

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 803**

51 Int. Cl.:

C12N 15/67 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14151581**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14729497 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2970990**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para la producción y administración de ARN**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361793506 P

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

28.11.2018

73 Titular/es:

**MONSANTO TECHNOLOGY LLC (100.0%)
800 North Lindbergh Boulevard Mail Zone E1NA
St. Louis, MO 63167, US**

72 Inventor/es:

**BAUM, JAMES A.;
CHRISTIAN, ALLEN T.;
EVDOKIMOV, ARTEM;
MOSHIRI, FARHAD;
WEAVER, LISA MARIE y
ZHANG, HAITAO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 691 803 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

Composiciones y procedimientos para la producción y administración de ARN

5 Esta solicitud contiene una lista de secuencias, presentada junto con la presente electrónicamente a través del sitio web de EFS, que contiene el archivo llamado "P34118WO00_59609_2014_03_10_v2ST25.txt" que tiene un tamaño de 11.512 bytes (medido en Windows XP), que se creó el 10 de marzo de 2014.

Antecedentes

Campo

10 Se proporcionan construcciones de vectores útiles para la expresión *in vitro* e *in vivo* de ARN. También se proporcionan sistemas de expresión celular para producir ARN y proteína *in vivo*. También se proporcionan procedimientos y composiciones para proporcionar ARNbc transcrito *in vivo* a organismos diana.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las plantas transgénicas y las secuencias que regulan la expresión de un transgén en una planta son bien conocidas e incluyen secuencias terminadoras transcripcionales. Por ejemplo, la patente EP 2 530 159 A1, Wilson y col., 1995 (PAPNAS, vol. 92, 8793-8797) y Lesnik, 2001 (Nucleic Acids Research, vol. 29, 3583-3594) desvelan cada una sistemas de expresión que comprenden secuencias terminadoras. Además, la publicación de Unniraman, 2001 (Journal of Biological Chemistry, vol. 276, 41850-41855) desvela un algoritmo para la predicción de señales de terminación de transcripción intrínseca en eubacterias. Los vectores también están disponibles en el mercado los cuales comprenden secuencias terminadoras transcripcionales (por ejemplo, las secuencias t0 y T1 como se describe en QIAexpress System, Qiagen, 2003, 1, 15).

20 Los cultivos comerciales son a menudo los objetivos del ataque de virus o plagas como insectos o nematodos. La infestación de plagas y la infección viral pueden tener un efecto negativo significativo sobre el rendimiento del cultivo. Los plaguicidas químicos han sido muy efectivos en la erradicación de infestaciones de plagas; sin embargo, existen desventajas en el uso de plaguicidas químicos. Los agentes químicos plaguicidas no son selectivos y pueden ejercer un efecto sobre los insectos beneficiosos y otros organismos así como en la plaga diana. Los agentes químicos plaguicidas persisten en el medio ambiente y, en general, se metabolizan lentamente, en todo caso. Se acumulan en la cadena alimentaria, y particularmente en las especies depredadoras más altas, en las que pueden afirmar efectos negativos. Las acumulaciones de agentes químicos plaguicidas también dan como resultado el desarrollo de resistencia a los agentes. Por lo tanto, existe la necesidad de procedimientos alternativos para controlar o erradicar la infestación de insectos sobre o en las plantas; procedimientos que son selectivos, ambientalmente inertes, no persistentes, biodegradables y que encajan bien en los esquemas de manejo de resistencia a plagas.

35 Se ha demostrado que las moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) median en la inhibición de genes específicos dirigidos a diversos organismos a través de un mecanismo conocido como ARN de interferencia (ARNi). El ARNi utiliza rutas celulares endógenas mediante las cuales un ARN bicatenario, que comprende secuencias de nucleótidos complementarias que se corresponden sustancialmente con el sentido y el antisentido de una secuencia diana, media la degradación del ARNm de interés o la traducción disminuida de la proteína del molde del ARNm. Las proteínas efectoras de la ruta de ARNi incluyen el complejo de proteína Dicer que genera pequeños ARN de interferencia (ARNip) a partir del ARNbc original y el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que usa guías de ARNip para reconocer y degradar o bloquear la traducción de los ARNm correspondientes. Solo se afectan transcritos complementarios a los ARNip, y, por lo tanto, la caída de la expresión del ARNm suele ser específica de la secuencia. El efecto de silenciamiento génico del ARNi puede persistir durante días y, en condiciones experimentales, en algunos casos puede llevar a una disminución de la abundancia del transcrito dirigido del 90 % o más, con la consiguiente disminución de los niveles de la proteína correspondiente. Los niveles de proteína también pueden perturbarse bloqueando la traducción sin afectar significativamente los niveles del transcrito de ARNm.

45 Si bien las moléculas de ARNbc son prometedoras como una alternativa selectiva y ambientalmente inerte a los agentes químicos plaguicidas para controlar o erradicar la infestación de plagas de las plantas, las restricciones en la cantidad de ARNbc que pueden producirse mediante los procedimientos de expresión tradicionales *in vitro* e *in vivo* y los costos asociados con el ARNbc de producción y purificación presentan una barrera para su uso para controlar la infestación de plagas y enfermedades en plantas de cultivo. Por lo tanto, existe la necesidad de medios eficientes y rentables para producir cantidades a escala comercial de ARNbc.

Sumario

55 La presente invención proporciona un terminador transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende un primer terminador de la transcripción, un segundo terminador de la transcripción, un tercer terminador de la transcripción y un cuarto terminador de la transcripción que forman una estructura secundaria que comprende cuatro horquillas de tamaño mediano, y en la que el primer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 9, el segundo terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 5, el tercer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 6 o 7, y el cuarto terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO:

5.

La presente solicitud también proporciona una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende:

- (a) un promotor;
- (b) una primera secuencia de ácido nucleico posicionada transcripcionalmente corriente abajo del promotor, en la que la primera secuencia de ácido nucleico codifica un ARNbc o una proteína; y
- (c) una segunda secuencia de ácido nucleico, posicionada 3' a la primera secuencia de ácido nucleico, en la que la segunda secuencia de ácido nucleico comprende un primer terminador de la transcripción, un segundo terminador de la transcripción, un tercer terminador de la transcripción y un cuarto terminador de la transcripción que forman una estructura secundaria que comprende cuatro horquillas de tamaño mediano, en la que el primer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 9, el segundo terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 5, el tercer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 6 o 7, y el cuarto terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 5; y

en la que la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están unidas de forma operacional al promotor, y en la que el promotor y las secuencias terminadoras de la transcripción están en combinación funcional.

En una realización adicional, la presente invención también proporciona un procedimiento para mejorar la producción de ARN o proteínas que comprende proporcionar la construcción de expresión obtenida por ingeniería descrita anteriormente para una célula huésped bacteriana, fúngica o vegetal.

En una realización relacionada, la presente invención proporciona un vector que comprende la construcción de expresión obtenida por ingeniería descrita anteriormente, en el que el vector es un vector plasmídico.

La invención proporciona además una célula huésped bacteriana que comprende el vector descrito anteriormente.

Como alternativa, la invención proporciona un sistema de cultivo celular para la síntesis *in vivo* de ARNbc que comprende la célula huésped bacteriana de la reivindicación 11 o 12 y un medio de crecimiento, en el que el medio de crecimiento comprende preferentemente 3,2 % de triptona, 2 % de extracto de levadura, 0,5 % > de NaCl, 1 % de glicerol, 0,1 % de glucosa, 0,4 % de alfa-lactosa, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50mM, KH_2PO_4 10 mM, Na_2HPO_4 40 mM, MgSO_4 2 mM.

En un aspecto separado, la invención proporciona una composición para controlar una infestación de plagas de invertebrados o para inhibir la propagación de una enfermedad viral en una población de plantas que comprende:

- (a) la célula huésped bacteriana descrita anteriormente, en la que la célula huésped bacteriana está muerta y no está lisada; o
- (b) un lisado de la célula huésped bacteriana descrita anteriormente.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un procedimiento para controlar una infestación de plagas de invertebrados o para inhibir la propagación de una enfermedad viral en una población de plantas que comprende aplicar la composición anterior a una planta.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1A** representa una representación esquemática de una construcción de expresión de ARNbc obtenida por ingeniería que comprende en una dirección de 5' a 3', un promotor unido de forma operacional a un fragmento de ADN sentido, una región de codificación de bucle, un fragmento de ADN antisentido complementario, un primer terminador transcripcional y un segundo terminador transcripcional.

La **Figura 1B** representa una representación esquemática de una construcción de expresión de ARNbc obtenida por ingeniería que comprende en una dirección de 5' a 3', un promotor unido de forma operacional a un fragmento de ADN antisentido, una región de codificación de bucle, un fragmento de ADN de sentido complementario, un primer terminador transcripcional y un segundo terminador transcripcional.

La **Figura 2A** representa una representación esquemática del vector pCPB-hp.

La **Figura 2B** representa una representación esquemática del vector pCPB-hp + 2T.

La **Figura 2C** muestra un mapa parcial del vector pCPB-hp + 2T.

La **Figura 3A** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN total aislado de 20 ul del cultivo desarrollado durante una noche a 37 °C (calles izquierdas) o a 25 °C (calles derechas). Las calles marcadas con un "1" muestran el ARN total aislado de pUC19/bacterias HT115 (DE3). Las calles marcadas con un "2" muestran el ARN total aislado de pCPB-hp/bacterias HT115 (DE3). Las calles marcadas con un "3" muestran el ARN total aislado de pCPB-hp + 2T/bacterias HT115 (DE3). Las calles marcadas con un "4" muestran el ARN total aislado de las pUC19/bacterias HT115 (DE3) + pLac-T7. Las calles marcadas con un "5" muestran el ARN total aislado de pCPB-hp/bacterias HT115 (DE3) + pLac-T7. Las calles marcadas con un "6" muestran el ARN total aislado de las pCPB-hp + 2T/bacterias HT115 (DE3) + pLac-T7.

La **Figura 3B** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN total tratado con ARNasa A aislado de 20 ul de cultivo desarrollado durante una noche a 37 °C (calles izquierdas) o a 25 °C (calles derechas). Las calles marcadas con un "1" muestran el ARN total aislado de pUC19/bacterias HT115 (DE3). Las calles marcadas con

un "2" muestran el ARN total aislado de pCPB-hp/bacterias HT115 (DE3). Las calles marcadas con un "3" muestran el ARN total aislado de pCPB-hp + 2T/bacterias HT115 (DE3). Las calles marcadas con un "4" muestran el ARN total aislado de las pUC19/bacterias HT115 (DE3) + pLac-T7. Las calles marcadas con un "5" muestran el ARN total aislado de pCPB-hp/bacterias HT115 (DE3) + pLac-T7. Las calles marcadas con un "6" muestran el ARN total aislado de las pCPB-hp + 2T/bacterias HT115 (DE3) + pLac-T7.

La **Figura 4** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN bacteriano total sin inducción en la calle 1 y ARN bacteriano total con inducción en la calle 2. M: marcador.

La **Figura 5** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN transcrito con bacterias (calles 5-8) y ARN transcrito *in vitro* (calles 9 y 10) sin digestión con ARNasa A. La línea 4 muestra un marcador de tamaño. La línea 5 muestra una dilución de 10 veces del ARN purificado por SNAP modificado. La línea 6 muestra una dilución de 50 veces del ARN purificado por SNAP modificado. La línea 7 muestra una dilución de 10 veces del ARN purificado por SNAP modificado y filtrado por centrifugación de 30 K. La línea 8 muestra una dilución de 50 veces del ARN purificado por SNAP modificado y filtrado por centrifugación de 30 K. La línea 9 muestra una dilución de 100 veces del ARN transcrito *in vitro* a partir del vector pCPB-hp + 2T linealizado. La línea 10 muestra una dilución de 500 veces del ARN transcrito *in vitro* a partir del vector pCPB-hp + 2T linealizado.

La **Figura 5B** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados de la digestión con ARNasa A de ARN transcrito con bacterias (calles 5-8) y ARN transcrito *in vitro* (calles 9 y 10). La línea 4 muestra un marcador de tamaño. La línea 5 muestra una dilución de 10 veces del ARN purificado por SNAP modificado. La línea 6 muestra una dilución de 50 veces del ARN purificado por SNAP modificado. La línea 7 muestra una dilución de 10 veces del ARN purificado por SNAP modificado y filtrado por centrifugación de 30 K. La línea 8 muestra una dilución de 50 veces del ARN purificado por SNAP modificado y filtrado por centrifugación de 30 K. La línea 9 muestra una dilución de 100 veces del ARN transcrito *in vitro* a partir del vector pCPB-hp + 2T linealizado. La línea 10 muestra una dilución de 500 veces del ARN transcrito *in vitro* a partir del vector pCPB-hp + 2T linealizado.

La **Figura 6** muestra micrografías de células de *E. coli* después de la incubación a 37, 51, 62 o 72 °C durante 30 minutos.

La **Figura 7A** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN total aislado de las bacterias pDV49 cultivadas en medio de inducción automática (AIM) (calle 5), Super Broth + medio AIM (calle 6) o plásmido + medio AIM (calle 7). La línea 4 muestra un marcador de tamaño. Las bandas de ARNbc DV49 están indicadas por la flecha.

La **Figura 7B** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN total aislado de las bacterias pCPB-hp + 2T cultivadas en Super Broth + el medio (calle 5). La línea 4 muestra un marcador de tamaño. La banda de ARNbc CPB está indicada por la flecha.

La **Figura 8** se representa una representación esquemática del vector pDV49 + 2T.

La **Figura 9** representa una representación esquemática de un vector plasmídico que comprende un fragmento de ADN sentido y un fragmento de ADN antisentido complementario insertado entre el extremo 3' de un promotor y un sitio de reconocimiento de nucleasa. La expresión de la nucleasa linealiza el vector.

La **Figura 10** es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN total aislado de *E. coli* que contienen vectores de expresión de ARN con diferentes terminadores o combinaciones de terminadores. Un marcador de tamaño se muestra en la calle "M". La calle 1 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-PET/bacterias HT115 (DE3). La calle 2 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-PTH1/bacterias HT115 (DE3). La calle 3 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-PTH2/bacterias HT115 (DE3). La calle 4 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-BT1/bacterias HT115 (DE3). La calle 5 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-BT2/bacterias HT115 (DE3). La calle 6 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-CJ/bacterias HT115 (DE3). La calle 7 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-B1002/bacterias HT115 (DE3). La calle 8 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-B1006/bacterias HT115 (DE3). La calle 9 muestra el ARN aislado del terminador pUC19-PTH + PET/bacterias HT115 (DE3).

La **Figura 11** representa las estructuras secundarias formadas por los terminadores PTH + PET (SEQ ID NO. 13); CJ (SEQ ID NO. 10); rrm BT2 (SEQ ID NO. 9); rrmBT1 (SEQ ID NO. 8); PTH (SEQ ID NO. 7); PET (SEQ ID NO. 13); B1006 (SEQ ID NO. 12) y B1002 (SEQ ID NO. 11) según se determina usando CLC Main Workbench (versión 6.8.4). La energía libre de las estructuras secundarias mostradas se puede encontrar en la Tabla 5.

La **Figura 12** describe las estructuras secundarias formadas por horquillas de ARN de diferentes tamaños y terminadores de PTH + PET según se determina usando CLC Main Workbench (versión 6.8.4). La **Figura 12A** muestra la estructura secundaria formada por la horquilla de ARN de 27 ámeros y el terminador PTH + PET. La **Figura 12B** muestra la estructura secundaria formada por la horquilla de ARN de 240 ámeros y el terminador PTH + PET. La **Figura 12C** muestra la estructura secundaria formada por la horquilla de ARN de 280 ámeros y el terminador PTH + PET. La estructura formada por el terminador PTH + PET está rodeada por un círculo.

La **Figura 13** es un gráfico que muestra el rendimiento de ARN obtenido de cada una de las construcciones de expresión de la horquilla de ARN de 27 ámeros/el terminador de PTH + PET; la horquilla de ARN de 240 ámeros/el terminador de PTH + PET; la horquilla de ARN de 280 ámeros/el terminador de PTH + PET. La **Figura**

14 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra el ARN total aislado de células de *E. coli* que contienen vectores de expresión de ARN con diferentes números y combinaciones de terminadores. La calle 1 muestra el ARN total aislado del terminador pUC19-PTH + PET 2/bacterias HT115 (DE3). La calle 2 muestra el ARN total aislado del terminador pUC19-rrn BT2+PTH+PET 4/bacterias HT115 (DE3). La calle 3 muestra el ARN total aislado del terminador pUC19-PET+rrn BT2+PTH+PET 4/bacterias HT115 (DE3). La calle 4 muestra el ARN total aislado del terminador pUC19-rrn BT2+PTH+PET 3/bacterias HT115 (DE3).

La **Figura 15** representa las estructuras secundarias formadas por diferentes números y combinaciones de terminadores según se determina usando CLC Main Workbench (versión 6.8.4). La Figura 15A muestra la estructura secundaria formada por 2 terminadores, PTH + PET. La Figura 15B muestra la estructura secundaria formada por 4 terminadores, rrn BT2 + PET + PTH + PET. La Figura 15C muestra la estructura secundaria formada por 4 terminadores, PET + rrn BT2 + PTH + PET. La Figura 15D muestra la estructura secundaria formada por 3 terminadores, rrn BT2 + PTH + PET. Las estructuras de horquilla de tamaño mediano formadas por las combinaciones de terminadores están rodeadas por un círculo.

La Figura 16 es una fotografía de un gel SDS-PAGE que muestra la proteína total aislada de células BL21 (DE3) que contienen vectores de expresión con diferentes números y combinaciones de terminadores. La proteína expresada, Protien A, tiene un peso molecular de 21k. Un marcador de tamaño se muestra en la calle "M". La calle "A" contiene proteína aislada de células que contienen la construcción de expresión del terminador pUC + PET. La calle "B" contiene proteína aislada de células que contienen la construcción de expresión del terminador pUC + rrn BT2. La calle "C" contiene proteína aislada de células que contienen la construcción de expresión del terminador pUC + PTH +PET. La calle "D" contiene proteína aislada de células que contienen la construcción de expresión terminador pUC + rrn BT2 + PET + PTH + PET.

La Figura 17 representa las estructuras secundarias formadas por terminadores obtenidos por ingeniería según se determina usando CLC Main Workbench (versión 6.8.4). La Figura 17A muestra la estructura secundaria formada por 4 terminadores, rrn BT2 + PET + PTH + PET (SEQ ID NO. 18). La Figura 17B muestra la estructura secundaria formada por la SEQ ID 21. La Figura 17C muestra la estructura secundaria formada por la SEQ ID 22. La Figura 17D muestra la estructura secundaria formada por la SEQ ID 23.

Descripción detallada

La siguiente es una descripción detallada de la invención proporcionada para ayudar a los expertos en la técnica a practicar la presente invención.

A. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. Cuando se proporciona un término en singular, el plural de ese término también se contempla a menos que se indique lo contrario. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácido nucleico en el texto de esta memoria descriptiva se dan en la dirección 5' a 3' con respecto al promotor.

En la descripción que sigue, un número de términos se usan ampliamente. Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de las presentes realizaciones.

Como se usa en el presente documento, "un" o "una" pueden significar uno o más de uno.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" indica que un valor incluye la variación inherente del error para el procedimiento que se está empleando para determinar un valor, o la variación que existe entre los experimentos.

Se entenderá que, aunque los términos "primero", "segundo", etc. se pueden usar en el presente documento para describir diversos elementos, estos elementos no deben estar limitados por estos términos. Estos términos solo se usan para distinguir un elemento de otro.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" o la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a un polímero de una cadena o dos cadenas de bases de desoxirribonucleótido o ribonucleótido. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas de monómeros que son nucleótidos de origen natural (como el ADN y el ARN), o análogos de nucleótidos de origen natural (por ejemplo, formas enantioméricas de nucleótidos de origen natural), o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en los restos de azúcar y/o en los restos de base de pirimidina o purina. Las modificaciones del azúcar incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo con halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o los azúcares pueden funcionalizarse como éteres o ésteres. Además, todo el resto de azúcar puede reemplazarse con estructuras estéricamente y electrónicamente similares, como aza-azúcares y análogos de azúcares carbocíclicos. Ejemplos de modificaciones en un resto de base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los análogos de los enlaces fosfodiéster incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforanilidato, fosforamidato y similares.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un receptor que se ha separado del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo no limitante de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Otro ejemplo no limitante de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico que se ha aislado de una especie particular que es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de esa especie.

El término "vector" se refiere a una molécula de ADN usada como vehículo para transportar artificialmente material genético extraño a una célula huésped, en la que se puede replicar y/o expresar. La secuencia de ADN de un vector generalmente comprende un inserto (transgén) y una secuencia más grande que sirve como "estructura". La estructura del vector puede contener uno o más sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico en una forma determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transducidas con el vector, y un origen de replicación. Los vectores de expresión (construcciones de expresión) generalmente tienen una secuencia promotora que impulsa la expresión del transgén en la célula huésped. Ejemplos de vectores adecuados para su uso de acuerdo con las presentes realizaciones incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cósmidos, plastomas, cromosomas artificiales y bacteriófagos.

El término "promotor" o "secuencia promotora" se pueden usar de manera intercambiable y se refieren a una secuencia de ADN que, cuando está ligada a una secuencia de nucleótidos de interés, es capaz de controlar la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés en el ARN. El término "promotor" y "secuencia promotora" incluyen un promotor mínimo que es una secuencia de ADN corta que comprende una caja TATA y otras secuencias de ADN que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción o están involucrados en la unión de factores proteicos que controlan la efectividad de la iniciación de la transcripción en respuesta a las condiciones fisiológicas. Los promotores pueden ser homólogos, procedentes en su totalidad de un gen nativo de la célula huésped, o heterólogos, procedentes en su totalidad o en parte de otro organismo, o estar compuestos por diferentes elementos procedentes de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o estar compuestos por segmentos de ADN sintético. Como se usa en el presente documento, un promotor puede ser un promotor constitutivamente activo o un promotor regulado. En algunas realizaciones, el promotor puede ser reprimible. En otras realizaciones, el promotor puede ser inducible.

Cuando la expresión de una secuencia de nucleótidos se coloca bajo el control de un promotor, se dice que dicha secuencia de nucleótidos está "unida de forma operacional" al promotor. De forma similar, un elemento regulador y un promotor central están "unidos de forma operacional" si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

El término "célula huésped" se refiere a cualquier célula capaz de replicar y/o transcribir un vector diseñado de acuerdo con las presentes realizaciones. Las células huésped para su uso en las presentes realizaciones pueden ser células procarióticas, tales como *E. coli*, o células eucariotas tales como células de hongos, plantas, insectos, anfibios, aves o mamíferos. La inserción de un vector en la célula diana generalmente se llama transformación para células bacterianas, transfección para células eucariotas, aunque la inserción de un vector viral a menudo se llama transducción.

El término "expresión" o "expresión génica" se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un ARN funcional, la expresión génica implica la transcripción del gen en ARN.

Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibición de la expresión génica" o "inhibición de la expresión de un gen diana" o "supresión de genes" o "supresión de un gen diana" se refiere a la ausencia (o reducción observable) en el nivel de proteína y/o producto de ARNm del gen diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "transcripción de ARN" se refiere al producto resultante de la transcripción catalizada por una polimerasa de ARN de una secuencia de ADN. Cuando el transcrito de ARN es una copia complementaria perfecta de la secuencia de ADN, se denomina transcrito primario o puede ser una secuencia de ARN procedente del procesamiento posterior a la transcripción del transcrito primario y se denomina ARN maduro.

Como se usa en el presente documento, el término "ARN sentido" se refiere a un transcrito de ARN correspondiente a una secuencia o segmento que, cuando es producido por el organismo diana, está en forma de un ARNm que puede traducirse en proteína por el organismo diana. En algunas realizaciones, el organismo diana es una plaga.

Como se usa en el presente documento, el término "ARN antisentido" se refiere a un transcrito de ARN que es complementario a todo o parte de un ARNm que normalmente se produce en una célula de un organismo diana. La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte del transcrito del gen específico, es decir, en la secuencia no codificante 5', la secuencia no traducida 3', los intrones o la secuencia codificante. En algunas realizaciones, el organismo diana es una plaga.

El término "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de ADNc de longitud completa proporcionada en una lista de secuencias o puede comprender una secuencia génica completa. En general, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos, frecuentemente de al menos 25 nucleótidos, y con frecuencia de al menos 50 nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia diana" se refiere a una secuencia de nucleótidos de un gen dirigido a la supresión, que corresponde a una región formadora dúplex de un ARNbc. En este contexto, el término "gen" significa una región localizable de secuencia genómica, correspondiente a una unidad de herencia,

que incluye regiones reguladoras, regiones transcritas y/u otras regiones de secuencia funcional. Dependiendo de las circunstancias, el término secuencia diana puede referirse a la secuencia de nucleótidos de longitud completa del gen dirigido a la supresión o la secuencia de nucleótidos de una porción de un gen dirigido a la supresión.

5 Una primera secuencia de nucleótidos cuando se observa en la dirección 5' a 3' se dice que es un "complemento de", o "complementaria a", una segunda secuencia de nucleótidos de referencia observada en la dirección 3' a 5' si la secuencia del primer nucleótido es el complemento inverso de la secuencia de nucleótidos de referencia. Para la ilustración, la secuencia de nucleótidos "CATTAG" corresponde a una secuencia de referencia "CATTAG" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTAATC". Se dice que las moléculas de la secuencia de ácido nucleico muestran una "complementariedad completa" "cuando cada nucleótido de una de las secuencias leídas 5' a 10 3' es complementario a cada nucleótido de la otra secuencia cuando se lee 3' a 5'.

