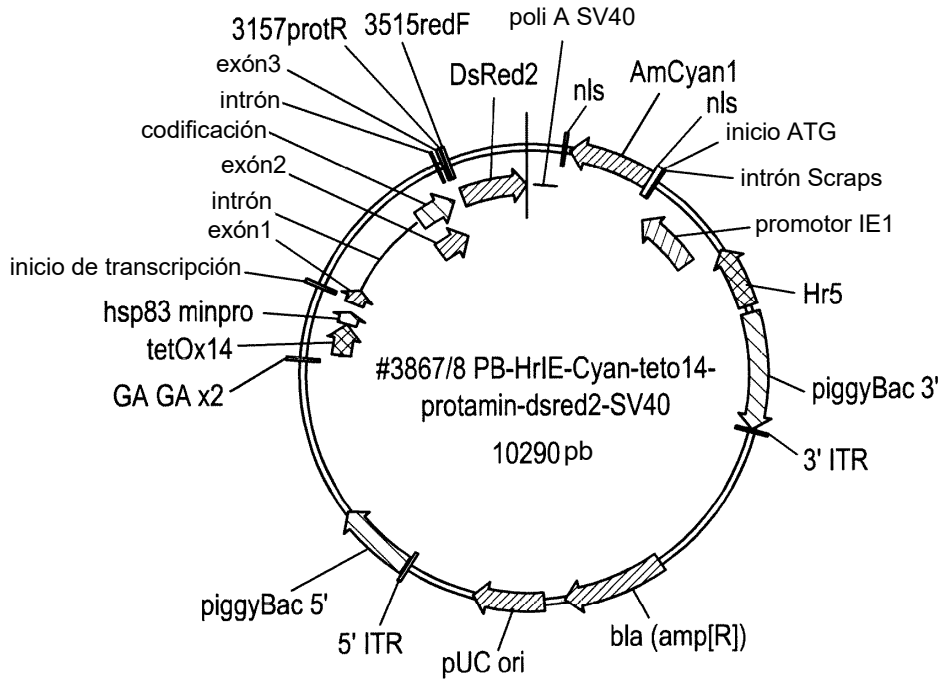


Figura 15. Mapa de plásmido de OX3867

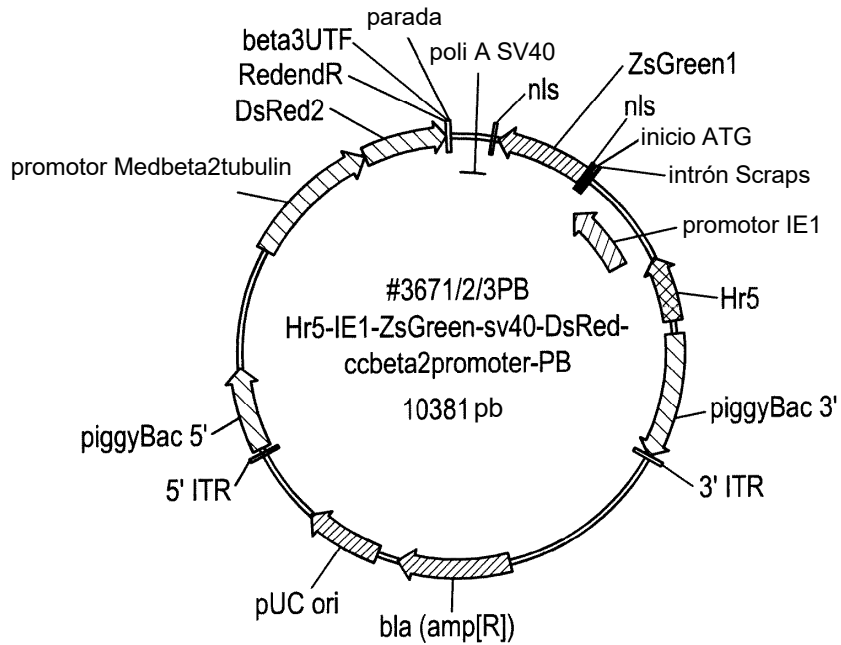


Figura 16. Mapa de plásmido de OX3671