Como se usa en el presente documento, "bucle" se refiere a una estructura formada por una sola cadena de un ácido nucleico, en la que las regiones complementarias que flanquean una región nucleotídica monocatenaria particular se hibridan de manera que la región nucleotídica monocatenaria entre las regiones complementarias se excluye de la formación dúplex o apareamiento de bases de Watson-Crick. Un bucle es una región de nucleótidos de 15 una sola cadena de cualquier longitud.

Como se usa en el presente documento, el término "identidad de secuencia", "similitud de secuencia" u "homología" se usa para describir relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos. El porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias se determina comparando dos secuencias alineadas de manera óptima en una ventana de comparación, de manera que la porción de la secuencia en la ventana de comparación 20 puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no incluye adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico o el residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación, y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Una secuencia que es idéntica en cada posición en 25 comparación con una secuencia de referencia se dice que es idéntica a la secuencia de referencia y viceversa.

Como se usa en el presente documento, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en el que se compara una secuencia con una secuencia de 30 referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean de manera óptima. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias. Los expertos en la técnica deben consultar los procedimientos detallados usados para la alineación de secuencias en el paquete de software de Wisconsin Genetics versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, Wisconsin, EE. UU.) o consultar 35 Ausubel y col. (1998) para un análisis detallado del análisis de secuencia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "procedente de" se refiere a una secuencia de nucleótidos específica que se puede obtener de una fuente o especie específica, aunque no necesariamente directamente de esa fuente o especie específica.

40 El término "endonucleasa" o "endonucleasa de restricción" se refiere a las enzimas que escinden el enlace fosfodiéster dentro de una cadena de polinucleótidos.

El término "meganucleasa" se refiere a las endodeoxirribonucleasas caracterizadas por un gran sitio de reconocimiento (secuencias de ADN de doble cadena de 12 a 40 pares de bases), y que, como resultado del tamaño de su sitio de reconocimiento, generalmente se producen rara vez, o nunca, en un determinado genoma. Ejemplos 45 de meganucleasas incluyen, pero sin limitación, I-Anil, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-Scell, I-PpoI, I-ScellI, I-CreI, I-LtrI, I-GpI, I-GZel, I-OnuI, I-HjeMI, I-Msol, I-TevI, I-TevII, y I-TevIII.

El término "nucleasa efectora TAL" (TALEN) se refiere a una nucleasa que comprende un dominio de unión a ADN efector TAL fusionado a un dominio nucleasa. Los dominios de unión al ADN del efector TAL pueden obtenerse por ingeniería para unirse a una diana deseada y fusionarse a un dominio de nucleasa, tal como el dominio de la 50 nucleasa Fok1, para obtener una proteína de fusión nucleasa del dominio efector TAL.

El término "nucleasa con dedo de zinc" (ZFN) se refiere a una nucleasa que comprende un dominio de unión a ADN con dedo de zinc fusionado a un dominio de nucleasa, tal como el dominio de nucleasa Fok1. Los dominios de dedos de zinc se pueden obtener por ingeniería para dirigirse a secuencias de ADN deseadas y esto permite que las nucleasas con dedos de zinc se dirijan a secuencias únicas dentro de genomas complejos.

55 El término "escisión" se refiere a la rotura de la estructura covalente de una molécula de polinucleótido, tal como una molécula de ADN.

Como se usa en el presente documento, el término "plaga" se refiere a insectos, arácnidos, crustáceos, hongos,

bacterias, virus, nematodos, gusanos planos, gusanos redondos, gusanos alfiler, anquilostomas, tenias, tripanosomas, esquistosomas, mosquitos, pulgas, garrapatas, ácaros y piojos y similares que dominan el ambiente humano y que pueden ingerir o ponerse en contacto con una o más células, tejidos o fluidos producidos por un huésped de plaga o simbiote.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "resistencia a la plaga" se refiere a la capacidad de un huésped de la plaga, o simbiote para resistir el ataque de una plaga que típicamente es capaz de infligir daño o pérdida al huésped de la plaga o simbiote. Como se describe en el presente documento, dicha resistencia a la plaga se puede conseguir proporcionando a una superficie de un huésped de la plaga o simbiote una molécula de ARNbc comprendida en parte de un segmento de ARN que es idéntico a un segmento de ARN correspondiente
10 codificado a partir de una secuencia de ADN dentro de una plaga que prefiere alimentarse de la plaga huésped o simbiote. La expresión del gen dentro de la plaga diana es suprimida por el ARNbc, y la supresión de la expresión del gen en la plaga diana da como resultado que el huésped de la plaga o simbiote sea resistente a la plaga.

B. Producción de ARN

15 La presente divulgación se refiere a composiciones y procedimientos para la producción y entrega eficientes y rentables de una molécula de ARN transcrita. En algunas realizaciones, la molécula de ARN transcrita codifica una proteína. En algunas realizaciones, la molécula de ARN transcrita codifica un ARN regulador. En algunas realizaciones, la molécula de ARN transcrita es ARNbc. En algunas realizaciones, la molécula de ARN transcrita comprende segmentos orientados en sentido y orientados antisentido que forman una molécula de ARN (ARNbc) estabilizada, al menos parcialmente bicatenaria, capaz de suprimir un gen diana. En algunas realizaciones, la
20 molécula de ARN transcrita codifica una proteína. En algunas realizaciones, la molécula de ARN transcrita es un ARN regulador.

ARNbc

25 Varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren a vectores y sistemas para la producción *in vivo* o *in vitro* de una molécula de ARN que comprende un primer segmento de ARN unido a un segundo segmento de ARN sustancialmente complementario por un tercer segmento de ARN. El primer y el segundo segmentos de ARN se encuentran dentro de la longitud de la molécula de ARN y son repeticiones sustancialmente invertidas entre sí, de modo que la complementariedad entre el primer y el segundo segmento de ARN da como resultado la capacidad de los dos segmentos para hibridarse *in vivo* e *in vitro* para formar un tallo de ARN bicatenario unido en un extremo de cada uno de los segmentos primero y segundo por el tercer segmento de ARN, que forma un bucle de una sola
30 cadena. El primer y el segundo segmentos corresponden al sentido y antisentido, respectivamente, de una secuencia que muestra una identidad sustancial con una secuencia de nucleótidos dirigida a la supresión. En algunas realizaciones, la molécula de ARN incluye además al menos una segunda región de formación de bucle troncal que suprime al menos una segunda secuencia diana.

35 En algunas realizaciones, la longitud de la cadena codificante del dúplex de ARN puede ser al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900 o más nucleótidos. De forma similar, en algunas realizaciones, la longitud de la cadena no codificante del dúplex de ARN puede ser al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900 o más nucleótidos. Las cadenas
40 codificantes y no codificantes del dúplex de ARN no necesitan ser perfectamente complementarias, y el ARN bicatenario puede contener regiones internas no complementarias. Las cadenas codificantes y no codificantes solo necesitan duplicar o ser sustancialmente complementarias para recoger en condiciones biológicas. En algunas realizaciones, cuando se forma un ARN bicatenario a partir de un apareamiento de bases complementarias de las cadenas codificantes y no codificantes, el dúplex resultante tiene extremos romos. En otras realizaciones, cuando se forma un ARN bicatenario a partir de un apareamiento de bases complementarias de las cadenas codificantes y no codificantes, el ARNbc tiene una estructura asimétrica. En algunas realizaciones, el ARNbc tiene un saliente 5' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleótidos en la cadena codificante. En otras realizaciones, el ARNbc tiene un saliente 5' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleótidos en la cadena no codificante. En otras realizaciones, el ARNbc tiene un saliente 3' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleótidos en la cadena codificante. En otras realizaciones, el ARNbc tiene un saliente 3' de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más nucleótidos en la cadena no codificante.

El tercer segmento de ARN puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que facilite o permita que el primer segmento de ARN y el segundo segmento de ARN se hibriden y formen ARNbc. El tercer segmento de ARN puede comprender una secuencia de nucleótidos de al menos aproximadamente 1-5 nucleótidos de longitud, 5-10
55 nucleótidos de longitud, 10-15 nucleótidos de longitud, 15-20 nucleótidos de longitud, 20-25 nucleótidos de longitud, 25-30 nucleótidos de longitud, 30-35 nucleótidos de longitud, 35-40 nucleótidos de longitud, 40-45 nucleótidos de longitud, 45-50 nucleótidos de longitud, 50-55 nucleótidos de longitud, 55-60 nucleótidos de longitud, 60-65 nucleótidos de longitud, 65-70 nucleótidos de longitud, 70-75 nucleótidos de longitud, 75-80 nucleótidos de longitud, 80-85 nucleótidos de longitud, 85-90 nucleótidos de longitud, 90-95 nucleótidos de longitud, 95-100 nucleótidos de longitud, 100-150 nucleótidos de longitud, 150-200 nucleótidos de longitud, 200-250 nucleótidos de longitud, 250-400
60 nucleótidos de longitud.

nucleótidos de longitud, o al menos aproximadamente 400-500 nucleótidos de longitud. Una diversidad de diferentes secuencias pueden servir como la secuencia de bucle. Ejemplos de secuencias de bucle específicas que se ha demostrado que funcionan en los ARNhc incluyen UUCAAGAGA, CCACACC, AAGCUU, CTCGAG, CCACC y UUCG. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del tercer segmento de ARN corresponde sustancialmente a una secuencia sentido o antisentido de un segmento del gen dirigido a la supresión. Por ejemplo, el tercer segmento de ARN puede comprender una secuencia de nucleótidos correspondiente a la de sentido o antisentido de nucleótidos localizados en un extremo distal del segmento de gen dirigido por los segmentos de ARN primero y segundo autocomplementarios. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos del tercer segmento de ARN corresponde sustancialmente a una secuencia sentido o antisentido de un segmento de un gen no dirigido. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del tercer segmento de ARN se obtiene de la secuencia de nucleótidos de una región de bucle de un microARN (ARNmi). En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del tercer segmento de ARN se obtiene de la secuencia de nucleótidos de una región de bucle de un microARN nativo (ARNmi) del organismo diana. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del tercer segmento de ARN es una secuencia de nucleótidos obtenida por ingeniería. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos obtenida por ingeniería del tercer segmento de ARN se obtiene de una secuencia de nucleótidos de un gen nativo alterando el contenido de GC. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos del tercer segmento de ARN codifica un aptámero.

Cualquier gen puede ser dirigido a la supresión por una molécula de ARNbc producida de acuerdo con las presentes realizaciones. La inhibición de un gen diana que usa una molécula de ARNbc como se describe en el presente documento es específica de la secuencia, ya que las secuencias de nucleótidos correspondientes a una región formadora dúplex del ARNbc están dirigidas a la inhibición mediada por ARNi. La región de formación de dúplex del ARNbc puede corresponder a la secuencia de nucleótidos de longitud completa del producto de transcripción primario o el ARNm completamente procesado del gen diana o la región de formación de dúplex del ARNbc puede corresponder a una porción del producto de transcripción primario o el ARNm completamente procesado del gen diana. Una secuencia de nucleótidos de un gen dirigido a la supresión, que corresponde a una región de formación dúplex del ARNbc puede denominarse la "secuencia diana". La región de formación dúplex del ARNbc puede corresponder a una porción de un gen diana que tiene al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 900, o 1.000 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la región de formación dúplex del ARNbc puede corresponder a más de aproximadamente 20-25 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 25-50 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 50-75 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 75-100 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 100-125 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 125-150 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 150-175 nucleótidos del gen diana, o una secuencia de más de aproximadamente 175-200 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 200-250 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 250-275 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 275-300 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 300-325 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 325-350 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 350-400 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 400-450 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 450-500 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 500-550 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 550-600 nucleótidos del gen diana, más de aproximadamente 600-700 nucleótidos del gen diana, o más de aproximadamente 700-1.000 nucleótidos del gen diana, dependiendo del tamaño del gen diana. La longitud de la región de formación dúplex puede depender de la longitud de las moléculas de ARNbc capaces de ser captadas por el organismo diana, por ejemplo, un insecto, y la longitud del ARNbc capaz de procesarse dentro de una célula de un organismo diana en fragmentos que dirigen la interferencia por ARN. La longitud de la región de formación dúplex también puede verse influenciada por el procedimiento de síntesis de ARNbc.

En algunas realizaciones, una región de formación dúplex de una molécula de ARNbc tiene una complementariedad perfecta (100 %) con una secuencia diana. Sin embargo, no se requiere la identidad de secuencia absoluta entre la región de formación dúplex de una molécula de ARNbc y la secuencia diana. Se toleran las variaciones de secuencia que podrían esperarse debido a mutación genética, polimorfismo de cepa o divergencia evolutiva y se puede usar ARNbc que contiene una secuencia de nucleótidos formadora de dúplex con inserciones, eliminaciones y mutaciones puntuales únicas relativas a la secuencia diana para inhibir un gen diana. Las secuencias de nucleótidos de una región de formación de dúplex de un ARNbc como se describe en el presente documento y la porción correspondiente del gen diana pueden ser sustancialmente complementarias, por ejemplo, las secuencias pueden compartir al menos aproximadamente el 80 % de identidad, al menos aproximadamente el 90 % de identidad, al menos aproximadamente el 95 % de identidad, al menos aproximadamente el 96 % de identidad, al menos aproximadamente el 97 % de identidad, al menos aproximadamente el 98 % de identidad, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad, a lo largo de la secuencia a la que se dirige. La región de formación dúplex de un ARNbc como se describe en el presente documento también se puede definir funcionalmente como una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar con una porción del transcrito del gen diana. El aumento de la longitud puede compensar una menor homología entre una región de formación de dúplex de una molécula de ARNbc y su secuencia diana. La longitud de las secuencias de nucleótidos idénticas puede ser al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o al menos aproximadamente 1000 bases.

Una región de formación dúplex de una molécula de ARNbc puede diseñarse contra cualquier secuencia diana, incluyendo una o más secuencias diana seleccionadas de entre un gen nativo de una plaga o patógeno. La secuencia diana puede seleccionarse de un gen nativo de un organismo eucariótico o un organismo no eucariótico. Una secuencia diana puede incluir cualquier secuencia de cualquier especie, que incluyen, pero sin limitación, bacterias; virus; hongos; plantas, incluyendo monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como plantas de cultivo, plantas ornamentales y plantas no domesticadas o silvestres; invertebrados tales como artrópodos, anélidos, nematodos y moluscos; y vertebrados como los anfibios, peces, aves o mamíferos.

La secuencia diana puede ser una secuencia traducible (codificante), o puede ser una secuencia no codificante (como una secuencia reguladora no codificante), o ambas. Ejemplos no limitantes de una secuencia diana no traducible (no codificante) incluyen: regiones no traducidas 5', promotores, potenciadores u otras regiones transcripcionales no codificantes, regiones no traducidas 3', terminadores e intrones. Las secuencias diana también pueden incluir genes que codifican microARNs, pequeños ARN de interferencia, componentes de ARN de ribosomas o ribozimas, ARN pequeño nucleolar y otros ARN no codificantes (véase, por ejemplo, secuencias de ARN no codificantes proporcionadas públicamente en rfam.wustl.edu; Erdmann y col. (2001) *Nucleic Acids Res.*, 29:189-193; Gottesman (2005) *Trends Genet.*, 21:399-404; Griffiths-Jones y col. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33:121-124). Ejemplos no limitantes de una secuencia diana traducible (codificante) incluyen: genes que codifican factores de transcripción, genes que codifican receptores, genes que codifican hormonas, genes constitutivos y genes que codifican enzimas de la biosíntesis o catabolismo de moléculas de interés (como, pero sin limitación, aminoácidos, ácidos grasos y otros lípidos, azúcares y otros carbohidratos, polímeros biológicos y metabolitos secundarios, incluidos alcaloides, terpenoides, policétidos, péptidos no ribosómicos y metabolitos secundarios de origen biosintético mixto). Además, las secuencias de nucleótidos diana se pueden determinar a partir de cualquier gen de plantas, insectos, virus, bacterias u hongos cuya función se ha establecido a partir de la literatura. Se contempla que se pueden emplear varios criterios en la selección de genes dirigidos. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos diana pueden determinarse a partir de genes que desempeñan funciones importantes en la viabilidad, el crecimiento, el desarrollo, la reproducción y la infectividad. Estos genes pueden ser identificados por mutaciones de inactivación letales en *Drosophila*, *C. elegans*, u otros organismos. El gen también puede ser uno cuyo producto proteico tenga una velocidad de renovación rápida, de modo que la inhibición del ARNbc dará como resultado una disminución rápida en los niveles de proteína. En determinadas realizaciones, es ventajoso seleccionar un gen para el cual una pequeña caída en el nivel de expresión da como resultado efectos perjudiciales para el organismo.

En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen nativo de un insecto. En algunas realizaciones, la secuencia diana puede seleccionarse de un gen nativo de cualquier especie de insecto que cause daños a las plantas de cultivo y pérdidas de rendimiento posteriores (una plaga de insectos). Ejemplos no limitantes de plagas de insectos incluyen: pulgón de la hoja del maíz, cogollero del maíz, cogollero del maíz africano, gusano de la mazorca de maíz, chicharrita del maíz, minador de la mancha del maíz, gusano de la raíz del maíz del oeste, gusano de la raíz del maíz del norte, gusano de la raíz del maíz mexicano, gusano de la raíz del maíz del sur, oruga cortadora, gusano de la semilla del maíz, gusano del alambre, gusano del tallo del trigo, escarabajo del pepino manchado, chinche verde, chinche marrón, pulgón de la soja y barrenador del tallo de la soja. Los genes en el insecto pueden dirigirse a las etapas de madurez (adulto), inmadura (larva) o huevo. En algunas realizaciones, el gen dirigido a la supresión, puede codificar una proteína esencial, cuya función predicha se selecciona de entre el grupo que consiste en formación muscular, formación de hormonas juveniles, regulación de hormonas juveniles, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, síntesis de feromonas, detección de feromonas, formación de antenas, formación de alas, formación de piernas, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, maduración larvaria, formación de enzimas digestivas, síntesis de hemolinfa, mantenimiento de la hemolinfa, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración y apoptosis. Cuando la secuencia diana se obtiene de un gen esencial para la viabilidad o infectividad del insecto, su regulación por disminución da como resultado una capacidad reducida del insecto para sobrevivir e infectar a su huésped. Por lo tanto, dicha regulación por disminución produce un "efecto perjudicial" sobre la viabilidad de mantenimiento y la infectividad del insecto, ya que evita o reduce la capacidad del insecto para alimentarse y sobrevivir de los nutrientes obtenidos de las células huésped. En virtud de esta reducción en la viabilidad e infectividad del insecto, se facilita la resistencia y/o la tolerancia potenciada a la infección por un insecto. En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen cuyo producto proteico tiene una velocidad de renovación rápida, de modo que la inhibición del ARNbc dará como resultado una disminución rápida en los niveles de proteína. En determinadas realizaciones, es ventajoso seleccionar un gen para el cual una pequeña caída en el nivel de expresión da como resultado efectos perjudiciales para el insecto.

En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen que se expresa en el intestino del insecto. En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen que comparte homología sustanciales con las secuencias de nucleótidos de los genes conocidos expresados en el intestino que codifican componentes proteicos del protón de membrana plasmática V-ATPasa (Dow y col., 1997, *J. Exp. Biol.*, 200:237-245; Dow, *Bioenerg. Biomemb.*, 1999, 31:75-83). Este complejo de proteínas es el único energizante del transporte de iones epiteliales y es responsable de la alcalinización de la luz del intestino medio. La V-ATPasa también se expresa en el túbulo de Malpighi, una extensión del intestino posterior del insecto que funciona en el equilibrio de líquidos y en la desintoxicación de compuestos extraños de manera análoga a un órgano renal de un mamífero.

5 En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen que está involucrado en el crecimiento, desarrollo y reproducción de un insecto. En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen que codifica el gen CHD3. El gen CHD3 en *Drosophila melanogaster* codifica una proteína con actividad de helicasa del ADN dependiente de ATP que está involucrada en el ensamblaje/desensamblaje de la cromatina en el núcleo. Se han encontrado secuencias similares en diversos organismos como *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* y *Saccharomyces cerevisiae*. En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen que codifica el gen de la β -tubulina. La familia de genes de la beta-tubulina codifica proteínas asociadas a microtúbulos que son un componente del citoesqueleto celular. Las secuencias relacionadas se encuentran en organismos tan diversos como *Caenorhabditis elegans* y *Manduca sexta*.

10 En algunas realizaciones, la secuencia diana puede seleccionarse de un gen nativo de una plaga de nematodos. Ejemplos no limitantes de plagas de nematodos incluyen: nematodo formador de agallas de Columbia, nematodo formador de agallas del norte, nematodo formador de agallas del sur, nematodo formador de agallas, nematodo formador de agallas falso, nematodo del quiste del maíz, nematodo del quiste de la soja, nematodo del quiste de la patata, nematodo del quiste de la remolacha azucarera, nematodo de picadura, nematodo de anillo, nematodo
15 espiral, nematodo de lanza, nematodo de daga, nematodo de aguja, nematodo de la lesión, nematodo de la raíz corta, nematodo de acrobacia, nematodo de oro y nematodo de la pochedumbre de las patatas. En algunas realizaciones, el gen dirigido a la supresión, puede codificar una proteína esencial, cuya función predicha se selecciona de entre el grupo que consiste en formación muscular, regulación y transporte de iones, síntesis de enzimas digestivas, mantenimiento del potencial de membrana celular, biosíntesis de aminoácidos, degradación de aminoácidos, formación de espermatozoides, desarrollo y diferenciación, formación de huevos, formación de
20 enzimas digestivas, neurotransmisión, división celular, metabolismo energético, respiración y apoptosis. Cuando la secuencia diana se obtiene de un gen esencial para la viabilidad o infectividad del nematodo, su regulación por disminución da como resultado una capacidad reducida del nematodo para sobrevivir e infectar a su huésped. Por lo tanto, dicha regulación por disminución produce un "efecto perjudicial" sobre la viabilidad de mantenimiento y la infectividad del nematodo, ya que evita o reduce la capacidad del nematodo para alimentarse y sobrevivir de los nutrientes obtenidos de las células huésped. En virtud de esta reducción en la viabilidad e infectividad del nematodo, se facilita la resistencia y/o la tolerancia potenciada a la infección por un nematodo. En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen cuyo producto proteico tiene una velocidad de renovación rápida, de modo que la inhibición del ARNbc dará como resultado una disminución rápida en los niveles de proteína. En determinadas
25 realizaciones, es ventajoso seleccionar un gen para el cual una pequeña caída en el nivel de expresión da como resultado efectos perjudiciales para el nematodo.

30 En algunas realizaciones, la secuencia diana puede seleccionarse de un gen nativo de un hongo. Ejemplos no limitantes de hongos incluyen: *Macrophomina phaseoloni*, *Puccinia sorghi*, *Ustilago maydis*, *Exserohilum pedicellatum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium verticillioides* y *Sphacelotheca reiliana*. En algunas realizaciones, el gen dirigido a la supresión, puede codificar una proteína esencial, cuya función predicha se selecciona de entre el grupo que consiste en división celular, metabolismo energético, formación de la pared celular, formación de esporas, formación de hifas y síntesis de enzimas digestivas. Cuando la secuencia diana se obtiene de un gen esencial para la viabilidad o infectividad del hongo, su regulación por disminución da como resultado una capacidad reducida del hongo para sobrevivir e infectar a su huésped. Por lo tanto, dicha regulación por disminución produce un "efecto perjudicial" sobre la viabilidad de mantenimiento y la infectividad del hongo, ya que evita o reduce la capacidad del hongo para alimentarse y sobrevivir de los nutrientes obtenidos de las células huésped. En virtud de esta reducción en la viabilidad y la infectividad del hongo, se facilita la resistencia y/o la tolerancia potenciada a la infección por un hongo. En algunas realizaciones, la secuencia diana se selecciona de un gen cuyo producto proteico tiene una velocidad de renovación rápida, de modo que la inhibición del ARNbc dará como resultado una disminución rápida en los niveles de proteína. En determinadas realizaciones, es ventajoso seleccionar un gen para el cual una pequeña caída en el nivel de expresión da como resultado efectos perjudiciales para el hongo.

35 En determinadas realizaciones, puede ser deseable que un ARNbc inhiba la expresión de un gen dirigido en más de una especie. En algunas realizaciones, puede ser deseable inhibir la expresión de un gen dirigido en dos o más especies de insectos, por ejemplo, especies de gusanos de la raíz del maíz. En dichas realizaciones, una secuencia diana puede seleccionarse de un gen o una porción de un gen que está altamente conservado en todas las especies seleccionadas. Por ejemplo, la secuencia diana puede seleccionarse de un gen o una porción de un gen que tenga al menos aproximadamente el 80 % de identidad, al menos aproximadamente el 85 % de identidad, al menos aproximadamente el 90 % de identidad, al menos aproximadamente el 95 % de identidad, al menos aproximadamente el 96 % de identidad, al menos aproximadamente el 97 % de identidad, al menos aproximadamente el 98 % de identidad, o al menos aproximadamente el 99 % de identidad, en todas las especies seleccionadas.