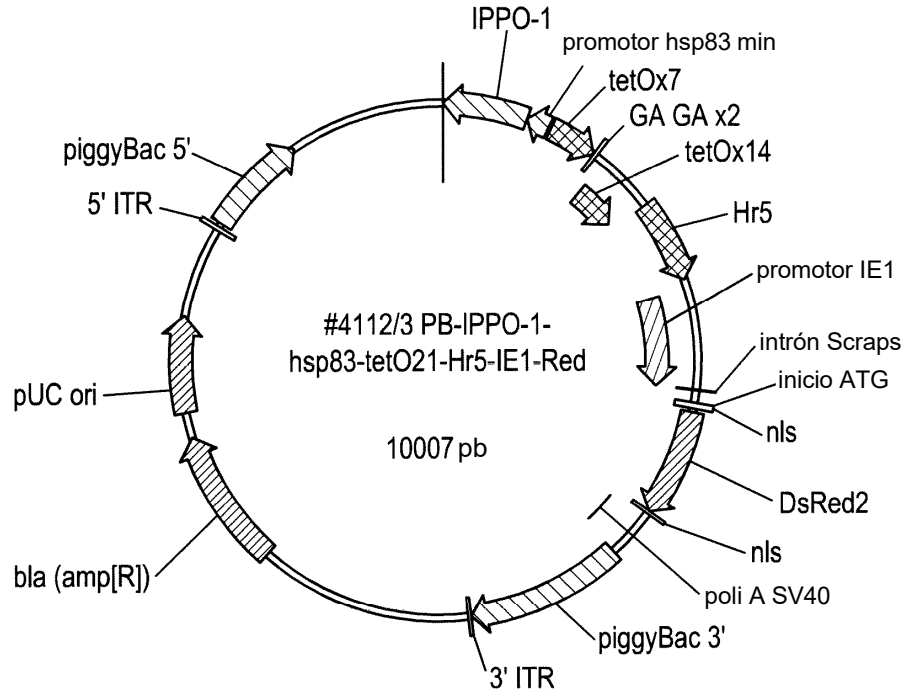


Figura 17. Mapa de plásmido de OX4112

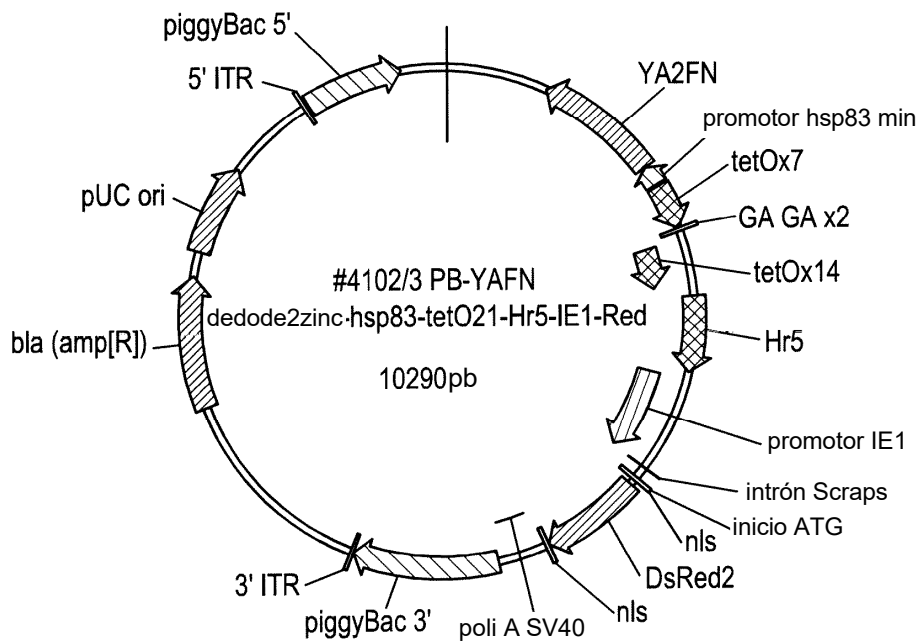


Figura 18. Mapa de plásmido de OX4103

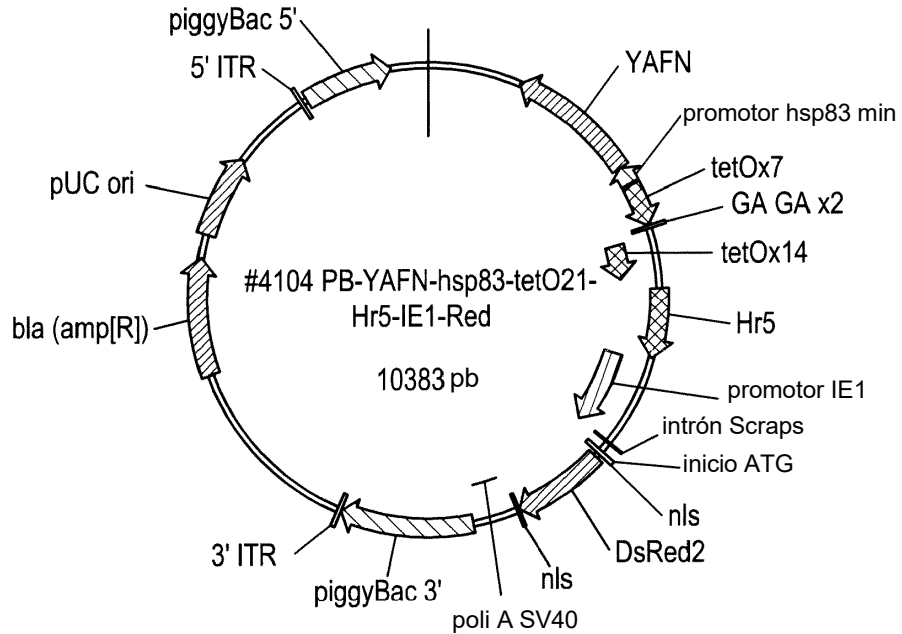


Figura 19. Mapa de plásmido de OX4104

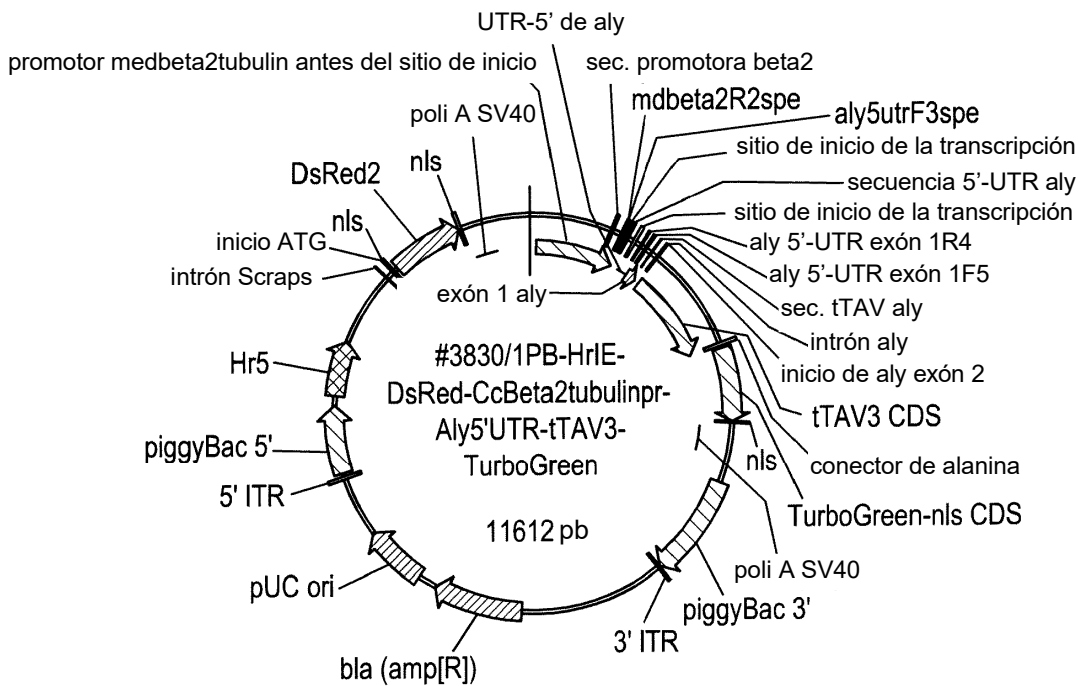


Figura 20. Mapa de plásmido de OX3831

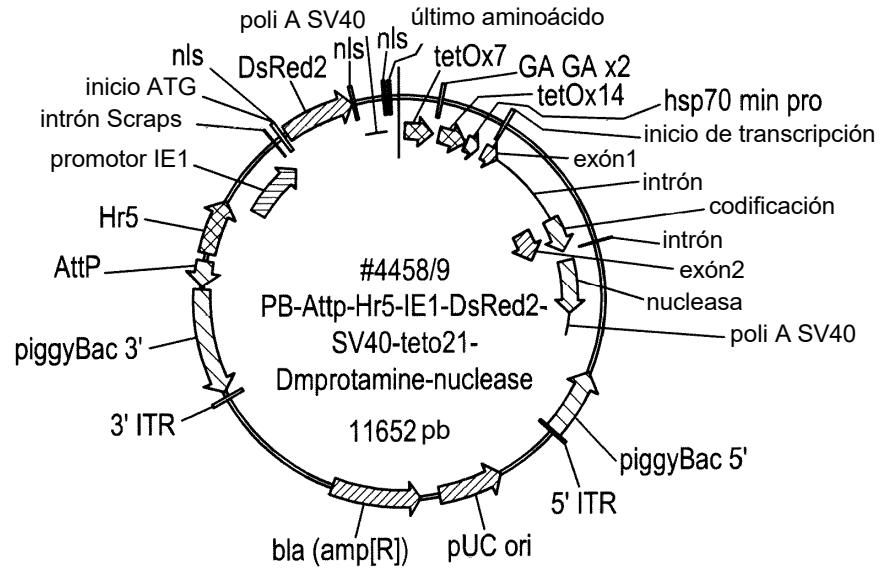