40 En determinadas realizaciones, puede ser deseable que un ARNbc muestre actividad específica de la especie. En algunas realizaciones, una secuencia diana puede seleccionarse de un gen nativo o una porción de un gen nativo de la especie dirigida que tiene un bajo grado de identidad de secuencia con genes correspondientes en otras especies.
45 En algunas realizaciones, la secuencia diana puede seleccionarse de un gen o una porción de un gen en el que el grado de identidad de secuencia con genes correspondientes en otras especies es inferior a aproximadamente el 80 %. En otras realizaciones, la secuencia diana puede seleccionarse de un gen o una porción de un gen en el que el grado de identidad de secuencia con genes correspondientes en otras especies es inferior a aproximadamente el

70 %. En otras realizaciones, la secuencia diana puede seleccionarse de un gen o una porción de un gen en el que el grado de identidad de secuencia con genes correspondientes en otras especies es inferior a aproximadamente el 60 %. En determinadas realizaciones, una secuencia diana se selecciona de un gen o una porción de un gen que se conserva pobremente entre especies de insectos individuales, o entre insectos y otros organismos. En algunas realizaciones, una secuencia diana puede seleccionarse de un gen nativo de la especie dirigida que no tiene homólogos conocidos en otros organismos. En algunas realizaciones, una secuencia diana puede seleccionarse de un gen nativo de la especie dirigida que no tiene homólogos conocidos en una planta o un animal vertebrado.

Vectores y expresión

Varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren a una construcción de expresión obtenida por ingeniería para la transcripción *in vivo* e *in vitro* de ARN que comprende un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARN. En algunas realizaciones, el ARN puede ser ARNbc. En otras realizaciones, el ARN puede codificar una proteína o ser un ARN regulador. Las construcciones de expresión obtenidas por ingeniería descritas en el presente documento pueden, ventajosamente, formar parte de un vector replicable. En las realizaciones descritas en el presente documento, la eficiencia de la producción de ARN a partir de la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería se mejora evitando o minimizando la transcripción no deseada de ARN de la estructura del vector. Se contemplan varias formas de evitar o minimizar la transcripción no deseada de la estructura del vector y pueden usarse independientemente o en combinación. En algunas realizaciones, dos o más secuencias de terminación transcripcional están unidas de forma operacional al promotor corriente abajo del extremo 3' del elemento de codificación de ARN. En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que forma una estructura secundaria que comprende dos o más horquillas adyacentes de tamaño mediano está unida de forma operacional al promotor corriente abajo del extremo 3' del elemento de codificación de ARN. En algunas realizaciones, uno o más sitios de restricción, que preferentemente no se encuentran en el genoma del huésped, se proporcionan 3' al elemento de codificación de ARN. La escisión en la restricción evita la transcripción no deseada corriente abajo del sitio de corte. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos sintética que codifica un transcrito de ARN que puede formar una o más estructuras de bucle troncal a través del apareamiento de bases complementarias está unida de forma operacional al promotor corriente abajo del extremo 3' del elemento de codificación de ARN. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más sitios de unión para una proteína de unión a ADNbc se proporciona 3' al elemento de codificación de ARN. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende una señal de terminación dependiente de Rho. En algunas realizaciones, el tamaño de la estructura del vector se reduce para minimizar la transcripción no deseada.

En las realizaciones descritas en el presente documento, la construcción de expresión obtenida por ingeniería comprende un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARNbc, que comprende: una secuencia de nucleótidos orientada en sentido, que es sustancialmente idéntica a una secuencia diana; una secuencia de nucleótidos orientada en antisentido, que es sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos orientada en sentido; y una secuencia de nucleótidos flanqueada por las secuencias sentido y antisentido complementarias, que codifica uno o más nucleótidos que están excluidos de la formación dúplex de las regiones complementarias en el transcrito de ARN. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARNbc, que comprende en una dirección de 5' a 3': una secuencia de nucleótidos orientada en sentido, que es sustancialmente idéntica a una secuencia diana; una secuencia de nucleótidos que codifica una región de bucle de una molécula de ARNbc; y una secuencia de nucleótidos orientada en antisentido, que es sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos orientada en sentido. En otras realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARNbc, que comprende en una dirección de 5' a 3': una secuencia de nucleótidos orientada en antisentido, que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana; una secuencia de nucleótidos que codifica una región de bucle de una molécula de ARNbc; y una secuencia de nucleótidos orientada en sentido, que es sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos orientada en antisentido. La orientación de la secuencia de nucleótidos que codifica una región de bucle de una molécula de ARNbc puede ser en sentido o antisentido. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica una región de bucle de una molécula de ARNbc es sustancialmente idéntica a una porción de una secuencia sentido o antisentido de un gen dirigido a la supresión por la molécula de ARNbc. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica una región de bucle de una molécula de ARNbc es sustancialmente idéntica a una porción de una secuencia sentido o antisentido de un gen diferente al gen dirigido a la supresión por la molécula de ARNbc. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica una región de bucle de una molécula de ARNbc es una secuencia de nucleótidos obtenida por ingeniería. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica una región de bucle de una molécula de ARNbc codifica un aptámero.

En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARNbc que comprende, en una dirección de 5' a 3', una secuencia de nucleótidos orientada en sentido, que es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos de al menos un porción de un gen diana y una secuencia de nucleótidos orientada en antisentido, que es más corta que la secuencia de nucleótidos orientada en sentido y es sustancialmente complementaria al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos orientada en sentido. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN

obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARNbc que comprende, en una dirección de 5' a 3', una secuencia de nucleótidos orientada en sentido, que es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos de una porción de un gen diana y una secuencia de nucleótidos orientada en antisentido más larga, que es sustancialmente complementaria a una secuencia de nucleótidos de al menos una porción del gen diana, y que comprende en su extremo 3', una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos orientada en sentido. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARNbc que comprende, en una dirección de 5' a 3', una secuencia de nucleótidos orientada en antisentido, que es sustancialmente complementaria a al menos una porción de una secuencia de nucleótidos de un gen diana y una secuencia de nucleótidos orientada en sentido, que es más corta que la secuencia de nucleótidos orientada en antisentido y que es sustancialmente complementaria al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos orientada en antisentido. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARNbc que comprende, en una dirección de 5' a 3', una secuencia de nucleótidos orientada en antisentido, que es sustancialmente complementaria a una porción de una secuencia de nucleótidos de un gen diana y una secuencia de nucleótidos orientada en sentido más larga, que es sustancialmente idéntica a al menos una porción del gen diana, y comprende en su extremo 3', una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente complementaria a la secuencia de nucleótidos orientada en antisentido.

En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de proteínas.

En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende, un promotor unido de forma operacional a un elemento de codificación de ARN regulador. En algunas realizaciones, el ARN regulador se selecciona de entre el grupo que consiste en un ARN antisentido, un ARN CRISPR, un ARN largo no codificante, un microARN, un ARN de interacción a piwi, un pequeño ARN interferente y un ARN de acción trans.

El promotor usado en la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería puede seleccionarse sobre la base de la naturaleza del sistema de expresión en el que se espera que funcione la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería (por ejemplo, una célula huésped procarionta o eucariota). El promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible. En algunas realizaciones, se puede usar un promotor de bacteriófagos, por ejemplo, T7, T3, SV40 o SP6, en la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería, ya que proporcionan un alto nivel de transcripción que depende solo de la unión de la ARN polimerasa adecuada. Cuando la célula huésped no expresa la ARN polimerasa adecuada, se puede proporcionar un transgén que codifica una polimerasa T7, T3, SV40 o SP6 unida de forma operacional a un promotor reconocido por la célula huésped en el mismo vector o en un vector diferente al de la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería. El promotor reconocido por la célula huésped puede ser un promotor inducible o un promotor constitutivamente activo. En algunas realizaciones, se puede usar un promotor singénico, que es reconocido por las polimerasas expresadas por el genoma del huésped, en la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería. Ejemplos de promotores adecuados para su uso con huéspedes bacterianos incluyen, pero sin limitación, T5, promotor de β-lactamasa, promotor de galactosa de *E. coli*, promotor de arabinosa, promotor de fosfatasa alcalina, promotor de triptófano (*trp*), promotor de operon lactosa (*lac*), promotor *lacUV5*, promotor *trc* y promotor *tac*. En algunas realizaciones, el promotor usado en la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería puede ser un promotor de ARN Pol I, ARN Pol II o ARN Pol III. En determinadas realizaciones, el promotor usado en la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería puede ser un promotor Pol III. Ejemplos de promotores Pol III incluyen, pero sin limitación, promotor U6, promotor ARNt, promotor LTR retroviral, promotor VA1 de adenovirus, promotor de ARN 5Sr, promotor de ARN 7SK, promotor de ARN 7SL y promotor de ARN HI. En algunas realizaciones, se puede usar un promotor reconocido por levadura, por ejemplo el promotor ADR1, el promotor del factor α de tipo silvestre o el promotor híbrido ADH2/GAPD, en la construcción de expresión de ARNbc obtenida por ingeniería.

En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería puede comprender además opcionalmente secuencias de nucleótidos adicionales que afectan ventajosamente a la transcripción del elemento de codificación de ARN y/o la estabilidad de un transcrito resultante. Por ejemplo, la construcción de expresión de ARN obtenida puede comprender además una o más secuencias potenciadoras o de poliadenilación.

Dos mecanismos principales, denominados terminación independiente de Rho y terminación dependiente de Rho, median la terminación transcripcional en procariontas, tales como *E. coli*. Las señales de terminación independientes de Rho, como las secuencias de terminación transcripcionales que se analizan a continuación, no requieren un factor de terminación de la transcripción extrínseco, como la formación de una estructura de bucle troncal en el ARN transcrito de estas secuencias junto con una serie de restos de uridina (U) promueve la liberación de la cadena de ARN del complejo de transcripción. La terminación dependiente de Rho, por otra parte, requiere un factor de terminación de la transcripción llamado *Rho* y elementos de acción cis en el ARNm. El sitio de unión inicial para Rho, el sitio de utilización (*rut*) de Rho, es una región monocatenaria prolongada (~70 nucleótidos, a veces 80-100 nucleótidos) caracterizada por un alto contenido de citidina/baja guanosina y una estructura secundaria relativamente pequeña en el ARN que se sintetiza, corriente arriba de la secuencia terminadora real. Cuando se encuentra un sitio de pausa de la polimerasa, se produce la terminación y la transcripción se libera por la actividad helicasa de Rho.

En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende una señal de terminación dependiente de Rho. En algunas realizaciones, la señal de terminación dependiente de Rho se localiza en una región de formación de bucle de un transcrito de ARNbc. En otras realizaciones, la señal de terminación dependiente de Rho está localizada en una secuencia sentido o antisentido de una región de formación dúplex de un transcrito de ARNbc. Las secuencias de ácido nucleico que codifican señales de terminación dependientes de Rho son conocidas en la técnica y también pueden identificarse en genes terminados dependientes de Rho. En algunas realizaciones, se puede proporcionar una señal de terminación dependiente de Rho junto con una o más de una secuencia de terminación independiente de Rho, una secuencia de nucleótidos sintética que codifica un transcrito de ARN que forma un bucle troncal, un sitio de unión para una proteína de unión a ADN, y un sitio de endonucleasa de restricción específico del sitio como se describe a continuación. Una construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería que comprende una señal de terminación dependiente de Rho puede expresarse en una célula huésped que expresa los factores de transacción de Rho (una línea celular Rho+).

En algunas realizaciones, la eficiencia de la transcripción del ARN a partir de la construcción de expresión obtenida por ingeniería puede mejorarse proporcionando una secuencia de ácido nucleico que forma una estructura secundaria que comprende dos o más horquillas en una posición 3' hasta el final del elemento de codificación del ARN. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la estructura secundaria desestabiliza el complejo de elongación de la transcripción y lleva a que la polimerasa se disocie del molde de ADN, minimizando así la transcripción improductiva de la secuencia no funcional y aumentando la transcripción del ARN deseado. En consecuencia, puede proporcionarse una secuencia de terminación que forma una estructura secundaria que comprende dos o más horquillas adyacentes. En general, una horquilla puede estar formada por una secuencia de nucleótidos palindrómica que puede plegarse sobre sí misma para formar una región de tallo pareada cuyos brazos están conectados por un bucle de una sola cadena. En algunas realizaciones, la secuencia de terminación comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más horquillas adyacentes. En algunas realizaciones, las horquillas adyacentes están separadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos desapareados. En algunas realizaciones, un tallo de horquilla comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más pares de bases de longitud. En determinadas realizaciones, un tallo de horquilla tiene una longitud de 12 a 30 pares de bases. En determinadas realizaciones, la secuencia de terminación comprende dos o más horquillas de tamaño mediano que tienen una región de tallo que comprende aproximadamente de 9 a 25 pares de bases. En algunas realizaciones, la horquilla comprende una región de formación de bucle de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región de formación de bucle comprende 4-8 nucleótidos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la estabilidad de la estructura secundaria puede correlacionarse con la eficiencia de terminación. La estabilidad de la horquilla está determinada por su longitud, el número de desapareamientos o protuberancias que contiene y la composición base de la región apareada. Los apareamientos entre guanina y citosina tienen tres enlaces de hidrógeno y son más estables en comparación con los apareamientos de adenina-timina, que tienen solo dos. El contenido de G/C de una secuencia de nucleótidos palindrómica formadora de horquilla puede ser de al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o más. En algunas realizaciones, el contenido de G/C de una secuencia de nucleótidos palindrómica formadora de horquilla es al menos del 80 %. En algunas realizaciones, la secuencia de terminación se obtiene de una o más secuencias terminadoras transcripcionales de origen procariota, eucariota o fago. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica una serie de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más adeninas (A) se proporciona 3' a la secuencia de terminación.

En algunas realizaciones, la eficiencia de la transcripción de ARN a partir de la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería puede mejorarse proporcionando dos o más secuencias de terminación de la transcripción en tándem en una posición 3' hasta el final del elemento de codificación de ARN. Véase la Figura 1. En algunas realizaciones, la eficiencia de la transcripción de ARN a partir de la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería puede mejorarse proporcionando tres, cuatro, cinco o más secuencias de terminación de la transcripción en tándem en una posición 3' hasta el final del elemento de codificación de ARN. Una secuencia de terminación transcripcional puede ser cualquier secuencia de nucleótidos, que cuando se coloca transcripcionalmente corriente abajo de una secuencia de nucleótidos que codifica un marco de lectura abierto, provoca el final de la transcripción del marco de lectura abierto. Dichas secuencias son conocidas en la técnica y pueden ser de origen procariota, eucariota o fago. Ejemplos de secuencias terminadoras incluyen, pero sin limitación, terminador PTH, terminador pET-T7, terminador T3-T ϕ , terminador pBR322-P4, terminador del virus vesicular del estoma, terminador rrnB-T1, terminador rrnC, terminador transcripcional TTadc, y secuencias de terminación reconocidas por levadura, tales como el terminador de la transcripción Mat α (factor α), la secuencia de terminación de la transcripción del factor α nativo, la secuencia de terminación de la transcripción ADR1, la secuencia de terminación de la transcripción ADH2 y la secuencia de terminación de la transcripción GAPD. Se puede encontrar una lista no exhaustiva de secuencias terminadoras transcripcionales en el registro iGEM, que está disponible en: <http://partsregistry.org/Terminators/Catalog>. La primera secuencia del terminador transcripcional de una serie de 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más puede colocarse directamente 3' al nucleótido final del elemento de codificación de ARNbc o a una distancia de al menos 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-300, 300-400, 400-500, 500-1.000 o más nucleótidos 3' al nucleótido final del elemento de codificación de ARNbc. El número de nucleótidos entre las secuencias terminadoras transcripcionales en tándem puede variar, por ejemplo, las secuencias terminadoras transcripcionales pueden estar separadas por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-35, 35-40, 40-45, 45-50 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, las secuencias

terminadoras transcripcionales pueden seleccionarse basándose en su estructura secundaria predicha como se determina mediante un algoritmo de predicción de estructura. Los programas de predicción estructural son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, CLC Main Workbench.

5 Las secuencias de terminación transcripcionales pueden ser específicas de la polimerasa o no específicas, sin embargo, los terminadores transcripcionales seleccionados para su uso en las presentes realizaciones deben formar una "combinación funcional" con el promotor seleccionado, lo que significa que la secuencia del terminador debe ser capaz de terminar la transcripción por el tipo de ARN polimerasa que se inicia en el promotor. Por ejemplo, un promotor eucariótico ARN pol II y terminadores eucarióticos ARN pol II, un promotor T7 y terminadores T7, un promotor T3 y terminadores T3, un promotor reconocido por levadura y secuencias de terminación reconocidas por levadura, etc., generalmente formarían una combinación funcional. El número y la identidad de las secuencias de terminación transcripcionales usadas también pueden seleccionarse basándose en la eficiencia con la que la transcripción se termina a partir de un promotor dado. Por ejemplo, se pueden proporcionar al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más secuencias terminadoras transcripcionales homólogas o heterólogas transcripcionalmente corriente abajo del elemento de codificación de ARN para conseguir una eficiencia de terminación de al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % a partir de un promotor dado.

20 Varias realizaciones se refieren a una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende un promotor y dos o más terminadores transcripcionales en combinación funcional para una terminación eficiente de la transcripción. En algunas realizaciones, un promotor T7, un terminador PTH y un terminador pET-T7 forman una combinación funcional. En algunas realizaciones, un promotor T7, un terminador rrn BT2, un terminador PET, un terminador PTH y un terminador pET-T7 forman una combinación funcional. En algunas realizaciones, las secuencias terminadoras se modifican para eliminar la secuencia que no forma horquilla. En algunas realizaciones, las secuencias terminadoras se modifican para eliminar los desapareamientos en la región del tallo de las horquillas. En algunas realizaciones, las secuencias terminadoras se modifican para aumentar el contenido de GC de las horquillas. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una o más señales de terminación dependientes de Rho y una o más secuencias de terminación independientes de Rho. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una o más señales de terminación dependientes de Rho y un represor TrpR. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una o más señales de terminación independientes de Rho y un represor TrpR. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una o más señales de terminación dependientes de Rho y un represor TyrR. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una o más señales de terminación independientes de Rho y un represor TyrR. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una o más señales de terminación pendientes de Rho y un represor Lacl. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3, o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una o más señales de terminación independientes de Rho y un represor Lacl. En algunas realizaciones, un promotor T7, un promotor T5, un promotor T3 o un promotor SP6 forman una combinación funcional con una secuencia de terminación sintética que forma una estructura secundaria que comprende dos o más horquillas adyacentes de tamaño mediano.

45 Un mecanismo de regulación de la terminación de la transcripción, conocido como terminación intrínseca, implica la formación de una estructura de bucle de horquilla en una cadena de ARN durante la transcripción, que desestabiliza el complejo de elongación de la transcripción (que implica interacciones entre el molde, la transcripción y la ARN polimerasa) y lleva a que la polimerasa se disocia del molde de ADN. En consecuencia, una secuencia de nucleótidos sintética puede diseñarse para codificar un transcrito de ARN que forma una o más estructuras de bucle de horquilla, que promueven la terminación de la transcripción. En varias realizaciones descritas en el presente documento, la eficiencia de la transcripción de ARN se mejora proporcionando una secuencia de nucleótidos que codifica un ARN que forma una estructura secundaria que comprende una o más horquillas transcripcionalmente corriente abajo de un elemento de codificación de ARN. En general, una horquilla puede estar formada por una secuencia de nucleótidos palindrómica que puede plegarse sobre sí misma para formar una región de tallo pareada cuyos brazos están conectados por un bucle de una sola cadena. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos sintética codifica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más horquillas de ARN. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos sintética codifica una secuencia poli-T 3' a una secuencia de nucleótidos palindrómica formadora de horquilla. La estabilidad de la horquilla se puede correlacionar con la eficiencia de terminación, y la estabilidad de la horquilla se determina por su longitud, el número de desapareamientos o protuberancias que contiene y la composición base de la región apareada. Los apareamientos entre guanina y citosina tienen tres enlaces de hidrógeno y son más estables en comparación con los apareamientos de adenina-uracilo, que tienen solo dos. En algunas realizaciones, un tallo codificado por la secuencia de nucleótidos sintética tiene una longitud de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más pares de bases. En determinadas realizaciones, un tallo codificado por la secuencia de nucleótidos sintética tiene una longitud de 12 a 30 pares de bases. En determinadas realizaciones, una horquilla es una horquilla de tamaño mediano que tiene una

región de tallo que comprende aproximadamente de 9 a 25 pares de bases. Una región de formación de bucle puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región de formación de bucle comprende 4-8 nucleótidos. En determinadas realizaciones, la región de formación de bucle comprende 4 nucleótidos. El contenido de G/C de una secuencia de nucleótidos palindrómica formadora de horquilla puede ser de al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o más. En algunas realizaciones, el contenido de G/C de una secuencia de nucleótidos palindrómica formadora de horquilla es al menos del 80 %. En algunas realizaciones, se puede proporcionar una secuencia de nucleótidos sintética que codifica 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más horquillas de ARN transcripcionalmente corriente abajo de un elemento de codificación de ARNbc junto con una o más secuencias terminadoras transcripcionales de origen procariota, eucariota o fago. En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos que codifica una serie de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más uracilos (U) se proporciona 3' a una secuencia de codificación de horquilla.

Se cree que la pausa de la polimerasa durante la elongación es un componente importante de la terminación tanto dependiente de Rho como independiente de Rho. Las proteínas de unión al ADN pueden actuar como impedimentos que hacen que el complejo de elongación de la transcripción se bloquee, lo que promueve la terminación transcripcional. En varias realizaciones, se promueve una terminación transcripcional eficiente proporcionando uno o más sitios de unión para una proteína de unión a ADN 3' al extremo del elemento de codificación de ARN. En algunas realizaciones, se proporcionan uno o más sitios de unión para una proteína de unión al ADN proximal a una secuencia de terminación de la transcripción, de manera que se mejora la eficacia de la terminación. En algunas realizaciones, se proporcionan uno o más sitios de unión para una proteína de unión al ADN proximal a una secuencia de nucleótidos sintética que codifica nucleótidos que forman un bucle de horquilla. En algunas realizaciones, se proporcionan uno o más sitios de unión para una proteína de unión al ADN proximal a un sitio de terminación dependiente de Rho. Se puede usar cualquier proteína de unión al ADN que, cuando se acompleja con el ADN, cause la pausa del complejo de elongación de la transcripción y la desestabilización de la burbuja de transcripción. Por ejemplo, se pueden usar uno o más sitios de unión para el represor TrpR, el represor LacI o el represor TyrR. Otros ejemplos de proteínas de unión al ADN que pueden actuar como represores transcripcionales incluyen PRH, Eve, Krüppel, TGIF, Mad, IRF-2, RP58, E2F-6, MeCP2 y MBD2. Cuando la célula huésped no expresa una proteína endógena de unión al ADN, puede proporcionarse una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión al ADN en un vector que comprende la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería o puede proporcionarse en un vector diferente y puede expresarse bajo el control de un promotor reconocido por la célula huésped o un promotor de fagos, tales como T7, T3 o SP6. En varias realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende uno o más sitios de restricción de endonucleasas específicas del sitio, que no se encuentran en el genoma de la célula huésped, 3' del elemento de codificación de ARN, de manera que la expresión de la endonucleasa específica del sitio en una célula huésped evita la transcripción no deseada de la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería corriente abajo del sitio de restricción al escindir la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería sin alterar el genoma de la célula huésped. Véase, por ejemplo, la Figura 8. La endonucleasa específica del sitio puede ser una meganucleasa, una nucleasa con dedos de zinc (ZFN) o una nucleasa efectora TAL (TALEN). Ejemplos de meganucleasas incluyen, pero sin limitación, I-Anil, I-Scel, I-Ceul, PI-PspI, PI-Sce, I-ScelV, I-Csml, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-Scell, I-Ppol, I-ScellI, I-Crel, I-Ltrl, I-Gpil, I-GZel, I-Onul, I-HjeMI, I-Msol, I-TevI, I-TevII, y I-TevIII. Una secuencia de nucleótidos que codifica la endonucleasa específica del sitio puede proporcionarse en un vector que comprende la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería o puede proporcionarse en un vector diferente. En algunas realizaciones, se puede proporcionar una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa específica del sitio en un vector que codifica una ARN polimerasa, por ejemplo, T7, T3, SV40 o SP6 polimerasa, y puede, opcionalmente, unirse de forma operacional a un promotor reconocido por una célula huésped. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende uno o más sitios 3' de escisión de endonucleasas específicas de sitio de una o más secuencias de terminación. En algunas realizaciones, la construcción de expresión de ARN obtenida por ingeniería comprende uno o más sitios de restricción ZFN, sitios de restricción TALEN o sitios de restricción de meganucleasas seleccionados de entre el grupo que consiste en I-Anil, I-Scel, I-Ceul, PI-PspI, PI-Sce, I-ScelV, I-Csml, I-PanI, I-PanII, I-PanMI, I-Scell, I-Ppol, I-ScellI, I-Crel, I-Ltrl, I-Gpil, I-GZel, I-Onul, I-HjeMI, I-Msol, I-TevI, I-TevII y I-TevIII, 3' de una o más secuencias de terminación de la transcripción seleccionadas de entre el grupo que consiste en el terminador PTH, terminador pET-T7, terminador T3-T ϕ , terminador pBR322-P4, terminador del virus vesicular del estoma, terminador rrnB-TI, terminador rrnC, terminador transcripcional TTadc, terminador de la transcripción Mat α (factor α), la secuencia de terminación de la transcripción del factor α nativo, la secuencia de terminación de la transcripción ADR1, la secuencia de terminación de la transcripción ADH2 y la secuencia de terminación de la transcripción GAPD.