Figura 21. Mapa de plásmido de OX4458

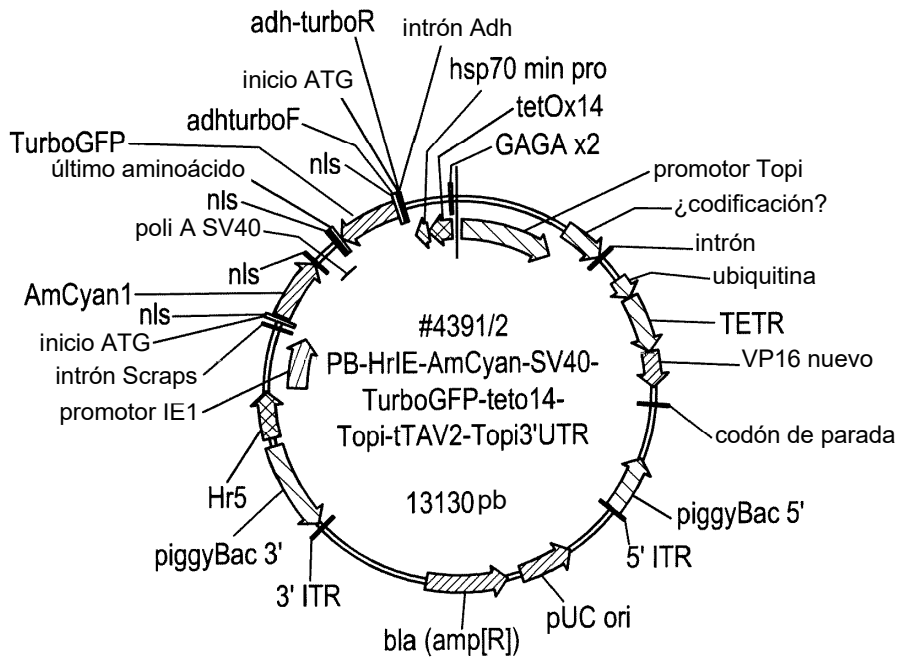


Figura 22. Mapa de plásmido de OX4391

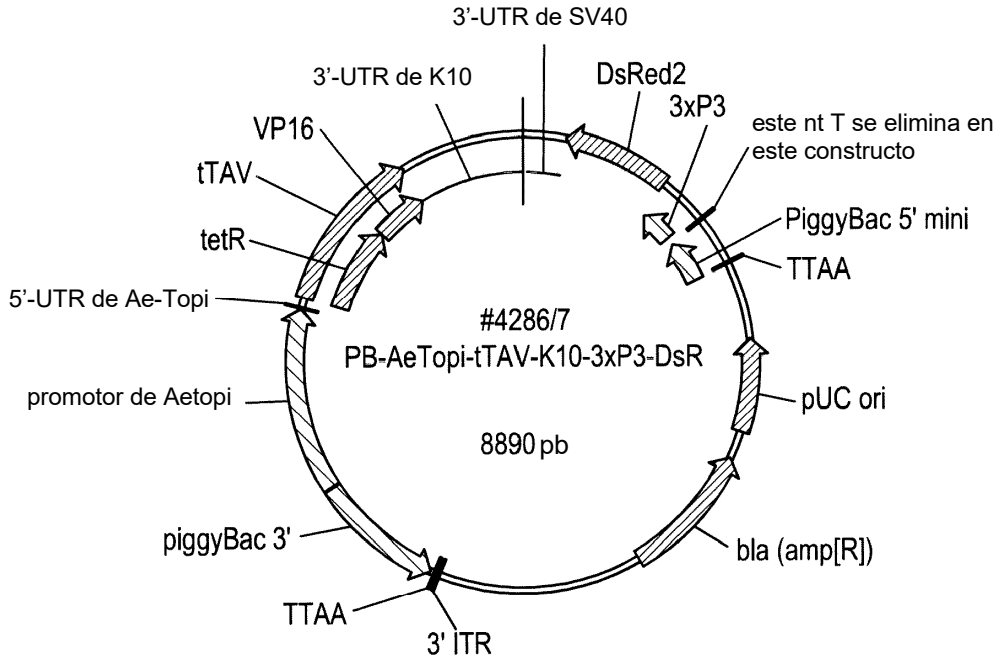


Figura 23. Mapa de plásmido de OX4286

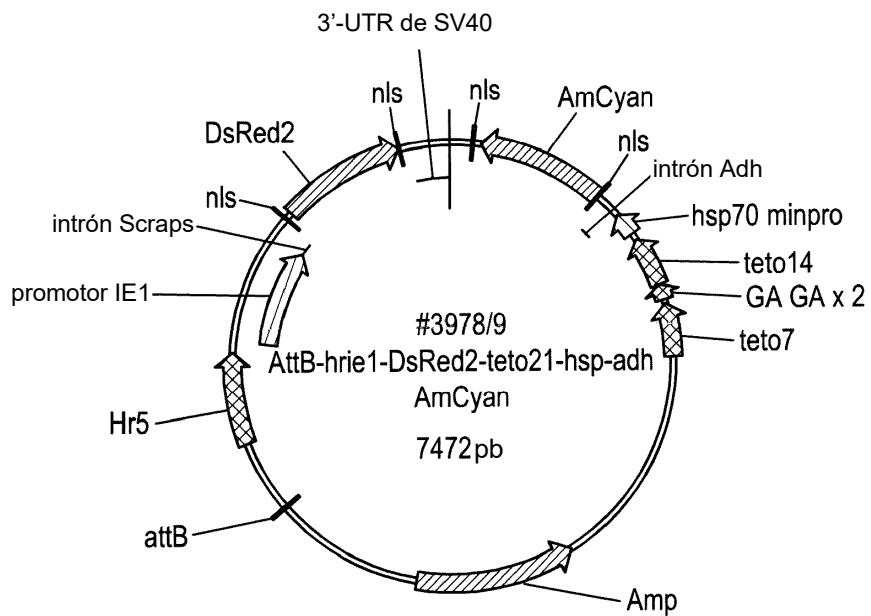


Figura 24. Mapa de plásmido de OX3978

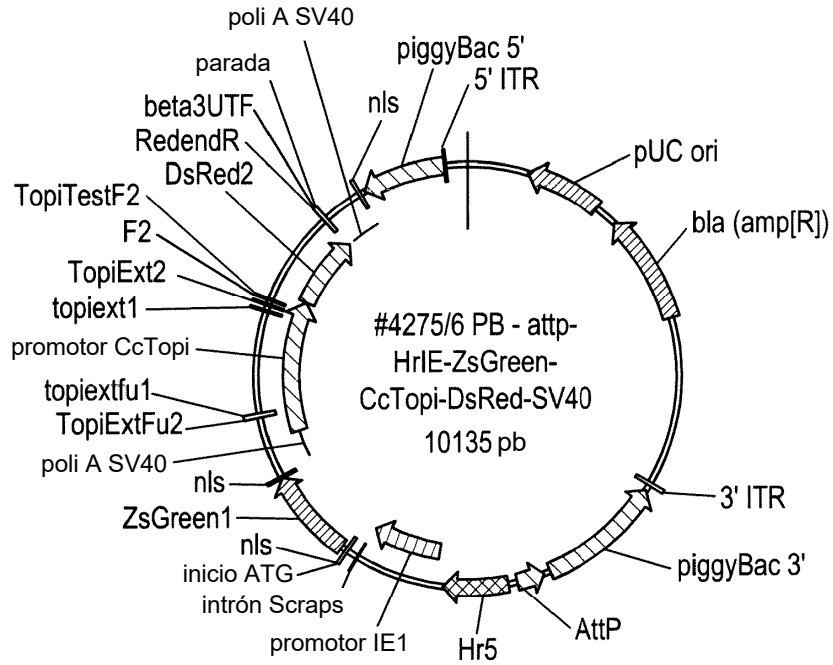


Figura 25. Mapa de plásmido de OX4275