Las construcciones de expresión de ARN obtenidas por ingeniería como se describen en el presente documento, como los que se exponen en las SEQ ID NO: 2, 4, 14, 15 y 20, pueden construirse a partir de elementos de secuencia de componentes e incorporarse en un vector adecuado usando técnicas convencionales de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Hay muchos vectores disponibles para este fin, y la selección del vector adecuado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico que se va a insertar en el vector y la célula huésped particular que se transformará con el vector. Ejemplos de vectores adecuados para su uso de acuerdo con las presentes realizaciones incluyen, pero sin limitación, plásmidos, cósmidos, plastomas, cromosomas bacterianos artificiales, cromosomas de levadura artificial y bacteriófagos. La estructura del vector puede contener diversos componentes dependiendo de la función del vector (amplificación de ADN o expresión de ADN) y la célula huésped

particular con la que es compatible. Por ejemplo, la estructura del vector puede contener uno o más sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico en una forma determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, secuencias de nucleótidos que codifican un marcador seleccionable, tal como un gen de resistencia a antibióticos, que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transducidas con el vector, una secuencia promotora que impulsa la expresión del transgén en la célula huésped y un origen de replicación. Ejemplos de vectores bacterianos disponibles incluyen, pero sin limitación, vectores pUC19, pUC18, pBluescript, pDEST, pBAD, pGEM, pGEX, pACYC184 y pBR322.

En algunas realizaciones, el tamaño de la estructura del vector se minimiza para reducir la cantidad de molde disponible para la transcripción no deseada. En algunas realizaciones, un vector mínimo adecuado para su uso de acuerdo con las presentes realizaciones no comprende uno o más de marcadores seleccionables basados en proteínas, tales como marcadores de resistencia a antibióticos, espaciador no esencial y secuencias de basura que no codifican una función definida. En algunas realizaciones, un vector mínimo adecuado para su uso de acuerdo con las presentes realizaciones consiste esencialmente en un sitio de clonación múltiple, un gen marcador seleccionable y un origen de replicación. Un vector mínimo adecuado para su uso de acuerdo con las presentes realizaciones puede ser inferior a 3 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,7 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,6 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,5 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,4 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,3 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,2 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,1 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 2,0 kb. En algunas realizaciones, el vector es inferior a 1,9 kb. En algunas realizaciones, una o más construcciones de expresión de ARN obtenidas por ingeniería y/o uno o más elementos de codificación de ARN se clonan en el vector mínimo para conseguir un tamaño mínimo de al menos 3kb.

Las moléculas de ARN codificadas por las construcciones de expresión obtenidas por ingeniería descritas en el presente documento pueden sintetizarse *in vitro* o *in vivo* en una célula huésped. La ARN polimerasa endógena de la célula huésped puede mediar la transcripción *in vivo*, o la ARN polimerasa clonada, como, la ARN polimerasa del bacteriófago (por ejemplo, T3, T7, SV40, SP6), se puede usar para la transcripción *in vivo* o *in vitro*.

Uno o más vectores que comprenden una construcción de expresión obtenida por ingeniería como se describe anteriormente pueden introducirse en una amplia diversidad de huéspedes de microorganismos procarióticos y eucarióticos para producir las moléculas de ARN. Varias realizaciones descritas en el presente documento se refieren a una célula huésped que expresa ARN a partir de una construcción de expresión obtenida por ingeniería para minimizar la transcripción improductiva de una secuencia no funcional. Las células huésped adecuadas incluyen, pero sin limitación, hongos, hongos filamentosos, levaduras, algas y bacterias. Para evitar la degradación de las moléculas de ARNbc transcritas en la célula huésped, se puede usar un huésped deficiente en ARNasa III.

En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula eucariota. Las células huésped eucariotas adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de hongos, células de algas, células de insectos y células de plantas. Las células huésped de hongos adecuadas incluyen, pero sin limitación, células de levadura y células de hongos filamentosos.

En una realización, la célula huésped del hongo es una levadura. En una realización, la levadura es de uno de los géneros: *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Yarrowia*. En algunas realizaciones, la célula de levadura es *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia thalophila*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia quercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stipitis*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, o *Yarrowia lipolytica*.

En otras realizaciones, la célula huésped es una célula procariótica. Las células procarióticas adecuadas incluyen células bacterianas gram positivas, gram negativas y gram variables. Las células huésped procarióticas adecuadas incluyen, pero sin limitación, especies de: *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Butyrivibrio*, *Buchnera*, *Campestris*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Chromatium*, *Coprococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Francisella*, *Flavobacterium*, *Geobacillus*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Ilyobacter*, *Microbacterium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Prochlorococcus*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodopseudomonas*, *Roseburia*, *Rhodospirillum*, *Rhodococcus*, *Scenedesmun*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Synnecoccus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Thermoanaerobacterium*, *Tropheryma*, *Tularensis*, *Temecula*, *Thermosynechococcus*, *Thermococcus*, *Ureaplasma*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Yersinia* y *Zymomonas*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana no es patógena para los seres humanos.

En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Bacillus*, por ejemplo, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. lautus*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus* y *B. amyloliquefaciens*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Clostridium*, por ejemplo, *C. acetobutylicum*, *C. tetani E88*, *C. lituseburense*, *C. saccharobutylicum*, *C. perfringens*, y *C. beijerinckii*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Corynebacterium*, por ejemplo, *C. glutamicum* y *C. acetoacidophilum*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana

- es una cepa de *E. coli* deficiente en ARNasa III, por ejemplo, *E. coli* HT115 (DE3). En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Erwinia*, por ejemplo, *E. uredoovora*, *E. carotovora*, *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. punctata* y *E. terreus*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Pantoea*, por ejemplo, *P. citrea* y *P. agglomerans*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. putida*, *P. mevalonii* y *P. sp. D-0110*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Streptococcus*, por ejemplo, *S. equisimilis*, *S. pyogenes*, y *S. uberis*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Streptomyces*, por ejemplo, *S. ambofaciens*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. fungicidicus*, *S. griseus*, y *S. lividans*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Zymomonas*, por ejemplo, *Z. mobilis* y *Z. lipolytica*.
- En algunas realizaciones, microorganismos, como bacterias, algas y hongos, que se sabe que habitan el filoplano (la superficie de las hojas de la planta) y/o la rizosfera (el suelo que rodea las raíces de la planta) de una amplia diversidad de cultivos importantes pueden ser células huésped deseables para la producción y entrega de ARNbc. Para evitar la degradación de las moléculas de ARNbc transcritas en los microorganismos huésped, se puede usar un huésped deficiente en ARNasa III. De particular interés son los microorganismos, como bacterias, por ejemplo, los géneros *Bacillus* (incluidas las especies y subespecies *B. thuringiensis kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis kurstaki* HD-73, *B. thuringiensis sotto*, *B. thuringiensis berliner*, *B. thuringiensis thuringiensis*, *B. thuringiensis tolworthi*, *B. thuringiensis dendrolimus*, *B. thuringiensis alesti*, *B. thuringiensis galleriae*, *B. thuringiensis aizawai*, *B. thuringiensis subtoxius*, *B. thuringiensis entomocidus*, *B. thuringiensis tenebrionis* y *B. thuringiensis san diego*); *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Zanthomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Methylophilus*, *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Leuconostoc* y *Alcaligenes*; hongos, particularmente levadura, por ejemplo, géneros *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula* y *Aureobasidium*. De particular interés son las especies bacterianas de la fitosfera como *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Acetobacter xylinum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium melioli*, *Alcaligenes eutrophus* y *Azotobacter vinlandii*; y especies de levadura de la fitosfera como *Rhodotorula rubra*, *R. glutinis*, *R. marina*, *R. aurantiaca*, *Cryptococcus albidus*, *C. diffluens*, *C. laurentii*, *Saccharomyces rosei*, *S. pretoriensis*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces roseus*, *S. odorus*, *Kluyveromyces veronae* y *Aureobasidium pollulans*.

- Varias realizaciones se refieren a un sistema de expresión celular para producir ARNbc con una eficiencia transcripcional mejorada a partir de una construcción de expresión obtenida por ingeniería para minimizar la transcripción improductiva de la secuencia no funcional. En un aspecto, se proporciona un procedimiento para producir ARNbc cultivando células huésped que comprenden una construcción de expresión obtenida por ingeniería como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula huésped expresa ARNbc de una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones, la célula huésped expresa ARNbc de una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende la SEQ ID NO: 4. En otras realizaciones, la célula huésped expresa ARNbc de una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende la SEQ ID NO: 14. En otras realizaciones, la célula huésped expresa ARNbc de una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende la SEQ ID NO: 15. En otras realizaciones, la célula huésped expresa ARNbc de una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende la SEQ ID NO: 20. En algunas realizaciones, la célula huésped es una célula bacteriana, por ejemplo, una célula de *E. coli*, que es deficiente en RNasa III.

Los procedimientos de empleo de tecnologías de ADN recombinante para preparar una construcción de ADN recombinante y un vector que codifica una molécula de ARN de interés, y para transformar y generar células huésped que transcriben la molécula de ARN están fácilmente disponibles en la técnica.

C. Aplicación de ARNbc

- Varias realizaciones se refieren a composiciones y procedimientos para entregar ARNbc transcrito a partir de una construcción de expresión obtenida por ingeniería para minimizar la transcripción improductiva de una secuencia no funcional como se describe anteriormente para un organismo diana. En algunas realizaciones, el ARNbc se sintetiza *in vitro* a partir de la construcción de expresión obtenida por ingeniería y se proporciona al organismo diana. En otras realizaciones, el ARNbc proporcionado al organismo diana se transcribe en una célula huésped (*in vivo*) a partir de la construcción de expresión obtenida por ingeniería.

- Determinadas realizaciones se refieren a un procedimiento para entregar ARNbc a un organismo diana que comprende expresar el ARNbc de una construcción de expresión obtenida por ingeniería como se describió anteriormente en una célula huésped y proporcionar el ARNbc transcrito de la célula huésped al organismo diana. En algunas realizaciones, el ARNbc transcrito de la célula huésped se aísla de la célula huésped y se purifica antes de proporcionarse al organismo diana. Por ejemplo, el ARNbc puede purificarse a partir de un lisado de células huésped mediante extracción con un disolvente o resina, precipitación, electroforesis, cromatografía o una combinación de los mismos. Como alternativa, el ARNbc puede usarse con una purificación mínima o sin purificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una célula huésped que comprende ARNbc transcrito a partir de una construcción de expresión obtenida por ingeniería o un lisado preparado a partir de la célula huésped que expresa ARNbc se proporciona al organismo diana. En algunas realizaciones, el ARNbc suprime un gen esencial del organismo diana. En otras realizaciones, el ARNbc suprime un gen esencial de una plaga o patógeno del organismo

diana. Por ejemplo, el ARNbc puede suprimir un gen viral.

Como se ha descrito anteriormente, una célula huésped, como una bacteria o levadura, puede obtenerse por ingeniería para producir ARNbc a partir de una construcción de expresión obtenida por ingeniería como se describe en el presente documento. Estas células huésped pueden ser ingeridas por una plaga de insectos u otro organismo dirigido. Cuando se toma, el ARNbc puede iniciar una respuesta de ARNi, lo que lleva a la degradación del ARNm diana y el que el ARNm diana codifica una proteína esencial, debilitando o matando al organismo que se alimenta. Como se muestra en el Ejemplo 3, las moléculas de ARNbc transcritas *in vitro* de alimentación que comprenden secuencias de ARN del escarabajo de patata de Colorado (CPB), moléculas de ARNbc transcritas con bacterias que comprenden secuencias de ARN de CBP, o bacterias que expresan ARNbc que comprenden secuencias de ARN de CPB transcritas de una construcción de expresión de ARNbc obtenida por ingeniería a larvas de CPB, todas dan como resultado la muerte o inhibición del desarrollo y diferenciación de las larvas que ingieren las composiciones de ARNbc. Todas las preparaciones de ARNbc de CPB mostraron una actividad significativa contra las larvas de CPB, con la concentración más baja (0,00002 mg/ml) de la preparación de bacterias que expresan ARNbc de CPB que inhibe el 87,5 % de los crecimientos de CPB. La actividad de las bacterias que expresan ARNbc en la inhibición del crecimiento y desarrollo del organismo diana indica que las células huésped obtenidas por ingeniería para expresar de manera eficiente el ARNbc tal como se describe en el presente documento pueden proporcionarse directamente a un organismo diana, por ejemplo, mediante la alimentación, para suprimir la actividad de un gen diana sin la necesidad de etapas de purificación de ARN adicionales.

La célula huésped, que en muchas aplicaciones es una célula bacteriana, de levadura o de algas, debe matarse preferentemente antes de ser suministrada a un organismo diana o a una fuente de alimento de un organismo diana. Por ejemplo, cuando se usa una bacteria que expresa ARNbc como un plaguicida biológico u otra aplicación en la que se usa una célula huésped que expresa ARNbc obtenido por ingeniería en un entorno en el que es probable el contacto con seres humanos u otros mamíferos. Las células huésped que expresan ARNbc pueden destruirse por cualquier medio que no dé como resultado una degradación significativa del ARNbc. Por ejemplo, las células huésped pueden destruirse por tratamiento térmico, por tratamiento químico, por ejemplo, tratamiento con fenol o formaldehído, o por ruptura mecánica. En algunas realizaciones, las células huésped se destruyen sin lisis significativa. En algunas realizaciones, las células huésped, por ejemplo, las células bacterianas, se calientan a una temperatura suficiente para destruir las células sin causar lisis. Por ejemplo, las células huésped pueden calentarse a una temperatura de al menos 59 °C, 60 °C, 61 °C, 62 °C, 63 °C, 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C, 68 °C, 69 °C, 70 °C, 71 °C, 72 °C, 73 °C, 74 °C, o al menos 75 °C.

En algunas realizaciones, la célula huésped que expresa ARNbc obtenido por ingeniería se lisa y el lisado celular se proporciona a un organismo diana o a una fuente de alimento de un organismo diana. Las células huésped que expresan ARNbc pueden ser lisadas por cualquier medio que no dé como resultado una degradación significativa del ARNbc. Por ejemplo, las células huésped pueden lisarse por congelación y descongelación, por tratamiento con un producto químico, por ejemplo un detergente, tolueno o hidróxido de sodio, por tratamiento enzimático o por ruptura mecánica, por ejemplo, por homogeneización. En algunas realizaciones, el lisado bruto se proporciona a un organismo diana o a una fuente de alimento de un organismo diana. En otras realizaciones, se proporciona un lisado parcialmente purificado o un ARNbc expresado en células huésped aislado a un organismo diana o a una fuente de alimento de un organismo diana.

Otra realización se refiere a procedimientos y composiciones para evitar o inhibir una enfermedad viral en un organismo diana, por ejemplo, un mamífero, un ave, un artrópodo o un pez. Ejemplos específicos de organismos diana incluyen, pero sin limitación, cerdos, vacas, bisontes, caballos, cabras, pollos, codornices, patos, gansos, pavos, camarones, langostinos, langosta, cangrejo, abejas, salmón, tilapia, lubina, carpa y el bagre. En una realización, un ARNbc que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN de un gen viral se administra a un organismo diana, de modo que la expresión del gen viral dirigido se silencia. En una realización, una composición de ARNbc antiviral se incorpora en una fuente de alimento o se aplica a la superficie de una fuente de alimento, por ejemplo, una planta de cultivo, para el consumo por un organismo diana. En un aspecto, la composición antiviral de ARNbc comprende moléculas de ARNbc transcritas a partir de una construcción de expresión obtenida por ingeniería para minimizar la transcripción improductiva de la secuencia no funcional como se describe anteriormente. En otro aspecto, la composición anti-viral de ARNbc comprende células huésped que expresan ARNbc destruidas como se describe anteriormente o un lisado de las mismas. En algunas realizaciones, una célula bacteriana destruida por calor no lisada que comprende una construcción de expresión obtenida por ingeniería para minimizar la transcripción improductiva de la secuencia no funcional como se describe anteriormente se alimenta a un organismo diana seleccionado de entre el grupo que consiste en mamíferos, aves, artrópodos o peces. En una realización, el organismo diana es un camarón o langostino y la construcción de expresión obtenida por ingeniería codifica un ARNbc que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de al menos una parte de un transcrito de ARN de un gen del virus del síndrome de la mancha blanca, el baculovirus de *Monodon*, el virus de la necrosis de la glándula del intestino medio baculoviral, el virus de la necrosis hematopoyética, el virus de la cabeza amarilla, el virus del síndrome de Taura, el virus de la mionecrosis infecciosa, el nodavirus *Macrobrachium rosenbergii*, el virus Laem-Singh o el virus Mourilyan. En una realización, el organismo diana es un pez y la construcción de expresión obtenida por ingeniería codifica un ARNbc que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN de un gen del virus de la necrosis hematopoyética epizootica, el iridovirus de la dorada roja, el virus del

herpes de Koi, el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, el virus de la septicemia hemorrágica viral, la viremia de primavera del virus de la carpa, el virus de la anemia infecciosa del salmón, o el virus de la necrosis nerviosa viral.

5 Varias realizaciones se refieren a composiciones y procedimientos para controlar infestaciones de plagas de invertebrados. En algunas realizaciones, se proporciona un sistema de entrega para el suministro de composiciones plaguicidas de ARNbc a plagas de invertebrados a través de su exposición a una dieta que contiene las composiciones plaguicidas de ARNbc. En una realización, las composiciones plaguicidas de ARNbc se incorporan a una fuente de alimento de la plaga o se aplican a la superficie de una fuente de alimento de la plaga, por ejemplo, una planta de cultivo, para el consumo de una plaga de invertebrados. En un aspecto, las composiciones plaguicidas de ARNbc comprenden moléculas de ARNbc purificadas transcritas a partir de una construcción de expresión obtenida por ingeniería o para minimizar la transcripción improductiva de la secuencia no funcional como se describe anteriormente. En otro aspecto, las composiciones plaguicidas de ARNbc comprenden las células huésped destruidas y no lisadas que expresan ARNbc como se describió anteriormente. En otro aspecto, las composiciones plaguicidas de ARNbc comprenden el lisado no purificado o mínimamente purificado de células huésped que expresan ARNbc como se describió anteriormente. Las composiciones, además del ARNbc, las células huésped o el lisado, pueden contener excipientes, diluyentes o vehículos adicionales.

Otra realización se refiere a procedimientos y composiciones para inhibir la propagación de una enfermedad viral en una población de plantas, por ejemplo, plantas de cultivo. Los virus de plantas generalmente se transmiten a una planta por un vector artrópodo o nematodo. Por lo tanto, la infección de una planta por un virus puede inhibirse suprimiendo la expresión génica viral en el vector artrópodo o nematodo. Por lo tanto, se proporcionan composiciones y procedimientos para inhibir la expresión génica viral en un vector artrópodo o nematodo. Una realización se refiere a un procedimiento que comprende administrar un ARNbc, en el que el ARNbc comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN de un gen del virus de la planta, a un vector artrópodo o nematodo, de modo que la expresión del gen viral dirigido se silencia. El transcrito de ARN dirigido puede ser de un *virus del mosaico Abutilon*, un *virus del mosaico de la yuca africana*, un *virus del mosaico de la alfalfa*, un *virus del mosaico Arabis*, un *virus del mosaico suave de la cebada*, un *virus de la enana amarilla de la cebada*, un *virus del mosaico amarillo de la cebada*, un *virus de la parte superior de la remolacha*, un *virus de los amarillos del oeste de la remolacha*, un *virus del mosaico dorado de la judía*, un *virus del rizado de la hoja de la remolacha*, un *virus de la vena amarilla necrótica de la remolacha*, un *virus transmitido por el suelo de la remolacha*, un *virus del amarillo oeste de la remolacha*, un *virus del mosaico Brome*, un *begomovirus del mosaico de la yuca*, un *virus del mosaico de la coliflor*, un *virus del mosaico del pepino*, un *virus de la necrosis del pepino*, un *virus de los amarillos transmitido por el áfido de Cucurbit*, un *virus del brote hinchado del cacao*, un *virus del raquitismo de la vid*, un *virus asociados con el enrollamiento de la vid*, un *virus A de la vid*, un *virus B de la vid*, un *virus de la mancha anular del cacahuate*, un *virus de la mancha amarilla del iris*, un *virus del mosaico de la hierba Johnson*, un *virus infeccioso de la lechuga amarillo*, un *virus del mosaico de la lechuga*, un *virus del pardeamiento temprano del guisante*, un *virus de la mancha anular de la pimienta*, un *virus del enrollamiento de la patata*, un *virus de la fregona de la patata*, un *virus enano de arroz*, un *virus de la acrobacia irregular del arroz*, un *virus del mosaico del trigo transmitido por el suelo*, un *virus del mosaico de la judía del sur*, un *virus de la mancha anular latente de la fresa*, un *virus del moteado plumoso de la batata*, un *virus del mosaico del tabaco*, un *virus cascabel del tabaco*, un *virus de la mancha anular del tabaco*, un *virus del anillo negro del tomate*, un *virus de la mancha clorótica del tomate*, un *virus del mosaico dorado del tomate*, un *virus del rizado amarillo de la hoja del tomate*, un *virus del marchitamiento manchado del tomate*, un *virus del mosaico de tabaco de terciopelo* o un *virus del mosaico de la raya del trigo*. En una realización, una composición de ARNbc antiviral se incorpora en una fuente de alimento o se aplica a la superficie de una fuente de alimento, por ejemplo, una planta de cultivo, para el consumo por un vector viral. En un aspecto, la composición anti-viral de ARNbc comprende moléculas de ARNbc purificadas transcritas de una construcción de expresión obtenida por ingeniería para minimizar la transcripción improductiva de la secuencia no funcional como se describe anteriormente. En otro aspecto, la composición anti-viral de ARNbc comprende células huésped destruidas y no lisadas que expresan ARNbc como se describió anteriormente. En otro aspecto, la composición antiviral de ARNbc comprende el lisado no purificado o mínimamente purificado de células huésped que expresan ARNbc como se describió anteriormente. El vector artrópodo puede ser un vector insecto, por ejemplo, pulgones, escarabajos, chicharras, chicharritas, cochinillas, ácidos, ácaros, trips y moscas blancas. Las composiciones, además del ARNbc, las células huésped o el lisado, pueden contener excipientes, diluyentes o vehículos adicionales. Las composiciones que comprenden un microorganismo destruido por calor que expresa ARNbc o un lisado del mismo deben ser lo suficientemente estables de modo que el ARNbc permanezca sin degradar y sea capaz de mediar el ARNi incluso cuando se expone a condiciones ambientales externas durante un período de tiempo, que puede ser un período de días o semanas.

En las realizaciones descritas en el presente documento, el ARNbc puede expresarse por microorganismos que comprenden una construcción de expresión obtenida por ingeniería para minimizar la transcripción improductiva de la secuencia no funcional como se describió anteriormente y los microorganismos o un lisado de los mismos pueden aplicarse sobre una superficie de una planta o semilla o introducirse en una semilla, raíz, tallo u hoja por un medio físico, como una inyección, o en el caso de una semilla por imbibición. Por ejemplo, la entrega de microorganismos que comprenden una construcción de expresión obtenida por ingeniería como se describe en el presente documento a las superficies de una planta puede ser a través de una aplicación de pulverización. En una realización, una

bacteria o levadura obtenida por ingeniería para producir y acumular ARNbc puede cultivarse y los productos del cultivo, como una bacteria o levadura destruida por calor o un lisado de las mismas, puede formularse como una composición compatible con las prácticas agrícolas comunes. La naturaleza de cualquier excipiente y la forma física de la composición pueden variar dependiendo de la naturaleza del sustrato tratado. Por ejemplo, la composición puede ser un líquido que se cepilla o pulveriza o se imprime en el sustrato a tratar, o un revestimiento o polvo que se aplica al sustrato a tratar. Por lo tanto, en una realización, la composición está en forma de un revestimiento sobre una superficie adecuada que se adhiere, y con el tiempo es ingerida por un organismo diana, como un insecto o nematodo, que entra en contacto con el revestimiento.

Las formulaciones de pulverización para plantas de cultivo pueden incluir adherentes y humectantes adecuados para una cobertura foliar eficiente, así como protectores contra la radiación UV para proteger a los ARNbc de los daños causados por la radiación UV. Por ejemplo, podría ser deseable tener una formulación de un microorganismo destruido por calor que ayudaría a dispersar el microorganismo en una película sobre la superficie de la hoja, o mover el microorganismo eliminado por calor a los espacios intercelulares de la hoja, y/o que proporcionaría cierta capacidad para que el microorganismo se adhiriera a la hoja en condiciones ambientales húmedas (resistencia a la lluvia). Dichos aditivos son de uso común en la industria de los bioinsecticidas y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Análogamente, las formulaciones para la aplicación al suelo pueden incluir formulaciones granulares que sirven como cebo para las larvas de plagas de insectos del suelo, como el gusano de la raíz del maíz. Dichas aplicaciones podrían combinarse con otras aplicaciones de insecticidas, de base biológica o no, para potenciar la protección de las plantas frente al daño por alimentación de insectos. Por ejemplo, cuando las proteínas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) se proporcionan en la dieta de las plagas de insectos, un modo de acción para controlar la plaga de insectos. Por lo tanto, varias realizaciones se refieren a combinaciones sinérgicas de las composiciones de ARNbc y procedimientos descritos en el presente documento con procedimientos y composiciones de Bt, que incluyen formulaciones tóxicas y enfoques transgénicos para controlar la infestación de insectos.

Ejemplos de plantas a las que se pueden aplicar los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, alfalfa, aneth, manzana, albaricoque, alcachofa, rúcula, espárragos, aguacate, banana, cebada, frijoles, remolacha, mora, arándano azul, brécol, coles de Bruselas, repollo, colza, melón cantaloupe, zanahoria, mandioca, coliflor, apio, cereza, cilantro, cítricos, clementina, café, maíz, algodón, pepino, abeto de Douglas, berenjena, endibia, escarola, eucalipto, hinojo, higos, porongo, uva, pomelo, miel, jícama, kiwi, lechuga, puerro, limón, lima, pino Loblolly, mango, melón, seta, nueces, avena, okra, cebolla, naranja, una planta ornamental, papaya, perejil, guisante, melocotón, cacahuete, pera, pimiento, caqui, pino, piña, plátano, ciruela, granada, álamo, patata, calabaza, membrillo, pino radiata, achicoria, rábano, frambuesa, arroz, centeno, sorgo, pino del sur, soja, espinaca, zapallo, fresa, remolacha azucarera, caña de azúcar, girasol, batata, estoraque, mandarina, té, tabaco, tomate, césped, vid, sandía, trigo, ñame y calabacín.

Los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden aplicarse a cualquier planta monocotiledónea o dicotiledónea, o pueden aplicarse a través de formulaciones farmacéuticamente aceptables para animales vertebrados o invertebrados con el fin de proporcionar algún nivel de reducción de la expresión del gen diana. La inhibición de la expresión del gen diana se puede cuantificar midiendo el ARN diana endógeno o la proteína producida por la traducción del ARN diana y las consecuencias de la inhibición se pueden confirmar mediante el examen del fenotipo exterior de la célula u organismo diana. Las técnicas para cuantificar ARN y proteínas son bien conocidas por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, la expresión del gen diana se inhibe en al menos un 10 %, en al menos un 33 %, en al menos un 50 % o en al menos un 80 %. En algunas realizaciones, la expresión del gen diana se inhibe en al menos un 90 %, en al menos un 95 %, o en al menos un 99 % dentro de las células del organismo dirigido, por lo que se produce una inhibición significativa. Puede decirse que se produce una inhibición significativa cuando la administración de un ARNbc a un organismo diana da como resultado un fenotipo detectable (por ejemplo, el cese del crecimiento larvario, la parálisis o la mortalidad, etc.) o una disminución detectable en el ARN y/o proteína endógena correspondiente al gen diana. Mientras que en algunas realizaciones, la inhibición se produce en sustancialmente todas las células del organismo diana, en algunas realizaciones, la inhibición puede producirse solo en un subconjunto de células que expresan el gen. Por ejemplo, si el gen dirigido desempeña una función esencial en las células del tracto alimentario de un insecto, la inhibición del gen dirigido dentro de estas células es suficiente para ejercer un efecto perjudicial deseado sobre el insecto.

Ejemplo 1

Diseño del vector de producción de ARNbc

Se seleccionó una secuencia diana, los nucleótidos 30-309 de la SEQ ID NO 1, del ortólogo supuesto del escarabajo de la patata de Colorado (CPB) del coatómero de COPI.

SEQ ID NO 1:

> Ld_F38E11.5 ortólogo supuesto de coatómero de COPI; Alias Ld248; 14810:1..379

CGTAACCGCGGTTTGTTCACCCCTGAACTACCTGTGGCTCTCACAGGCAGCGAAGATGG
 TACCGTTAGAGTTTGGCATAACGAATACACACAGATTAGAGAATTGTTTGAATTATGGGTT
 CGAGAGAGTGTGGACCATTTGTTGCTTGAAGGGTTCCAATAATGTTTCTCTGGGGTATGA
 CGAGGGCAGTATATTAGTGAAAGTTGGAAGAGAAGAACCAGGAGTTAGTATGGATGCCAG
 TGGCGGTAAAATAATTGGGCAAGGCACCTCGGAATTACAACAAGCTAATTTGAAGGCGCT
 GCCAGAAGGTGGAGAAATAAGAGATGGGGAGCGTTTACCTGTCTCTGTAAAAGATATGGG

AGCATGTGAAATATACCCCT

5 Se diseñó un elemento de codificación de ARNbc que contiene una secuencia sentido (nucleótidos 4-283 de la SEQ ID NO 2), que corresponde a la secuencia diana del coatómero CPB COPI, una secuencia de codificación de 150 nucleótidos en bucle (nucleótidos 284-433 de la SEQ ID NO 2) y una secuencia antisentido (nucleótidos 434-713 de la SEQ ID NO 2) que es el complemento inverso de la secuencia diana del coatómero CPB COPI.
 SEQ ID NO 2

GGGTACCTGTGGCTCTCACAGGCAGCGAAGATGGTACCGTTAGAGTTTGGCATAACGAATACACACAGATTAGAGA
 ATTGTTTGAATTATGGGTTTCGAGAGAGTGTGGACCATTTGTTGCTTGAAGGGTTCCAATAATGTTTCTCTGGGGT
 ATGACGAGGGCAGTATATTAGTGAAAGTTGGAAGAGAAGAACCAGGAGTTAGTATGGATGCCAGTGGCGGTAAAA
 TAATTTGGGCAAGGCACCTCGGAATTACAACAAGCTAATTTGAAGGCGCTGCCAGAAGGaaagtactgcgatcgcgt
 taacgctttatcaegataccttctaccacatactcaactcaacactcactcctcgcagcagatccact
 cgatcactactctcacaegacogattaactcctcactccacggcgccgcctgcaggagcCCTTCTGGCAGCGCCTT
 CAAATTAGCTTGTGTAAATCCGAGTGCCTTGCCCAAATTTTACCAGCCACTGGCATCCATACTAACTGCCGG
 TTCTTCTCTTCCAACCTTCACTAATATACTGCCCTCGTCATACCCAGAGAAACATTATTCGAACCCCTTCAAGCA
 ACAAATGGTCCACACTCTCTCGAACCATAATTCAAACAATCTCTAATCTGTGTGTATTTCGTATGCCAAACTCT
 AACGGTACCATCTTCGCTGCCTGTGAGAGCCACAGGTA

10 Se construyeron dos vectores de plásmidos para producir ARNbc de CPB usando el vector de clonación pUC19, que contiene un gen de resistencia a la ampicilina, un fragmento N-terminal del gen lac Z de *E. coli*, un sitio de clonación múltiple y un origen de replicación. El vector CPB-hp se construyó de tal manera que un promotor T7 está unido de forma operacional a la región de codificación de ARNbc de la SEQ ID NO 2. Véase la Figura 2A, que muestra un mapa esquemático del vector pCPB-hp. Para evitar o minimizar la translectura de regiones no codificantes de ARNbc por la ARN polimerasa T7 y la producción de ARNmc inútil a partir de la estructura del plásmido, se construyó el vector pCPB-hp + 2T colocando dos secuencias de terinadores T7 (terminador PTH y terminador pET-
 15 T7) en el extremo 3' de la región de codificación ARNbc. Véase las Figuras 2B y 2C, que muestra mapas esquemáticos del vector pCPB-hp + 2T.

20 La cepa de *E. coli* HT115 (DE3) se compró en el Centro de Genética Caenorhabditis, Universidad de Minnesota (el genotipo de HT115 (DE3) es: F-, mcrA, mcrB, IN (rrnD-rrnE) 1, lisógeno rnc14::Tn10 (DE3): promotor de lavUV5 -T7 polimerasa (RNAasa III menos)). Las células de *E. coli* HT115 (DE3) se transformaron con pUC19 (control), pCPB-hp o pCPB-hp + 2T y se cultivaron durante una noche a 37 °C o 25 °C. El ARN total se aisló a partir de 20 ul de cultivo y se ejecutó directamente en un gel de agarosa (Figura 3A, calles marcadas 1 (pUC19), 2 (pCPB-hp) y 3 (pCPB-hp + 2T)) o se trató con ARNasa antes de ejecutarse en un gel de agarosa (Figura 3B, calles marcadas 1 (pUC19), 2 (pCPB-hp), y 3 (pCPB-hp + 2T)).

25 Las células de *E. coli* HT115 (DE3) también se transformaron con dos plásmidos, uno que lleva un molde de ARNbc (pUC19 (control), pCPB-hp o pCPB-hp + 2T) y el otro que lleva la ARN polimerasa T7 bajo el control de un elemento inducible (polimerasa T7 inducible por IPTG). Las células transformadas se cultivaron durante una noche a 37 °C o 25 °C. El ARN total se aisló a partir de 20 ul de cultivo y se ejecutó directamente en un gel de agarosa (Figura 3A, calles marcadas 4 (pUC19 & pLac-T7), 5 (pCPB-hp & pLac-T7), y 6 (pCPB-hp + 2T & pLac-T7) o se trató con ARNasa antes de ejecutarse en un gel de agarosa (Figura 3B, calles marcadas con 4 (pUC19 & pLac-T7), 5 (pCPB-hp & pLac-T7), y 6 (pCPB-hp + 2T & pLac-T7)).
 30

35 Como se muestra en la Figura 3A y Figura 3B, las células transformadas cultivadas a 37 °C produjeron más ARN que las células cultivadas a 25 °C, el rendimiento de ARNbc mejoró mediante la expresión de la polimerasa T7 en las células huésped, y la inclusión de dos secuencias terminadoras 3' en el molde de ARNbc dio como resultado aumentos adicionales en el rendimiento de ARNbc. Se observó un rendimiento de 30-50 mg/l de ARNbc a partir de células de *E. coli* que expresan ARN polimerasa de T7 y la construcción de ARNbc de pCPB-hp + 2T. (Datos no mostrados).

Ejemplo 2

Producción *in vivo* de ARNbc del escarabajo de la patata de Colorado (CPB)

1. Transformación

Los plásmidos pCPB-hp + 2T y pLac-T7 se transformaron en la cepa HT115 (DE3) de *E. coli* como se describe en el Ejemplo 1. Después de la transformación, las células de *E. coli* se colocaron en placas y se seleccionaron colonias individuales.

2. Condición de cultivo

- 5 Las colonias individuales se cultivaron 6-8 horas a 37 °C en 3 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de tetraciclina para producir un cultivo de semilla. Para inducir la expresión de ARN_{bc}, se inocularon 200 µl del cultivo de semilla en un matraz de 250 ml con medio de inducción automático de 50 ml (AIM) (Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207-234) que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 12,5 µg/ml de tetraciclina y luego se incubó. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 g durante 10 minutos a 4 °C.

10 3. Purificación de ARN

- El ARN bacteriano se purificó usando un procedimiento adaptado del protocolo SNAP de Stead (Stead y col., Nucleic Acids Res. 2012 Nov 1; 40(20):e156) con modificación del tampón de extracción de ARN como se describe a continuación. Un mililitro de cultivo bacteriano (~10⁸ células) se centrifugó a 16.000 g durante 30 s y se eliminó el sobrenadante. El sedimento celular se almacenó en hielo seco hasta que estuvo listo para la extracción. Los sedimentos celulares se resuspendieron luego en 100 µl de solución de extracción de ARN modificada [EDTA 18 mM, 0,025 % de SDS, TCEP 5 mM, 95 % de formamida (grado de ARN)] mediante agitación vigorosa con formación de vórtice. El 1 % de 2-mercaptoetanol utilizado en la solución de extracción de ARN del protocolo SNAP de Stead se reemplazó con TCEP 5 mM porque el TCEP tiene una toxicidad mucho menor en comparación con el 2-mercaptoetanol y una eficacia igual con el 2-mercaptoetanol (datos no mostrados).

- 20 Después de la resuspensión en una solución de extracción de ARN modificada, las células se lisaron incubando la muestra a 95 °C en un baño de agua durante 7 minutos. Los residuos celulares se sedimentaron centrifugando la muestra caliente a 16.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo nuevo sin alterar el sedimento.

- 25 El ARN total aislado de las células pCPB-hp+2T de *E. Coli* no inducidas (Figura 4, calle 1) e inducidas (Figura 4, calle 2) se diluyó con H₂O y se ejecutaron en un gel de agarosa. Como se muestra en la Figura 4, se observó una banda correspondiente al ARN_{bc} de CPB en las células pCPB-hp+2T de *E. Coli* inducidas pero no en las células pCPB-hp + 2T de *E. Coli* no inducidas.

Ejemplo 3

Comparación de ARN transcrito *in vivo* e *in vitro*

- 30 El plásmido pCPB-hp + 2T se linealizó y se usó como molde para la transcripción *in vitro* de ARN. El ARN transcrito *in vitro* (Figura 5A, calles 9 y 10) se ejecutó en un gel de agarosa junto con ARN transcrito con bacterias purificado de acuerdo con el protocolo SNAP modificado descrito en el Ejemplo 1 y se diluyó directamente en H₂O (Figura 5A, calles 5 y 6) o se filtró con una membrana de corte molecular 30K (Amicon) para eliminar reactivos como EDTA, SDS, TCEP y formamida, antes de diluir con H₂O (Figura 5A, calles 5 y 6) para determinar el tamaño de los transcritos de ARN. Se observó que el ARN transcrito *in vivo* es más grande que el ARN transcrito con bacterias (véase la Figura 5A).

- 40 El ARN transcrito *in vitro* e *in vivo* (con bacterias) se incubó con la ARNasa A, que digiere el ARN monocatenario pero no bicatenario. Como se muestra en la Figura 5B, después de la digestión con ARNasa A, el tamaño de los productos de transcripción de ARN *in vivo* (calles 5-8) e *in vitro* (calles 9 y 10) son idénticos. Esto indicó que el aumento de tamaño del ARN transcrito *in vitro* se debía a la presencia del bucle de horquilla de una sola cadena; que se elimina en la célula bacteriana por procesamiento de ARN.

Ejemplo 4

Destrucción por calor de *E. coli*

- 45 Se determinó experimentalmente el intervalo de temperatura para células de *E. coli* HT115 (DE3) que se destruyen por calor sin lisis celular. Las células de *E. coli* HT115 (DE3) se incubaron a diferentes temperaturas de 37 °C a 72 °C durante 30 minutos. Las células tratadas con calor se examinaron luego al microscopio para determinar si se había producido la lisis y se extendieron en placas de LB y se incubaron durante una noche para determinar la capacidad de supervivencia después del tratamiento térmico. Como se muestra en la Tabla 1, el calentamiento a temperaturas de 59 °C y más destruyó a todas las células, sin embargo, no se observó lisis celular para ninguna de las temperaturas probadas, hasta 72 °C (véase la Figura 6).

TABLA 1: Lisis celular y capacidad de supervivencia después del tratamiento térmico

| | 37 °C | 51 °C | 54 °C | 59 °C | 62 °C | 67 °C | 69 °C |
|---|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Lisis celular de baja DO (microscopio) | - | - | - | - | - | - | - |
| Supervivencia celular de baja DO (placa LB) | + | + | - | - | - | - | - |
| Lisis celular de alta DO (microscopio) | - | - | - | - | - | - | - |
| Supervivencia celular de alta DO (placa LB) | + | + | < 10 % | - | - | - | - |

Todas las células fueron tratadas durante 30 minutos a diferentes temperaturas. La DO baja es DO₆₀₀" 0,2 y la DO alta es DO₆₀₀"2.

Ejemplo 5

Optimización del rendimiento de ARNbc bacteriano-medio del crecimiento

5 Tres medios ricos, medios de inducción automática (AIM) (Studier, Protein Expression y Purification 41 (2005) 207-234), Super Broth (Atlas, RM Handbook of microbiological media. 1997. CRC Press, Nueva York, EE.UU.) + el medio y el plásmido + el medio AIM, se probaron para determinar si el rendimiento de la producción de ARN bacteriano podría mejorarse mediante la elección de los medios.

10 El medio de inducción automática (AIM) contiene: 1 % de NZ-amina AS, 0,5 % de extracto de levadura, 0,5 % de glicerol, 0,05 % de glucosa, 0,2 % de alfa-lactosa, (NH₄)₂SO₄ 25mM, KH₂PO₄ 5mM, Na₂HPO₄ 20 mM, MgSO₄ 1mM.

Super Broth + el medio AIM contiene: 3,2 % de triptona, 2 % de extracto de levadura, 0,5 % de NaCl, 1 % de glicerol, 0,1 % de glucosa, 0,4 % de alfa-lactosa, (NH₄)₂SO₄ 50mM, KH₂PO₄ 10mM, Na₂HPO₄ 40 mM, MgSO₄ 2mM.

15 El plásmido + el medio AIM contiene: plásmido + el medio (Thomson Instrument Co.), (NH₄)₂SO₄ 25mM, KH₂PO₄ 5mM, Na₂HPO₄ 20 mM, MgSO₄ 1mM y 0,5 % de glicerol, 0,05 % de glucosa, 0,2 % de alfa-lactosa para la inducción automática.

Se prepararon cultivos de semillas de células DV49 de *E. coli* HT115 (DE3) de acuerdo con las condiciones de cultivo descritas en el Ejemplo 2. Los 3 medios de producción diferentes se inocularon con cantidades idénticas de cultivo de semilla y se incubaron de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Después de 16 horas de cultivo en matraz, las células se recogieron para la prueba de rendimiento.

20 Las células DV49 cultivadas en AIM produjeron 40 mg/l de ARN. Las células DV49 cultivadas en Super Broth + el medio produjeron 207 mg/l de ARN. Las células DV49 cultivadas en el plásmido + el medio AIM produjeron 96 mg/l de ARN. Sobre la base del rendimiento del ARN de DV49 bacteriano de 3 medios, Super broth + dio el mayor rendimiento del producto diana. Véase la Figura 7A.

25 El efecto de Super broth + el medio sobre la producción de ARNbc de CPB se probó como se describió anteriormente. Las células pCPB-hp + 2T de *E. coli* HT115 (DE3) cultivadas en Super Broth + el medio produjeron 66 mg/l de ARN. Véase la Figura 7B. El rendimiento en Super broth + el medio es una mejora sobre otros medios probados.

Ejemplo 6

Bioeficacia del ARNbc en el escarabajo de la patata de Colorado

30 Como se describió anteriormente, se produjeron tres muestras de ARNbc, pCPB-hp + 2T de *E. coli* HT115 (DE3) destruidas por calor no lisadas, ARNbc de CBP transcrito con bacterias purificado y ARNbc de CPB transcrito *in vitro*, para probar la bioeficacia de las preparaciones de ARNbc frente al escarabajo de la patata de Colorado (CPB), *Leptinotarsa decemlineata*.

35 Los bioensayos con las larvas de CPB se realizaron usando una dieta artificial de 13,2 g/l de agar (Serva 11393), 140,3 g/l de premezcla de Bio-Serve (F9380B), 5 ml/l de KOH (18,3 % p/p) y 1,25 ml/l de formalina (37 %). La dieta se dispensó en alícuotas de 200 ul en placas de 96 pocillos y se secó brevemente antes de la aplicación de la muestra. Veinte (20) ul de alícuotas de la muestra de prueba (pCPB-hp + 2T de *E. coli* HT115 (DE3) destruidas por calor y no lisadas), ARNbc de CPB transcrito con bacterias purificado, o ARNbc de CBP transcrito *in vitro* se aplicaron por pocillo, con agua estéril que sirve como control sin tratar (UTC). Las placas se dejaron secar antes de

añadir las larvas. Se añadió una larva de CPB neonato por pocillo con un pincel fino. Las placas se sellaron luego con mylar y se ventilaron usando un alfiler de insecto. Se probaron treinta y dos larvas (32) por tratamiento.

5 Las placas de bioensayo se incubaron a 27 °C, 60 % de humedad relativa (HR), en completa oscuridad durante 10-12 días. Las placas se punturaron luego para determinar la mortalidad (Tabla 2) y el retraso en el crecimiento larvario (Tabla 3). Los datos se analizaron usando el software estadístico JMP®4 (SAS Institute, 1995) y se realizó un ANOVA factorial completo con una prueba de Dunnett para buscar los efectos del tratamiento en comparación con el control no tratado (P <0,05). Se realizó una prueba post hoc de Tukey-Kramer para comparar todos los pares de los tratamientos (P <0,05).

10 Como se muestra en las Tablas 2 y 3, todas las preparaciones de ARNbc de CPB mostraron una actividad significativa contra el escarabajo de la patata de Colorado. Por ejemplo, el 87,5 % de los crecimientos de escarabajos se inhibieron a la concentración más baja de *E. coli* no lizada destruida por calor probada (0,00002 mg/ml).

TABLA 2: Bioensayo de mortalidad de ARNbc de CPB

| Tratamiento Sting | Conc. de ARNbc (mg/ml) | Media | Desv. estándar | EEM | P> t (Neg) | Agrupación de t | Contaminación |
|---|------------------------|-------------|----------------|-------------|--------------|-----------------|---------------|
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> {60 C; 30 min} | 0,00002 | 87,50 | 10,21 | 5,10 | *** | A | 0 |
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> {60 C; 30 min} | 0,0001 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | *** | A | 0 |
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> {60 C; 30 min} | 0,0005 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | *** | A | 0 |
| ARNbc bacteriano | 0,00002 | 62,50 | 10,21 | 5,10 | *** | B | 0 |
| ARNbc bacteriano | 0,0001 | 93,75 | 12,50 | 6,25 | *** | A | 0 |
| ARNbc bacteriano | 0,0005 | 100,00 | 0,00 | 0,00 | *** | A | 0 |
| ARNbc transcrito <i>in vitro</i> | 0,00002 | 43,75 | 21,65 | 10,83 | *** | C | 0 |
| ARNbc transcrito <i>in vitro</i> | 0,0001 | 93,30 | 7,77 | 3,88 | *** | A | 0 |
| ARNbc transcrito <i>in vitro</i> | 0,0005 | 96,88 | 6,25 | 3,13 | *** | A | 0 |
| dH2O | 0 | 6,25 | 7,22 | 3,61 | | D | 0 |
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> no inducida {60 C; 30 min} | 0 | 9,38 | 18,75 | 9,38 | | D | 0 |

TABLA 3: Bioensayo del retraso en el crecimiento del ARNbc de CPB

| Tratamiento Sting | Cono (mg/ml) | Media | Desv. estándar | EEM | P> t (Neg) | Agrupación de t | Contaminación |
|---|--------------|-------|----------------|------|-------------|-----------------|---------------|
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> {60 C; 30 min} | 0,00002 | 2,33 | 1,15 | 0,67 | *** | AB | 0 |
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> {60 C; 30 min} | 0,0001 | | | | | | 0 |
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> {60 C; 30 min} | 0,0005 | | | | | | 0 |
| ARNbc bacteriano | 0,00002 | 0,25 | 0,50 | 0,25 | | D | 0 |
| ARNbc bacteriano | 0,0001 | 1,00 | | | | CD | 0 |
| ARNbc bacteriano | 0,0005 | | | | | | 0 |

(continuación)

| Tratamiento Sting | Cono (mg/ml) | Media | Desv. estándar | EEM | P> t (Neg) | Agrupación de t | Contaminación |
|---|--------------|-------------|----------------|-------------|-------------|-----------------|---------------|
| ARNbc transcrito <i>in vitro</i> | 0,00002 | 1,75 | 0,50 | 0,25 | *** | BC | 0 |
| ARNbc transcrito <i>in vitro</i> | 0,0001 | 3,00 | 0,00 | 0,00 | *** | A | 0 |
| ARNbc transcrito <i>in vitro</i> | 0,0005 | 2,00 | | | *** | ABC | 0 |
| dH2O | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | D | 0 |
| Tratam. por calor de <i>E.coli</i> no inducida {60 C; 30 min} | 0 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | | D | 0 |

Ejemplo 7Bioeficacia del ARNbc de DV49

Se construyó un plásmido pUC estructurado con un promotor T7 que impulsa la expresión de DV49 antisentido + el bucle+ el terminador PTH de DV49 de sentido + el terminador pET-T7. Véase la Figura 8. La secuencia de nucleótidos de la construcción de expresión de DV49 se proporciona en la SEQ ID NO. 4.

```

TAATACGACTCACTATAGGGATCCATGATATCGTGAACATCATCTACATTCAAAT
TCTTATGAGCTTTCTTAAGGGCATCTGCAGCATTTCATAGAATCTAATACAGCA
GTATTTGTGCTAGCTCCTTCGAGGGCTTCCCTCTGCATTTCAATAGTTGTAAGGGT
TCCATCTATTTGTAGTTGGGTCTTTCCAATCGTTTCTTTTGGAGGGCTTGGAG
TGCAACTCTTTTATTTTTCGACGCATTTTCTTTGCaagtactcgcgatcgcgftaacgctttatcacgat
acctctaccacatatacactaacaacatcaacactcatcactctcgcagacatccactcgcgatcactactctcacagaccgattaactcct
catccacgcggccgcctgcaggagcGCAAAGAAAAATGCGTCGAAAAATAAAAGAGTTGCAC
TCCAAGCCCTCAAAAAGAAGAAACGATTGGAAGAACCAACTACAAATAGATG
GAACCCTTACAACATTGAAATGCAGAGGGAAGCCCTCGAAGGAGCTAGCACAA
ATACTGCTGTATTAGATTCTATGAAAAATGCTGCAGATGCCCTTAAGAAAGCTCA
TAAGAATTTGAATGTAGATGATGTTTACGATATCATGGATAgcttgccatctgtttcttcaag
atcagctgagcaataactagcataaaccttggggccttaaacgggtcttgaggggtttttgctgaaaggaggaactatatccgga

```

Los nucleótidos 1-17 codifican el promotor T7; los nucleótidos 21-260 codifican una secuencia antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia de nucleótidos diana de un gen del gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera*); los nucleótidos 261-410 codifican una región de formación de bucle; los nucleótidos 411-650 codifican una secuencia sentido que es sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos diana de un gen de un gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera*); los nucleótidos 659-668 codifican el terminador PTH; Los nucleótidos 681-764 codifican el terminador pET-T7.