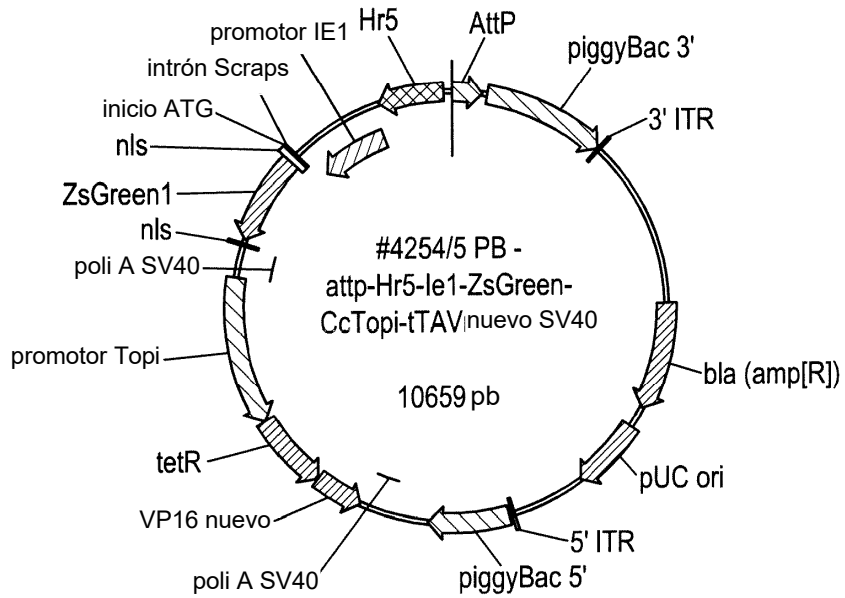


Figura 26. Mapa de plásmido de OX4254

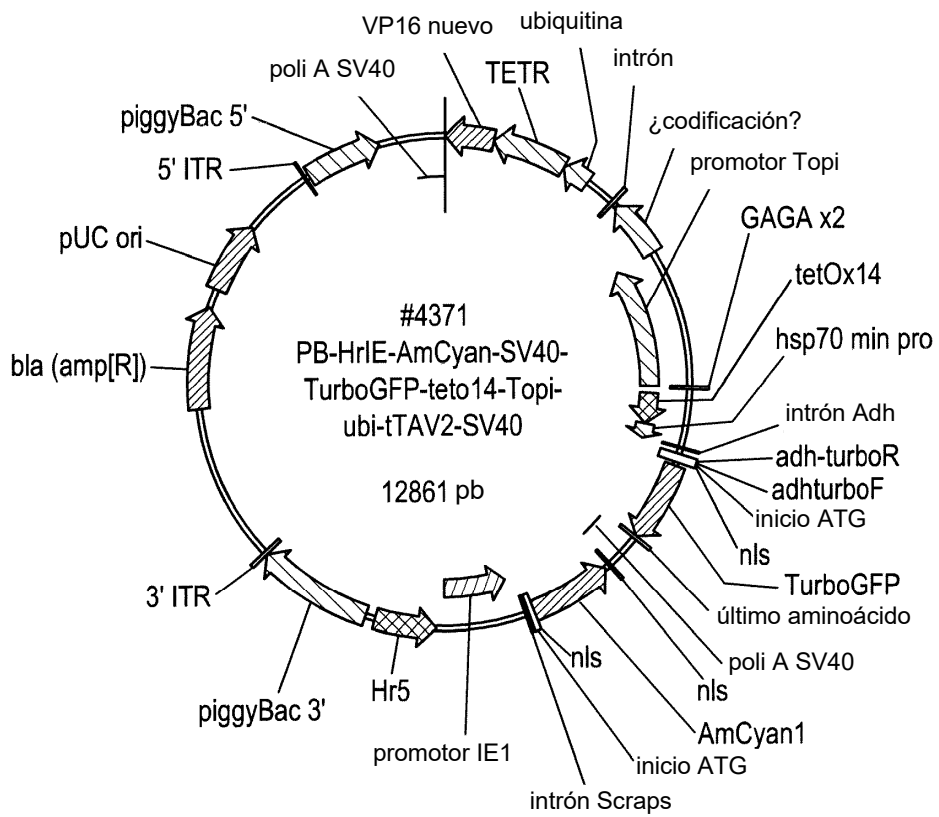


Figura 27. Mapa de plásmido de OX4371