Las células de *E. coli* HT115 (DE3) se transforman con dos plásmidos, uno que lleva la construcción de expresión del ARNbc de DV49 y el otro que lleva la ARN polimerasa T7 bajo el control de un elemento inducible (polimerasa T7 inducible por IPTG). Las células se cultivan a una densidad celular deseada y se determina el rendimiento del ARNbc. Las células que expresan el ARNbc de DV49 se calientan a una temperatura de al menos 59 °C durante 30 minutos para destruir las células. Las células que expresan el ARNbc de DV49 se titulan para proporcionar composiciones que tienen concentraciones crecientes de ARNbc, por ejemplo, 0,00002, 0,001 y 0,005 mg/ml, y las composiciones que contienen las células de expresión de ARNbc de DV49 destruidas por calor o células de control de *E. coli* HT115 (DE3) destruidas por calor se proporcionan en la dieta de larvas del gusano de la raíz de maíz. Se evalúa la mortalidad y la morbilidad de las larvas y se determina la masa de las larvas supervivientes. La muerte, el retraso en el crecimiento u otra inhibición de las larvas del gusano de la raíz del maíz después de la ingestión de células de expresión de ARNbc DV49 destruidas por calor en comparación con las células de control indican que la ingesta de células de expresión de ARNbc de DV49 destruidas por calor es efectiva para controlar las infestaciones de gusanos de la raíz del maíz.

Ejemplo 8Bioeficacia de las bacterias lisadas frente a las no lisadas

Se prepara un cultivo de pCPB-hp + 2T de *E. coli* HT115 (DE3) y las células se destruyen por calor como se describe en el Ejemplo 4. Una alícuota de las células pCPB-hp + 2T de *E. coli* HT115 (DE3) destruidas por calor se lisan luego por medios químicos, enzimáticos, de congelación y descongelación o mecánicos para producir un lisado celular. Luego se purifica parcialmente una alícuota del lisado celular mediante centrifugación para eliminar los residuos celulares. Tres muestras, las células pCPB-hp + 2T de *E. coli* HT115 (DE3) destruidas por calor no lisadas, el lisado celular no purificado y el lisado celular parcialmente purificado se prueban luego para determinar la bioeficacia frente al escarabajo de la patata de Colorado (CPB), *Leptinotarsa decemlineata* como se describe en el Ejemplo 6 anterior. Las alícuotas de las tres muestras se someten adicionalmente a diferentes preparaciones, como liofilización o congelación, y temperaturas, como la temperatura ambiente, 4 °C y 0 °C, para aumentar el tiempo y la bioeficacia de las muestras sometidas a las diversas preparaciones, y las condiciones de almacenamiento se determinan realizando bioensayos como se describe en el Ejemplo 6 anterior. Se comparan la bioeficacia de las diferentes preparaciones de muestra y se selecciona una preparación que muestra un alto grado de bioeficacia y estabilidad.

Ejemplo 9Optimización del rendimiento de ARNbc- número y combinación de terminadores

Se construye un vector plasmídico para la producción eficiente de ARNbc insertando en una posición 3' de una secuencia de codificación de ARNbc, 2, 3, 4, 5 o 6 secuencias de terminación transcripcional que se seleccionan cada una, independientemente, de entre un grupo que consiste en: terminador PTH, terminador pET-T7, terminador T3-Tφ, terminador pBR322-P4, terminador del virus vesicular del estoma, terminador rrnB-TI, terminador rrnC, terminador TTadc transcripcional tal que las secuencias terminadoras transcripcionales formen una combinación funcional con el promotor.

Las células huésped se transforman con los vectores obtenidos por ingeniería y se induce la transcripción de la secuencia de codificación de ARNbc del promotor. Se determina la eficiencia de terminación de cada número y combinación de las secuencias de terminación transcripcionales. Se selecciona un número mínimo y una combinación de secuencias de terminación que muestran la mayor eficiencia de terminación, ya que una alta eficiencia de terminación minimiza la translectura no productiva de la secuencia del vector y mejora el rendimiento del ARNbc en comparación con la baja eficiencia de terminación.

Ejemplo 10Optimización del rendimiento de ARNbc-tamaño del plásmido

Se construye un vector plasmídico para la producción eficiente de ARNbc insertando una construcción de expresión de ARNbc obtenida por ingeniería, que comprende un promotor, un elemento de codificación de ARNbc y dos o más secuencias de terminación, en un vector de plásmido mínimo que no contiene un marcador seleccionable basado en proteínas y/o secuencias espaciadoras no esenciales. Cuando el tamaño esperado del vector que contiene la construcción de expresión de ARNbc obtenida por ingeniería disminuye a un tamaño mínimo para la replicación eficaz del plásmido, se insertan en el vector una o más construcciones de expresión de ARNbc obtenidas por ingeniería adicionales o elementos de codificación de ARNbc en el vector para conseguir un tamaño mínimo para la replicación eficaz del vector de expresión resultante. Las células huésped se transforman con el vector de expresión ARNbc. Si es necesario, un vector que codifica una ARN polimerasa que impulsa la transcripción del ARNbc desde el vector de expresión ARNbc se cotransforma. La estructura mínima del vector proporciona un molde reducido para la translectura no productiva de la secuencia no codificante de ARNbc, mejorando el rendimiento del ARNbc en comparación con un plásmido con un mayor porcentaje de estructura del vector.

Ejemplo 11Optimización del rendimiento de ARNbc-molde linealizado

Se construye un vector plasmídico para la producción eficiente de ARNbc insertando un sitio de restricción para una endonucleasa que no corta el genoma de la célula huésped (por ejemplo, I-Sce1, que no tiene ningún sitio en el genoma de *E. coli*, un sitio de restricción ZFN, o un sitio de restricción TALEN) en una posición que es 3' a una secuencia de codificación de ARNbc que está unida de forma operacional a un promotor. Véase, por ejemplo, la Figura 9. Las células huésped se cotransforman con el vector de producción de endonucleasa + ARNbc y un vector que codifica una endonucleasa que reconoce el sitio de restricción. En algunos casos, la expresión de la endonucleasa es inducible y la endonucleasa puede codificarse en un vector que codifica además una ARN polimerasa que impulsa la producción de ARNbc. La expresión de la endonucleasa linealiza el vector de producción de ARNbc, eliminando así la translectura no productiva de la secuencia del vector y mejorando el rendimiento de ARNbc en comparación con un plásmido no linealizado.

Ejemplo 12

Optimización del rendimiento de ARN-comparación de combinaciones de terminador

Se realizó una comparación del rendimiento de producción de ARN con diferentes terminadores clonados en el mismo plásmido de expresión.

5 1. Diseño del vector de producción de ARN

10 Se construyeron nueve vectores plasmídicos con diferentes terminadores o combinaciones de terminadores usando el vector de clonación pUC19, que contiene un gen de resistencia a la ampicilina, un fragmento N-terminal del gen lac Z de *E. coli*, un sitio de clonación múltiple y un origen de replicación. Las secuencias del terminador como se muestra en la Tabla 4 a continuación se clonaron en el vector pUC19 corriente abajo del promotor T7 para producir 9 vectores diferentes que tienen diferentes terminadores o combinaciones de terminadores. Se insertó una secuencia de ADN (SEQ ID NO 2) que codifica la CPB-hp en el vector corriente abajo del promotor T7 y corriente arriba de la secuencia del terminador.

Tabla 4: Secuencias de los terminadores usados en los vectores de producción de ARN

| SEQ ID NO. | Terminador | Secuencia |
|------------|------------|--|
| 5 | PET | CTAGCATAACCCCTTGGGGCCCTAAACGGGCTTGAGGGGTTTTTG |
| 6 | PTH1 | CATCTGTTT |
| 7 | PTH2 | CTCATGCTTGCCATCTGTTTTTCTTGCAAGTCAGATGGGA |
| 8 | rm BT1 | GGCATCAAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTCGTTTTAT CTGTTGTTTGTCG |
| 9 | rm BT2 | TTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTAC |
| 10 | CJ | CTGTSTCCCTATCTGTTACAGTCTCCTAAAGTAT |
| 11 | B1002 | CCCCGCTTCGGCGGGTTTTTT |
| 12 | B1006 | CCCCGCCCTGACAGGGCGGGTTTTTTTT |
| 13 | PTH + PET | CATCTGTTTTCTTGCAAGATCAGCTAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGG GCCTCTAAACGGGCTTTCGAGGGTTTTTCTGCTGAAAGGAGGAACATAATCCG GA |

2. Condición de cultivo

Los vectores plasmídicos se transformaron en células de *E. coli* HT115 (DE3). Se seleccionaron colonias individuales para cada vector plasmídico y se cultivaron 6-8 horas a 37 °C en medio LB de 3 ml que contenía 100 ug/ml de ampicilina y 12,5 ug/ml de tetraciclina para producir un cultivo de semillas. Para inducir la expresión de ARNbc, se inocularon 200 ul del cultivo de semilla en un matraz de 250 ml con medio de inducción automático de 50 ml (AIM) (Studier, Protein Expression y Purification 41 (2005) 207-234) que contenía 100 ug/ml de ampicilina y 12,5 ug/ml de tetraciclina y luego se incubó. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 g durante 10 minutos a 4 °C.

3. Purificación y medición de ARN.

El ARN total se purificó a partir de las células bacterianas de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 2 y se ejecutó en un gel de agarosa para medir la cantidad de ARN producido. Como se muestra en la Figura 10, se observaron altos niveles de producción de ARN a partir del vector de producción de ARN que contiene 2 terminadores en tándem (PTH y PET). La mayoría de los vectores de producción de ARN que contienen terminadores únicos no produjeron niveles detectables de ARN. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el hecho de que un solo terminador no detenga la transcripción de T7 puede dar como resultado una producción de ARN deficiente. Los vectores de producción de ARN que contienen terminadores únicos de PET o rrn BT2 produjeron cantidades detectables de ARN, sin embargo, los rendimientos de los vectores de producción de PET y rrn BT2 fueron relativamente bajos en comparación con el vector de producción de ARN que contiene 2 terminadores (16 % y 40 %, respectivamente). Véase la Figura 10.

4. Comparación estructural

Las estructuras secundarias formadas por los terminadores se analizaron usando CLC Main Workbench (versión 6.8.4). También se determinó la energía libre de las estructuras secundarias. Véase la Tabla 5. Como se muestra en la Figura 11, los terminadores que proporcionaron los mayores rendimientos de producción de ARN (PET, rrn BT2 y PTH; PET) tienen estructuras secundarias similares, que es una estructura de horquilla con un tallo de aproximadamente 10 a 20 pares de bases. Los terminadores asociados con poca o ninguna producción de ARN detectable a partir de los vectores de producción de ARN tenían horquillas demasiado cortas o demasiado largas para detener la transcripción. Se encontró que la construcción de 2 terminadores PTH; PET, que proporcionó el mayor rendimiento en comparación con otras construcciones de terminador único, tenía horquillas adyacentes de tamaño pequeño y mediano. Véase la Figura 11.

Tabla 5: Energía libre de estructuras secundarias

| Terminador | Energía libre de la estructura secundaria |
|------------|---|
| PET | $\Delta G = -24,0\text{kcal/mol}$ |
| PTH | $\Delta G = -9,5\text{kcal/mol}$ |
| rrn BT1 | $\Delta G = -39,3\text{kcal/mol}$ |
| rrn BT2 | $\Delta G = -23,2\text{kcal/mol}$ |
| CJ | $\Delta G = -2,5\text{kcal/mol}$ |
| B1002 | $\Delta G = -15,5\text{kcal/mol}$ |
| B1006 | $\Delta G = -18,5\text{kcal/mol}$ |
| PTH + PET | $\Delta G = -38,6\text{kcal/mol}$ |

Ejemplo 13

Evaluación del efecto de la estructura secundaria sobre el rendimiento de ARN

Se realizó una comparación del rendimiento de producción de ARN con diferentes secuencias de codificación de horquilla clonadas en el mismo vector de producción de ARN.

Secuencias de ADN que codifican un ARN en forma de horquilla de 27ámeros (tallo de 27 pb más un bucle de 8 pb) (SEQ ID NO. 14), de 240 ámeros (tallo de 240 pb con un bucle de 150 pb) (SEQ ID NO. 15) o de 280 ámeros (tallo de 280 pb con un bucle de 150 pb) (SEQ ID NO. 2) se insertaron corriente arriba del terminador de PET + PTH y corriente abajo del promotor T7 en el vector de pUC19-PTH + PET. Las estructuras secundarias formadas por las horquillas de ARN y los terminadores se determinaron usando CLC Main Workbench (versión 6.8.4). Véase la Figura 12. Como se puede ver en la Figura 12A, la horquilla de ARN de 27ámeros muestra una estructura secundaria

similar a la formada por el terminador de PET + PTH (en círculo). Las horquillas de 240 ámeros y 280 ámeros no muestran una estructura secundaria similar a la de un terminador. Véase las Figuras 12B y 12C.

Las construcciones de expresión de la horquilla de ARN de 27 ámeros/el terminador de PTH + PET; la horquilla de ARN de 240 ámeros/el terminador de PTH + PET; y la horquilla de ARN de 280 ámeros/el terminador PTH + PET se transformaron en células de *E. coli* HT115 (DE3) y se indujo la producción de ARN como se describe en el Ejemplo 2. Como se puede ver en la Figura 13, el rendimiento de ARN_{bc} fue notablemente mayor en las construcciones de la horquilla de ARN de 27ámeros/terminador PTH + PET en comparación con las construcciones de horquilla de ARN más largas. Este resultado sugiere que la presencia de una estructura de horquilla de tamaño mediano adicional en la construcción de la horquilla de 27 ámeros/el terminador PTH + PET puede ayudar en la terminación de la transcripción de T7, que da como resultado un mayor rendimiento de producción de ARN.

Ejemplo 14

Efecto del número de terminadores y la estructura secundaria sobre el rendimiento de ARN

Se realizó una comparación del rendimiento de producción de ARN con múltiples terminadores diferentes clonados en el mismo vector de producción de ARN.

Como se describe en el Ejemplo 12, anteriormente, se observó una expresión de ARN mejorada a partir de un vector de producción de ARN que contenía la combinación de dos terminadores PTH + PET. Se clonaron secuencias de terminadores adicionales en el vector pUC19-PTH + PET para determinar si el rendimiento de ARN mejora con números crecientes de secuencias terminadoras. Dado que se observó que las secuencias de los terminadores PET y rrm BT2 producen los mayores rendimientos de ARN para los vectores de producción de ARN de terminador único, estas secuencias se eligieron para clonación en el vector de pUC19-PTH + PET. Se fabricaron tres vectores de producción de ARN adicionales: pUC19-rrn BT2 + PET + PTH + PET; pUC19-PET + rrm BT2 + PTH + PET; y pUC19-rrnBT2 + PTH + PET. Los plásmidos se secuenciaron, se confirmaron y se transformaron en células HT115 (DE3). Las células se cultivaron y el ARN total se aisló como se describe en el Ejemplo 12. El ARN total se ejecutó en un gel de agarosa para medir la cantidad de ARN producido. Véase la Figura 14.

El ARN total producido a partir del vector pUC19-PTH + PET (Figura 14, línea 1) se usó como el rendimiento de ARN de valor inicial (100 %) y los rendimientos de ARN totales a partir de los vectores de expresión pUC19-rrn BT2 + PET + PTH + PET; pUC19-PET + rrm BT2 + PTH + PET; y pUC19-rrn BT2 + PTH + PET se compararon con el valor inicial. Sorprendentemente, un aumento en el rendimiento de ARN no se correlacionó estrictamente con el número de terminadores, ya que el vector de expresión de 3 terminadores, pUC19-rrn BT2 + PTH + PET, produjo el 52 % y el vector de expresión de 4 terminadores, pUC19-PET + rrm BT2 + PTH + PET, produjo el 40 % del ARN total producido por el valor inicial de 2 terminadores. Véase la Figura 14 y la Tabla 6. Sin embargo, el rendimiento de ARN total del vector de expresión de 4 terminadores, pUC19-rrn BT2 + PET + PTH + PET) fue un 35 % mayor que el del valor inicial de 2 terminadores. Véase la Figura 14 y la Tabla 6.

Las estructuras secundarias formadas por los terminadores se determinaron usando CLC Main Workbench (versión 6.8.4). Véase la Figura 15. Como se puede ver en la Figura 15A, los 2 terminadores del vector de producción de ARN de valor inicial pUC19-PTH + PET tienen una estructura secundaria con 2 horquillas adyacentes de tamaño mediano (en círculo). El vector de expresión de 4 terminadores, pUC19-rrn BT2 + PET + PTH + PET), que produjo el más alto rendimiento de ARN, muestra una estructura secundaria con 3 horquillas adyacentes de tamaño mediano. Véase la Figura 15B. Como se muestra en la Figura 15C y la Figura 15D, los vectores de las producciones de ARN con los rendimientos de ARN totales más bajos muestran estructuras secundarias sin horquillas de tamaño mediano adyacentes.

Tabla 6: Terminadores múltiples

| Número de terminadores | Terminadores | SEQ ID NO: | Rendimiento de ARN relativo (comparado con la construcción de expresión de PTH + PET) |
|------------------------|---------------------------|------------|---|
| 2 | PTH + PET | 16 | Valor inicial (100 %) |
| 4 | PET + rrm BT2 + PTH + PET | 17 | 40 % |
| 4 | rrn BT2 + PET + PTH + PET | 18 | 135 % |
| 3 | rrn BT2 + PTH + PET | 19 | 52 % |

Ejemplo 15

Los terminadores adyacentes rrm BT2+PET+PTH+PET proporcionan un mayor rendimiento de ARN

Se realizó una comparación del rendimiento de producción de ARN para las construcciones de los terminadores PET PTH + y PET + rrn BT + PTH + PET para un gen adicional.

5 Se insertó una secuencia de ADN (SEQ ID NO. 20) que codificaba una horquilla de 397 ámeros procedente de un escarabajo de la patata de Colorado corriente arriba de los terminadores y corriente abajo del promotor T7 en los vectores pUC19-PTH + PET y pUC19-rrn BT2 + PET + PTH + PET. Las secuencias de plásmidos se confirmaron mediante secuenciación y se transformaron en células HT115 (DE3).

10 El cultivo celular y la extracción de ARN total se realizaron como se describe en el Ejemplo 12. Después de 18 horas de cultivo, la cepa con un vector de expresión que contenía los terminadores de PET + PTH alcanzó una DO₆₀₀ de 5,78 y produjo un rendimiento de ARN de 44 mg/l, mientras que la cepa con el vector de expresión que contenía los terminadores rrn BT2+PET+PTH+PET alcanzó una DO₆₀₀ de 5,55 y produjo un rendimiento de ARN de 132 mg/l. Este resultado sugiere que la presencia de una estructura de horquilla de tamaño mediano adicional en la construcción de los terminadores rrn BT2+PET+PTH+PET puede ayudar en la terminación de la transcripción de T7, que da como resultado un mayor rendimiento de producción de ARN.

Ejemplo 16

15 Los terminadores adyacentes rrn BT2+PET+PTH+PET proporcionan un mayor rendimiento de proteínas

20 Se clonó una secuencia de ADN que codifica la proteína A (MW 21k) en el vector del terminador pUC19-PET, el terminador pUC19-rrn BT2, los terminadores pUC19-PTH + PET y los terminadores pUC19-rrn BT2 + PET + PTH + PET. Los plásmidos se secuenciaron, se confirmaron y se transformaron en células BL21 (DE3). Las células que contenían los plásmidos de expresión se seleccionaron y luego se cultivaron en medio LB con carbenicilina. Se añadió IPTG 1mM a cada cultivo cuando la DO₆₀₀ alcanzó 0,5. Las células se recogieron después de 4 horas de inducción. La proteína total se aisló de las células hirviendo las células durante 5 minutos en tampón de carga SDS-PAGE 2X. Se cargaron 5 ul de cada muestra en un gel SDS-PAGE. Como se muestra en la Figura 16, las células que contienen los plásmidos de expresión pUC19-PTH + PET y pUC19-rrn BT2 + PET + PTH + PET produjeron los mayores rendimientos de la proteína diana.

25 Ejemplo 17

Diseño de terminadores sintéticos para una mayor expresión de ARN y proteínas

30 La secuencia de terminación rrn BT2 + PET + PTH + PET (SEQ ID NO.18) se modificó para eliminar la secuencia que no forma la horquilla y los desapareamientos de pares de bases dentro de las regiones de formación de la horquilla, la secuencia sintética resultante, SEQ ID NO.21, fue predicha por CLC Main Workbench (versión 6.8.4) para formar una estructura secundaria con 3 horquillas adyacentes de tamaño mediano que no tienen desapareamientos en las regiones de formación de la horquilla. Véase la Figura 17B. Un polinucleótido de ADN que comprende la SEQ ID NO.21 fue sintetizado. Un polinucleótido de ADN que comprende la SEQ ID NO.21 se clona en el vector pUC19 corriente abajo del promotor T7.

35 Se identificaron cuatro supuestas secuencias terminadoras diferentes a partir de E. coli y se dispusieron en tándem, dando como resultado una secuencia sintética, SEQ ID NO. 22. La SEQ ID NO. 22 fue predicha por CLC Main Workbench (versión 6.8.4) para formar una estructura secundaria con 4 horquillas adyacentes de tamaño mediano, con algunos desapareamientos "(burbujas)" dentro de las regiones de formación de la horquilla. Véase la Figura 17C. Un polinucleótido de ADN que comprende la SEQ ID NO. 22 se sintetizó y se clonó en el vector pUC19 corriente abajo del promotor T7.

40 La SEQ ID NO. 22 se modificó para eliminar los desapareamientos de la secuencia que no forma la horquilla y del par de bases dentro de las regiones de formación de la horquilla, la secuencia sintética resultante, SEQ ID NO. 23, fue predicha por CLC Main Workbench (versión 6.8.4) para formar una estructura secundaria con 4 horquillas adyacentes de tamaño mediano que no tienen desapareamientos en las regiones de formación de la horquilla. Se hizo un intento de sintetizar químicamente un polinucleótido de ADN que comprende la SEQ ID NO. 23, sin embargo, no se obtuvo ningún producto. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la estructura secundaria de SEQ ID NO. 23 pueden haber interferido con la síntesis.

Tabla 7: Terminadores sintéticos

| SEQ ID NO. | Secuencia | Energía libre de la estructura secundaria |
|------------|--|---|
| 18 | AAGCTTGCTTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGG CCTTTTTGCGTTTCTACCTAGCATAACCCCTTGGGGC CTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGGCCATCTGT TTTCTTGCAAGATCAGCTGAGCAATAACTAGCATAA CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTT TGCTGAAAGGAGGA ACTATATCCGGA | $\Delta G = -91,1\text{kcal/mol}$ |
| 21 | AAGCTTTAACCCCTCAGGACCCCTAAACGGGTCTTG AGGGGTTTCTCAGCTGATCTTGTTTTCTTGCAAGATC AGCTGAGCAATAACTAGCACAACCCCTCAGGACCTC TAAACGGGTCTTGAGGGGTTGTGCTGAAAG | $\Delta G = -94,7\text{kcal/mol}$ |
| 22 | GGAAACGACAGGTGCTGAAAGCGAGCTTTTTGGCCT CTGTCGTTTCCCATTACGCCACGGTACATAAAGTAA CCGTGGCGTAATGCCTGAAAAAACGGCCTGACGTG AATCAAGCAATTTTTTTCAGGGCGCACTAAAAGGGC ATCATTGATGCCCTTTTTGCACGC | $\Delta G = -87,3\text{kcal/mol}$ |
| 23 | GGCACCGACAGGGGCCAGAAGCGAGCTTTCTGGCCT CTGTCCGGTGCCCGCCACGCCACGGTACATAAAGTAC CGTGGCGTGGCGCCTGGCGCGCCGGCTTGACGTGAA TCAAGCCGGCGCGCCAGGGCGCACTCGCGCGGGCAT CATTTGATGCCCGCGCGAGTGCACGC | $\Delta G = -157,7\text{kcal/mol}$ |

Ejemplo 18

Optimización del rendimiento de ARN-terminadores sintéticos

5 Las células huésped se transforman con vectores obtenidos por ingeniería que comprenden una secuencia de terminadores obtenida por ingeniería como se describe en las SEQ ID NO.21, 22 o 23 en combinación funcional con un promotor que está unido de forma operacional a la secuencia que codifica un ARN de interés. Se induce la transcripción de la secuencia de codificación de ARN del promotor. Se determina la eficiencia de terminación de cada secuencia de terminadores obtenidos por ingeniería. Se selecciona la secuencia de terminación obtenida por ingeniería que muestra la mayor eficiencia de terminación. El rendimiento de producción de ARN aumenta a medida que aumenta el número de horquillas de tamaño mediano formadas por la secuencia de terminadores obtenida por ingeniería a medida que las horquillas de tamaño mediano adyacentes disminuyen o detienen la transcripción, minimizando la translectura no productiva de la secuencia del vector y mejorando el rendimiento del ARN.

Ejemplo 19

15 Los vectores plasmídicos para la producción de ARN se construyen insertando en una posición 3' de una secuencia de codificación de ARN, una secuencia de terminación PET, y de PTH + PET o BT2 + PET + PTH + PET de manera que la secuencia del terminador transcripcional forma una combinación funcional con un promotor que se selecciona

ES 2 691 803 T3

de entre un grupo que consiste en: T3, SV40, SP6, T5, promotor de β -lactamasa, promotor de galactosa de *E. coli*, promotor de arabinosa, promotor de fosfatasa alcalina, promotor de triptófano (trp), promotor de operon lactosa (lac), promotor lacUV5, promotor trc y promotor tac.

5 Las células huésped se transforman con los vectores obtenidos por ingeniería y se induce la transcripción de la secuencia de codificación de ARN del promotor. Se determina la eficiencia de terminación de cada número y combinación de las secuencias de terminación transcripcionales. El rendimiento de la producción de ARN aumenta en los vectores de terminación PTH + PET en comparación con los vectores de terminación PET y el rendimiento de la producción de ARN aumenta en los vectores de terminación rrn BT2 + PET + PTH + PET en comparación con los
 10 vectores de terminación PTH + PET (dos terminadores) y PET (terminador único) a medida que aumenta el número de horquillas de tamaño mediano formadas por la secuencia del terminador obtenido por ingeniería, a medida que los terminadores PTH + PET y rrn BT2 + PET + PTH + PET tienen horquillas adyacentes de tamaño mediano que disminuyen o detienen la transcripción, minimizando la transcripción no productiva de la secuencia del vector y mejorando el rendimiento del ARN.

15 <110> Baum, James A.
 Christian, Allen T
 Evdokimov, Artem
 Moshiri, Farhad
 Weaver, Lisa M.
 Zhang, Haitao

20 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA LA PRODUCCIÓN Y ENTREGA DE ARN BICATENARIO

<130> P34118WO00

<140> 61/793.506

<141> 15/03/2013

25 <160> 23

<210> 1

<211> 379

<212> ADN

<213> Leptinotarsa decemlineata

30 <400> 1

```

cgtaaccgcg gtttgtttcc accctgaact acctgtggct ctcacaggca gcgaagatgg 60
taccgttaga gtttggcata cgaatacaca cagattagag aattgtttga attatggggtt 120
cgagagagtg tggaccattt gttgcttgaa gggttogaat aatgtttctc tgggggatga 180
cgagggcagt atattagtga aagttggaag agaagaaccg gcagttagta tggatgccag 240
tggcggtaaa ataatttggg caaggcactc ggaattacaa caagctaatt tgaaggcgct 300
gccagaaggt ggagaaataa gagatgggga gcgtttacct gtctctgtaa aagatatggg 360
agcatgtgaa atataccct 379
  
```

<210> 2

<211> 713

<212> ADN

35 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 2

ES 2 691 803 T3

gggtacctgt ggctctcaca ggcagcgaag atggtacctg tagagtttgg catacgaata 60
cacacagatt agagaattgt ttgaattatg ggttcgagag agtgtggacc atttgttgc 120
tgaagggttc gaataatggt tctctggggt atgacgaggg cagtatatta gtgaaagttg 180
gaagagaaga accggcagtt agtatggatg ccagtggcgg taaaataatt tgggcaaggc 240
actcgggaatt acaacaagct aatttgaagg cgctgccaga aggaagtact gcgatcgcgt 300
taacgcttta tcacgatacc ttctaccaca tatcactaac aacatcaaca ctcatcactc 360
tcgacgacat ccaactcgatc actactctca cagaccgat taactcctca tccacgcggc 420
cgctgcagg agcccttctg gcagcgcctt caaattagct tgttgaatt ccgagtgcct 480
tgcccaaatt atttaccgc cactggcctc catactaact gccggttctt ctcttccaac 540
tttactaat atactgccct cgtcataccc cagagaaaca ttattcgaac ctttcaagca 600
acaaatggtc cacactctct cgaaccata attcaacaa ttctctaact tgtgtgtatt 660
cgtatgcaa actctaacgg taccatctc gctgcctgtg agagccacag gta 713

5 <210> 3
<211> 844
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 3

taatacagact cactataggg tacctgtggc tctcacaggc agcgaagatg gtaccgtag 60
agtttggcat acgaatacac acagattaga gaattgtttg aattatgggt tcgagagagt 120
gtggaccatt tgttgcttga agggttcga taatgtttct ctggggtatg acgagggcag 180
tatattagtg aaagttggaa gagaagaacc ggcagttagt atggatgcca gtggcggtaa 240
aataatttgg gcaaggcact cggaattaca acaagctaatt ttgaaggcgc tgccagaagg 300
aagtactgcg atcgcgtaa cgctttatca cgataccttc taccacatat cactaacaac 360
atcaacactc atcaactctg acgacatcca ctgatcact actctcacac gaccgattaa 420
ctcctcatcc acgoggccgc ctgcaggagc ccttctggca ggccttcaa attagcttgt 480
tgtaattcgc agtgccttgc ccaaattatt ttaccgccac tggcatccat actaactgcc 540
ggttcttctc ttccaacttt cactaatata ctgccctcgt catacccag agaaacatta 600
ttcgaaccct tcaagcaaca aatggtccac actctctcga acccataatt caaacaattc 660
tctaactctg gtgtattcgt atgccaaact ctaacggtag catcttcgct gcctgtgaga 720
gccacaggta aagcttgcca tctgttttct tgcaagatca gctgagcaat aactagcata 780
acccttggg gcctctaac ggtcttgag gggtttttg ctgaaaggag gaactatct 840
cgga 844

10 <210> 4
<211> 764
<212> ADN
<213> secuencia artificial

ES 2 691 803 T3

<220>
<223> sintética

<400> 4

```

taatacgact cactataggg atccatgata tcgtgaacat catctacatt caaattctta 60
tgagctttct taagggcatc tgcagcattt ttcatagaat ctaatacagc agtatttgtg 120
ctagctcctt cgagggcttc cctctgcatt tcaatagttg taagggttcc atctatttgt 180
agttgggtct tttccaatcg tttcttcttt ttgagggott ggagtgcaac tcttttattt 240
ttcgacgcat ttttctttgc aagtactgcg atcgcgttaa cgctttatca cgataccttc 300
taccacatat cactaacaac atcaacactc atcactctcg acgacatcca ctcgatcact 360
actctcacac gaccgattaa ctctcatcc acgcgggcgc ctgcaggagc gcaaagaaaa 420
atgcgtcgaa aaataaaga gttgcactcc aagccctcaa aaagaagaaa cgattggaaa 480
agaccaact acaaatagat ggaaccctta caactattga aatgcagagg gaagccctcg 540
aaggagctag cacaaatact gctgtattag attotatgaa aaatgctgca gatgccctta 600
agaaagctca taagaatttg aatgtagatg atgttcacga tatcatggat aagcttgcca 660
tctgttttct tgcaagatca gctgagcaat aactagcata accccttggg gcctctaaac 720
gggtcttgag gggttttttg ctgaaaggag gaactatata cgga 764

```

5 <210> 5
<211> 48
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> sintética

<400> 5
ctagcataac ccctggggc ctctaaacgg gtcttgagg gtttttg 48

15 <210> 6
<211> 10
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sintética

20 <400> 6
catctgttt 10

<210> 7
<211> 39
<212> ADN
<213> secuencia artificial

25 <220>
<223> sintética

<400> 7
ctcatgctg ccatctgttt tcttgcaagt cagatggga 39

<210> 8

ES 2 691 803 T3

<211> 65
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 5 <223> sintética

 <400> 8

 ggcatcaaat aaaacgaaag gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttggt 60

 tgtcg 65

 <210> 9
 <211> 45
 10 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 <400> 9
 15 ttaagcagaa ggccatcctg acggatggcc ttttgcgtt tctac 45

 <210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 20 <220>
 <223> sintética

 <400> 10
 ctgtgtccct atctgttaca gtctcctaaa gtat 34

 <210> 11
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 <400> 11
 30 ccccgcttcg gcggggtttt tt 22

 <210> 12
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética

 <400> 12
 ccccgcccct gacagggcgg ggttttttt t 31

 <210> 13
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 45 <223> sintética

 <400> 13

ES 2 691 803 T3

catctgtttt cttgcaagat cagctgagca ataactagca taacccttg ggcctctaa 60
acgggtcttg aggggttttt tgctgaaag aggaactata tccgga 106

5 <210> 14
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 <400> 14

ggggtcatag caacatctgg cattttgttc tcttgagga acaaatgcc agatgttgct 60
atgac 65

10 <210> 15
 <211> 633
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 15 <220>
 <223> sintética
 <400> 15

gggatccatg atatcgtgaa catcatctac attcaaattc ttatgagctt tcttaagggc 60
atctgcagca tttttcatag aatctaatac agcagtattt gtgctagctc cttcgagggc 120
ttcctctgc atttcaatag ttgtaagggc tccatctatt tgtagttggg tcttttccaa 180
tcgtttcttc tttttgaggg cttggagtgc aactctttta tttttcgacg catttttctt 240
tgcaagtact gcgatcgcgt taacgcttta tcacgatacc ttctaccaca tatcactaac 300
aacatcaaca ctcatcactc togacgacat ccaactcgatc actactctca cacgaccgat 360
taactcctca tccacgcggc cgctgcagg agcgcaaaga aaaatgcgtc gaaaaataaa 420
agagttgcac tccaagccct caaaaagaag aaacgattgg aaaagaccca actacaaata 480
gatggaacc ttacaactat tgaaatgcag agggaagccc tcgaaggagc tagcaciaaat 540
actgctgtat tagattctat gaaaaatgct gcagatgccc ttaagaaagc tcataagaat 600
ttgaatgtag atgatgttca cgatatcatg gat 633

20 <210> 16
 <211> 106
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 25 <400> 16

ES 2 691 803 T3

catctgtttt cttgcaagat cagctgagca ataactagca taaccocttg gggcctctaa 60

acgggtcttg aggggttttt tgctgaaagg aggaactata tccgga 106

5 <210> 17
<211> 209
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 17

aagcttgctt agcataacct cttggggcct ctaaaccgggt cttgaggggt tttttgtaa 60

gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt tgcgtttcta cgccatctgt tttcttgcaa 120

gatcagctga gcaataacta gcataacctt ttggggcctc taaacggggtc ttgagggggtt 180

ttttgctgaa aggaggaact atatccgga 209

10 <210> 18
<211> 209
<212> ADN
<213> secuencia artificial

15 <220>
<223> sintética

<400> 18

aagcttgctt aagcagaagg ccatcctgac ggatggcctt tttgctttc tacctagcat 60

aacccttggt ggcctctaaa cgggtcttga ggggtttttt ggccatctgt tttcttgcaa 120

gatcagctga gcaataacta gcataacctt ttggggcctc taaacggggtc ttgagggggtt 180

ttttgctgaa aggaggaact atatccgga 209

20 <210> 19
<211> 161
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> sintética

<400> 19

aagcttgctt aagcagaagg ccatcctgac ggatggcctt tttgctttc tacgccatct 60

gttttcttgc aagatcagct gagcaataac tagcataacc ccttggggcc tctaaacggg 120

tcttgagggg tttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg a 161

25 <210> 20
<211> 944
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>

ES 2 691 803 T3

<223> sintética

<400> 20

```

gatgatgtcg gactttccta atttgtcttc gatgatttga ttgctagtga ttggcaccct    60
ttggccggttc accttggcga aacctctctt ataaatcagt tctctgacag atttcaagtt    120
agggtatccc caagtgatgt aaggttcgca tattctgagc atggtgatgg tagctttggt    180
gagcttgaca aagacaccat tgttgatttg aaggagccgg aacaattgga gaaccttgcg    240
tacttttagga gctactttgt tgataccctt tatacgaatt acgaatgcca acttggtctc    300
agcgggaacg taaaagtttc ctctggtttt agcttgtcgg atcaacctaa cttcatctct    360
ttctttgagc cggatttctt taacatactg ttcggccaag tactgcgatc gcgttaacgc    420
tttatcacga taccttctac cacatatcac taacaacatc aacactcatc atctagactc    480
tcgacgacat ccaactcgatc actactctca cagaccgat taactcctca tccacgcggc    540
cgcgagcggc cgaacagtat gttaaagaat accggctcaa agaaagagat gaagttaggt    600
tgatccgaca agctaaaacc agaggaaact tttacgttcc cgctgaagcc aagttggcat    660
tcgtaattcg tataaagggt atcaacaaag tagctcctaa agtacgcaag gttctccaat    720
tgttccggct ccttcaaadc aacaatggtg tctttgtcaa gctcaacaaa gctaccatca    780
acatgctcag aatatgcgaa ccttacatca cttggggata ccctaacttg aaatctgtca    840
gagaactgat ttataagaga ggtttcgcca aggtgaacgg ccaaaggggtg ccaatcacta    900
gcaatcaaat catcgaagac aaattaggaa agtccgacat catc                        944

```

5

<210> 21

<211> 139

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sintética

10

<400> 21

```

aagctttaac ccctcaggac ccctaaacgg gtcttgaggg gtttctcagc tgatcttgtt    60
ttcttgcaag atcagctgag caataactag cacaaccctc caggacctct aaacgggtct    120
tgaggggttg tgctgaaag                                                    139

```

15

<210> 22

<211> 169

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sintética

<400> 22

ES 2 691 803 T3

ggaaacgaca ggtgctgaaa gcgagctttt tggcctctgt cgtttcccat tacgccacgg 60
tacataaagt aaccgtggcg taatgcctga aaaaaacggc ctgacgtgaa tcaagcaatt 120
ttttcaggg cgcactaaaa gggcatcatt tgatgccctt tttgcacgc 169

<210> 23
<211> 170
<212> ADN
<213> secuencia artificial

5

<220>
<223> sintética
<400> 23

ggcaccgaca ggggccagaa gcgagctttc tggcctctgt cggtgcccgc cacgccacgg 60
tacataaagt accgtggcgt ggcgcctggc gcgccggcctt gacgtgaatc aagccggcgc 120
gccagggcgc actcgcgcgg gcatcatttg atgccccgcgc gagtgcacgc 170

10

REIVINDICACIONES

1. Un terminador transcripcional que comprende una secuencia de ácido nucleico que comprende un primer terminador de la transcripción, un segundo terminador de la transcripción, un tercer terminador de la transcripción y un cuarto terminador de la transcripción que forman una estructura secundaria que comprende cuatro horquillas de tamaño mediano, y en el que el primer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 9, el segundo terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 5, el tercer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 6 o 7, y el cuarto terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 5.
2. El terminador transcripcional de la reivindicación 1, en el que las horquillas:
- están separadas por una región espaciadora que comprende 10 o menos nucleótidos; o
 - cada una comprende una región troncal con menos de 3 nucleótidos sin emparejamiento.
3. El terminador transcripcional de la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 21.
4. Una construcción de expresión obtenida por ingeniería que comprende:
- un promotor;
 - una primera secuencia de ácido nucleico posicionada transcripcionalmente corriente abajo del promotor, en la que la primera secuencia de ácido nucleico codifica un ARNbc o una proteína; y
 - una segunda secuencia de ácido nucleico, posicionada 3' a la primera secuencia de ácido nucleico, en la que la segunda secuencia de ácido nucleico comprende un primer terminador de la transcripción, un segundo terminador de la transcripción, un tercer terminador de la transcripción y un cuarto terminador de la transcripción que forman una estructura secundaria que comprende cuatro horquillas de tamaño mediano, en la que el primer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 9, el segundo terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 5, el tercer terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 6 o 7, y el cuarto terminador de la transcripción comprende la SEQ ID NO: 5; y
- en la que la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están unidas de forma operacional al promotor, y en la que el promotor y las secuencias terminadoras de la transcripción están en combinación funcional.
5. La construcción de expresión obtenida por ingeniería de la reivindicación 4, en la que la segunda secuencia de ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 18 y 21.
6. La construcción de expresión obtenida por ingeniería de la reivindicación 4 o 5, en la que el promotor es un promotor bacteriófago, o en la que el promotor se selecciona de entre un grupo que consiste en SV40, SP6, T5, promotor de β -lactamasa, promotor de galactosa de *E. coli*, promotor de arabinosa, promotor de fosfatasa alcalina, promotor de triptófano (*trp*), promotor de operon lactosa (*lac*), promotor *lacUV5*, promotor *trc* y promotor *tac*.
7. La construcción de expresión obtenida por ingeniería de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que la primera secuencia de ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 2, 4, 14, 15 y 20.
8. Un procedimiento para mejorar la producción de ARN o proteínas que comprende proporcionar la construcción de expresión obtenida por ingeniería de cualquiera de las reivindicaciones 4-7 a una célula huésped bacteriana, fúngica o vegetal.
9. El procedimiento para mejorar la producción de ARN o proteínas de la reivindicación 8, en el que la célula huésped es una célula de *E. coli* HT115 (DE3) o una célula BL21(DE3).
10. Un vector que comprende la construcción de expresión obtenida por ingeniería de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que el vector es un vector plasmídico.
11. Una célula huésped bacteriana que comprende el vector de la reivindicación 10.
12. La célula huésped bacteriana de la reivindicación 11, en la que la célula huésped bacteriana no expresa la ARNasa A o en la que la célula huésped bacteriana es una célula de *E. coli*.
13. Un sistema de cultivo celular para la síntesis *in vivo* de ARNbc que comprende la célula huésped bacteriana de la reivindicación 11 o 12 y un medio de crecimiento, en el que el medio de crecimiento comprende preferentemente 3,2 % de triptona, 2 % de extracto de levadura, 0,5 % > de NaCl, 1 % de glicerol, 0,1 % de glucosa, 0,4 % de alfa-lactosa, (NH₄)₂SO₄ 50mM, KH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, MgSO₄ 2 mM.
14. Una composición para controlar una infestación de plagas de invertebrados o para inhibir la propagación de una enfermedad viral en una población de plantas que comprende:

- (a) la célula huésped bacteriana de la reivindicación 11, en la que la célula huésped bacteriana está muerta y no está lisada; o
- (b) un lisado de la célula huésped bacteriana de la reivindicación 11.

5 15. Un procedimiento para controlar una infestación de plagas de invertebrados o para inhibir la propagación de una enfermedad viral en una población de plantas que comprende aplicar la composición de la reivindicación 14 a una planta.

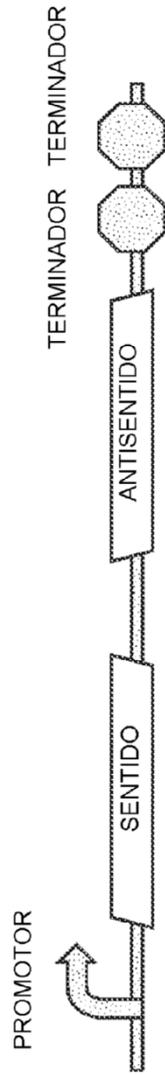


FIG. 1A

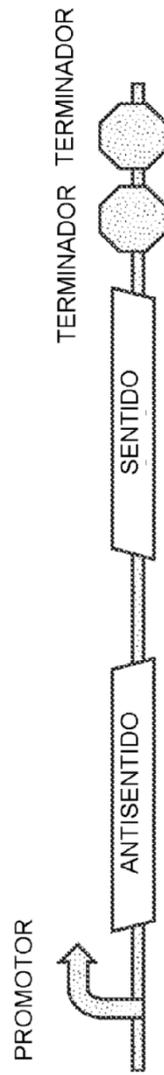


FIG. 1B

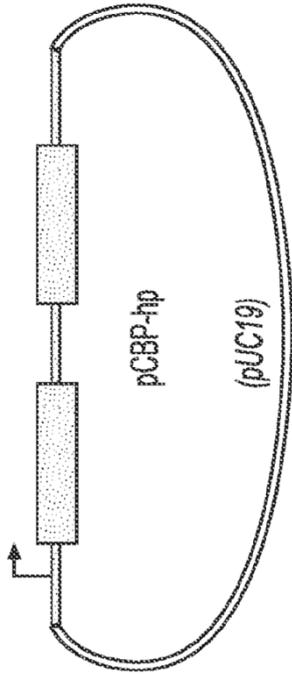


FIG. 2A

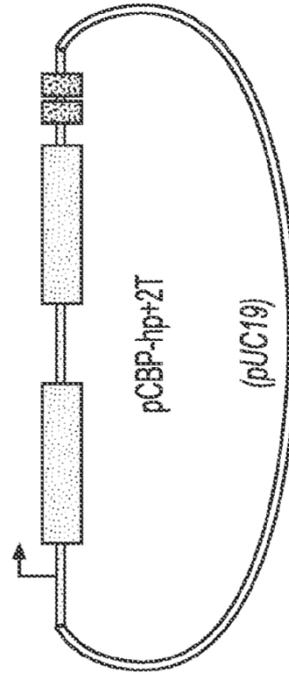


FIG. 2B

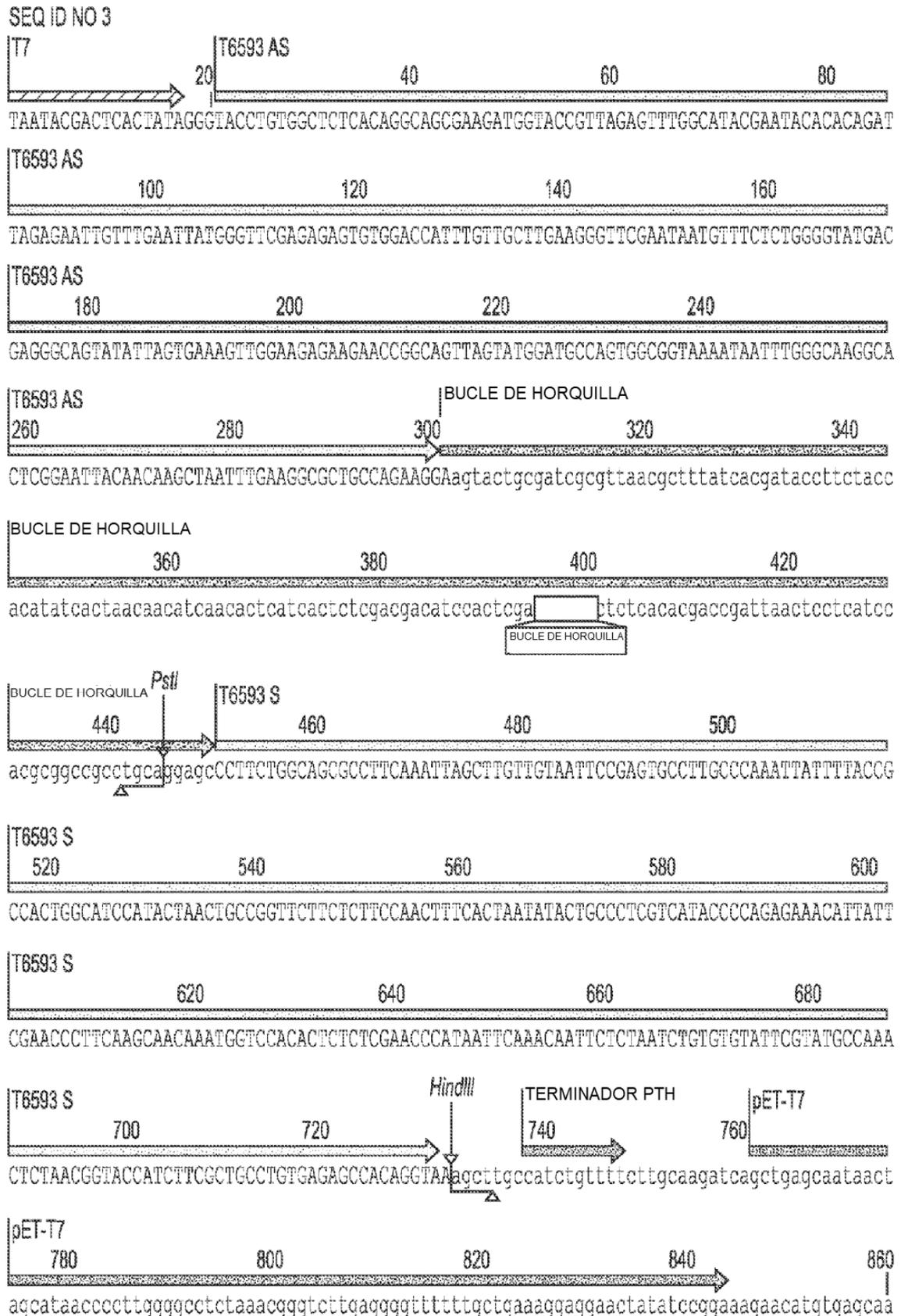


FIG. 2C

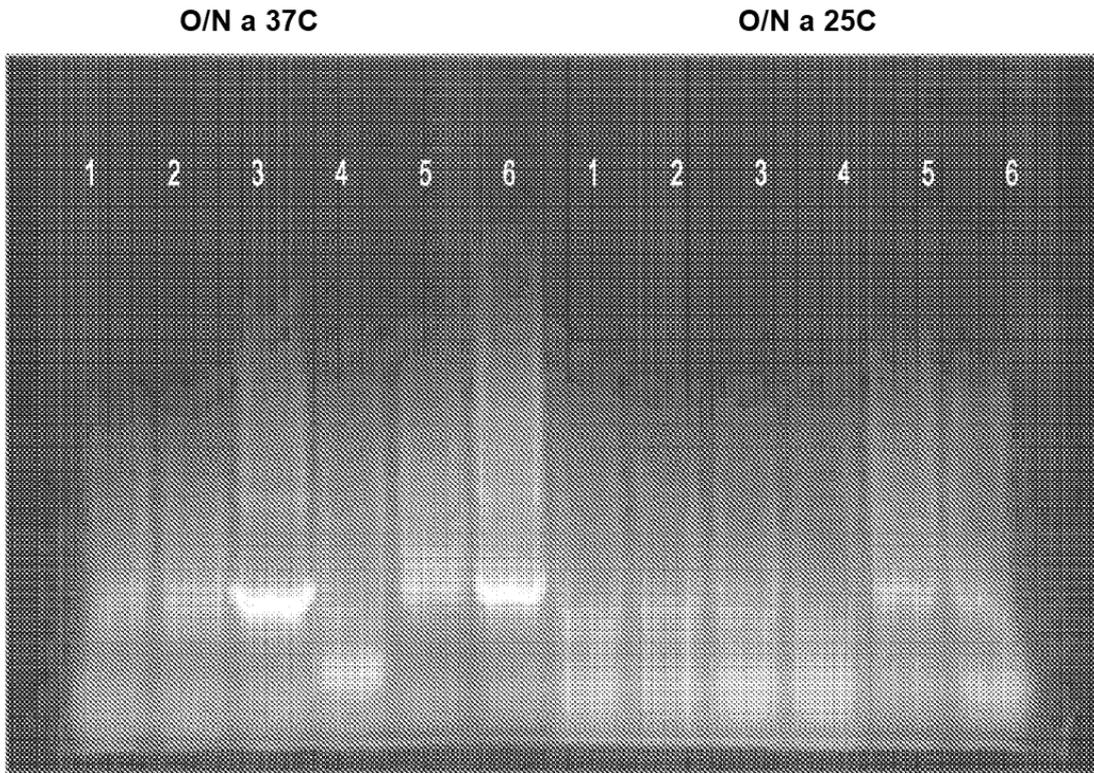


FIG. 3A

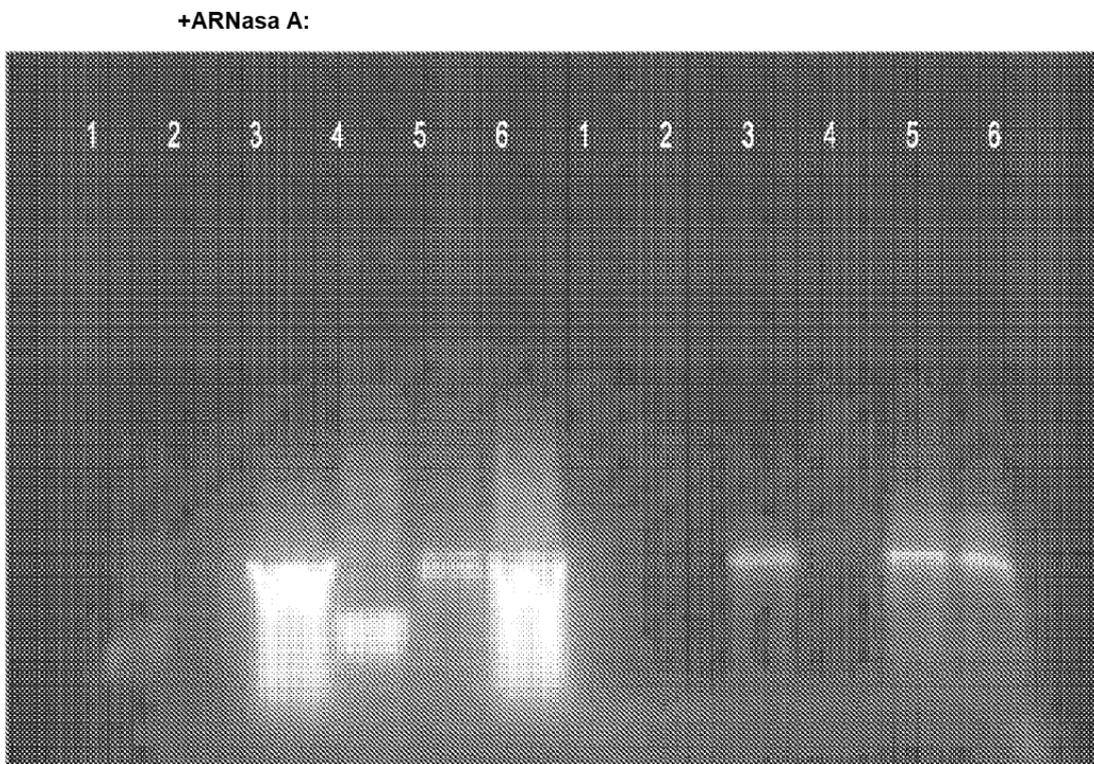


FIG. 3B

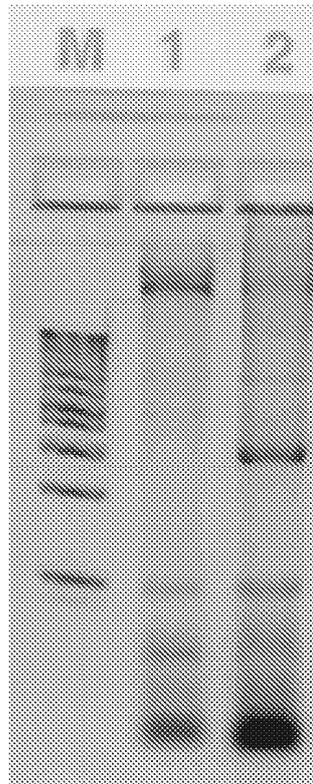


FIG. 4

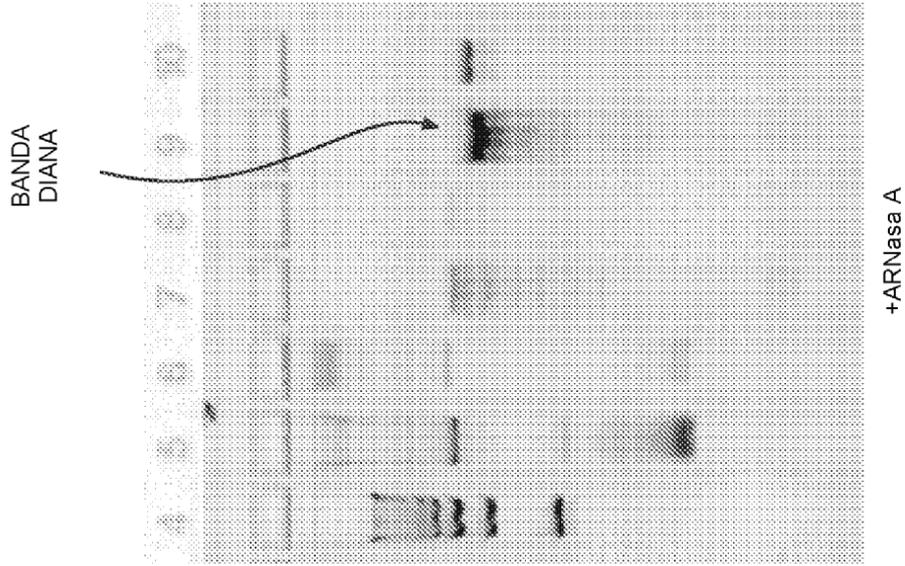


FIG. 5B

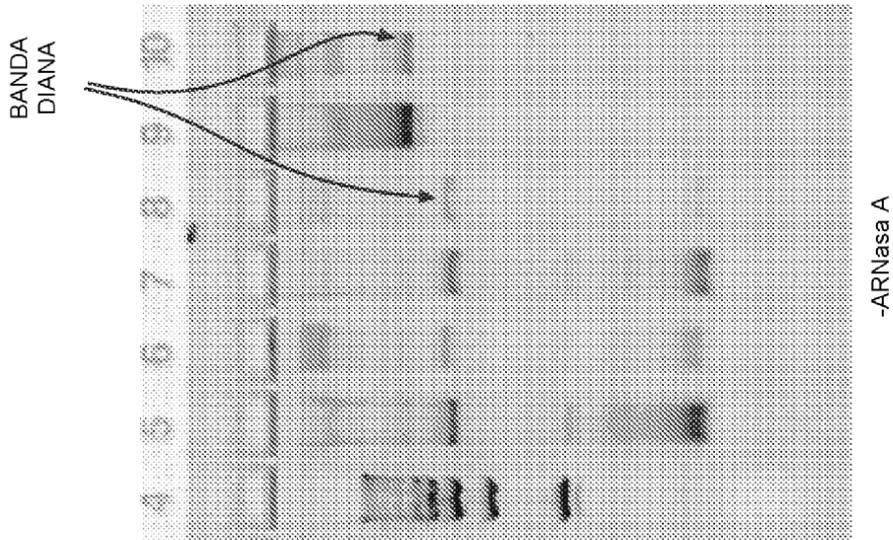


FIG. 5A

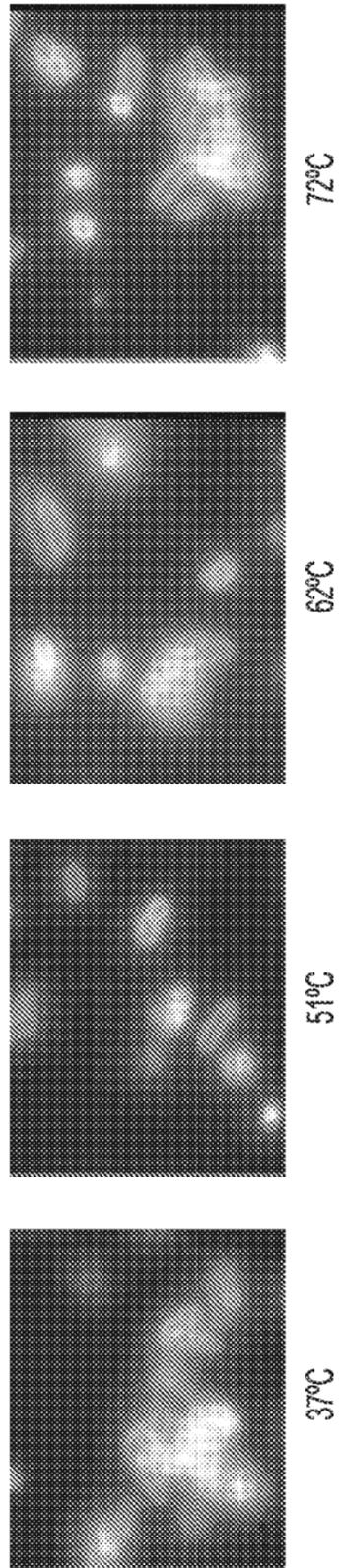
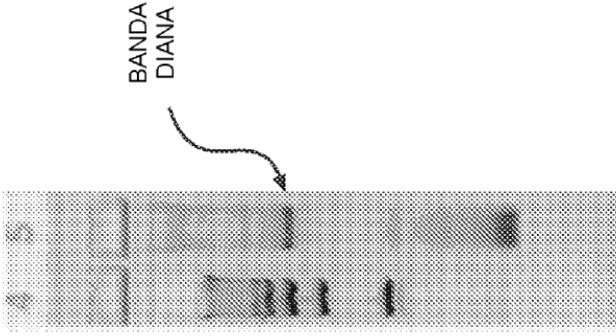


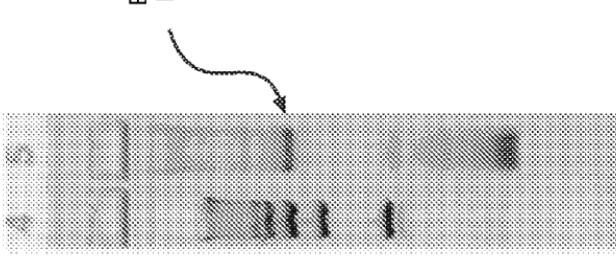
FIG. 6



ARNbc DV 49 BACTERIANO

- 4. MARCADOR
- 5: AIM(MEDIO DE INDUCCIÓN AUTOMÁTICO)(RENDIMIENTO 40mg/l)
- 6: SUPER BROTH + EL MEDIO (RENDIMIENTO 207mg/l)
- 7: PLÁSMIDO + EL MEDIO (RENDIMIENTO 96mg/l)

FIG. 7A



ARNbc CPB BACTERIANO

- 4. MARCADOR
- 6: SUPER BROTH + EL MEDIO (RENDIMIENTO 207mg/l)

FIG. 7B

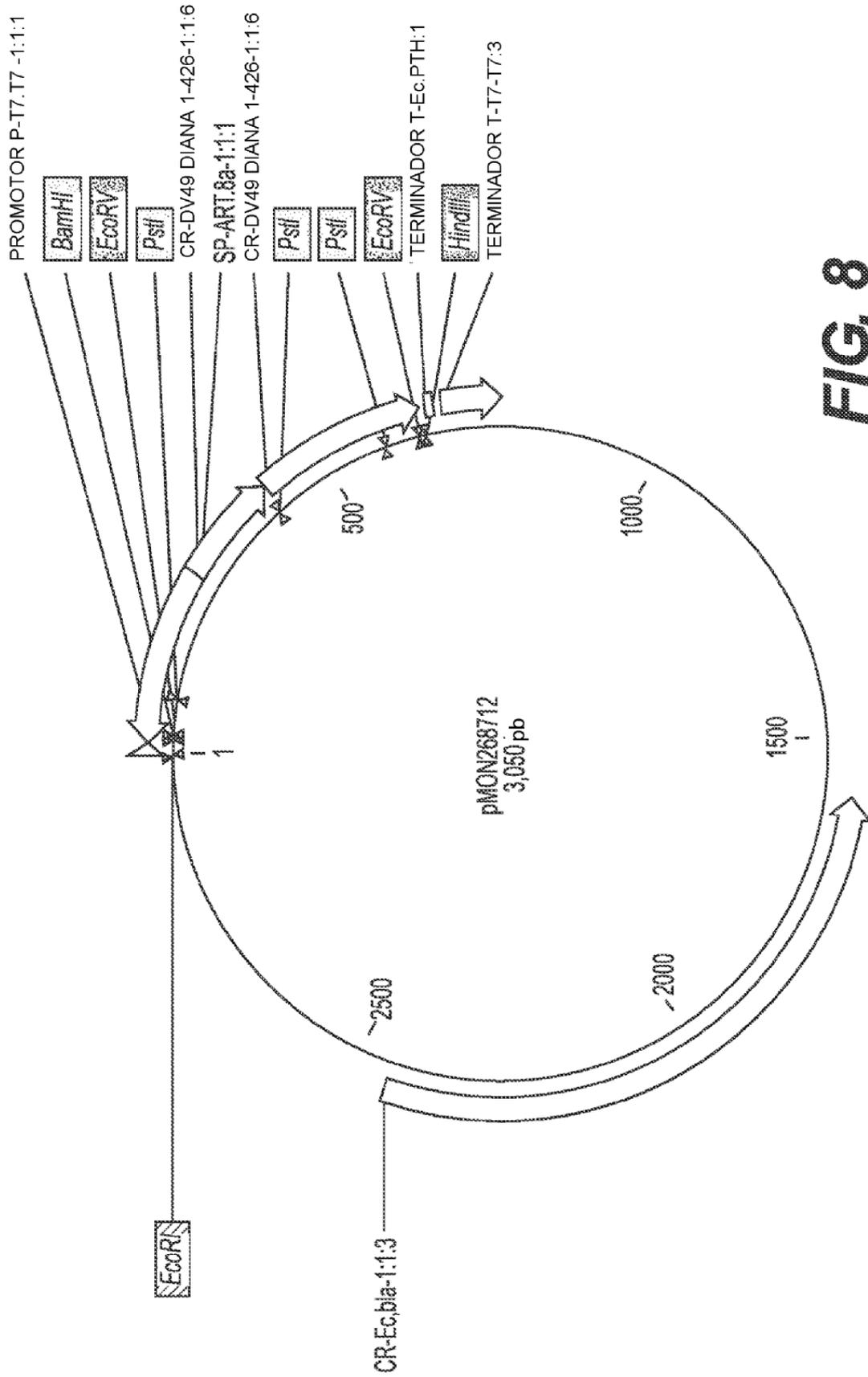
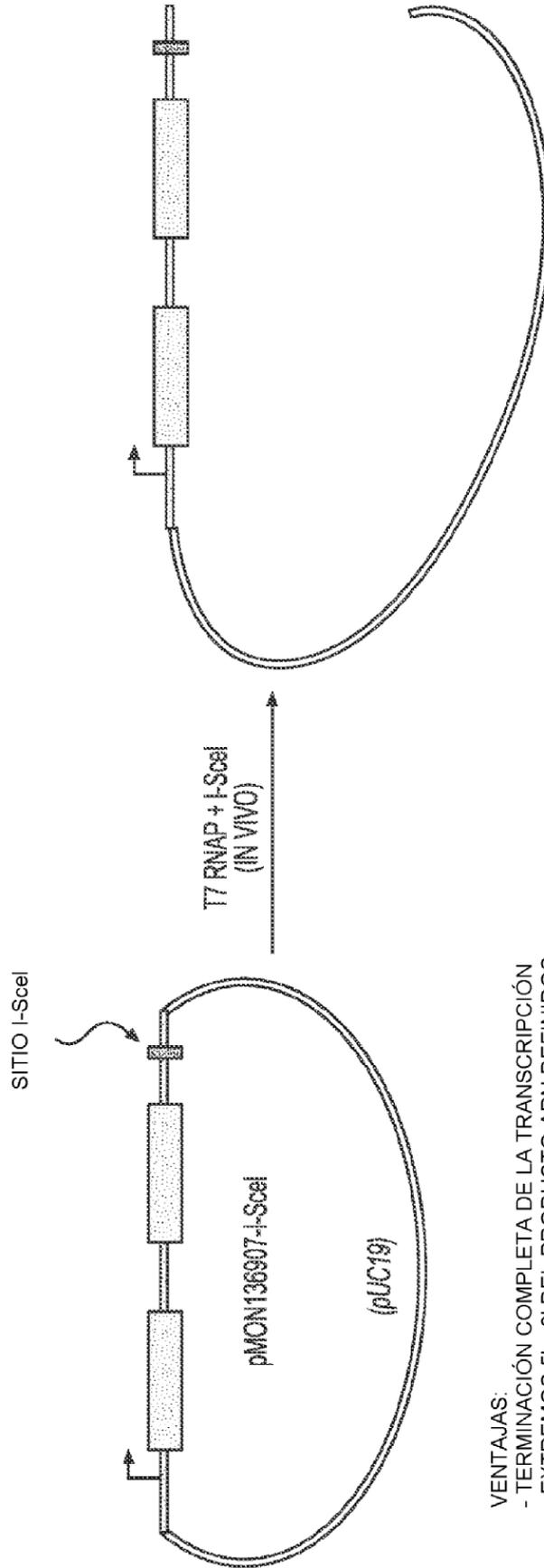


FIG. 8

PRUEBA DE TRANSCRIPCIÓN *IN VIVO* CON T7 RNAP



- VENTAJAS:
- TERMINACIÓN COMPLETA DE LA TRANSCRIPCIÓN
 - EXTREMOS 5' Y 3' DEL PRODUCTO ARN DEFINIDOS
 - TRANSCRIPCIÓN A PARTIR DE UN MOLDE LINEAL FRENTE AL PLÁSMIDO SUPERENROLLADO

FIG. 9

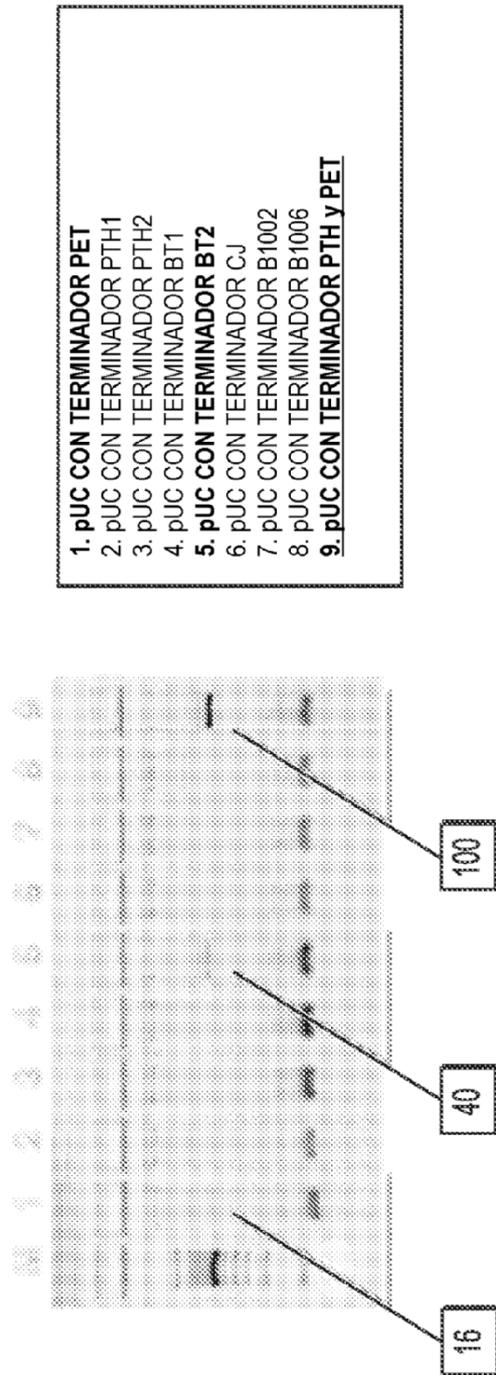
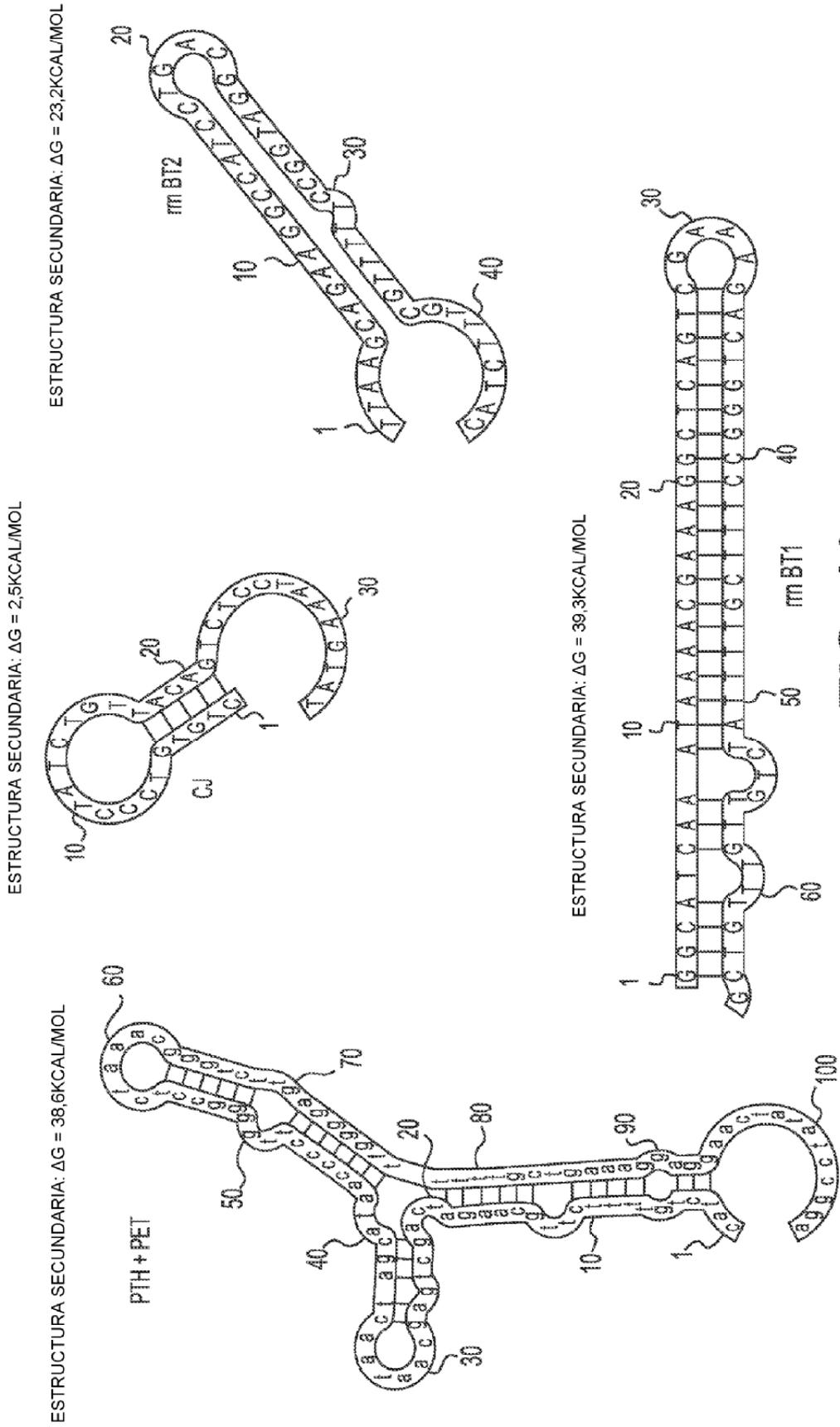
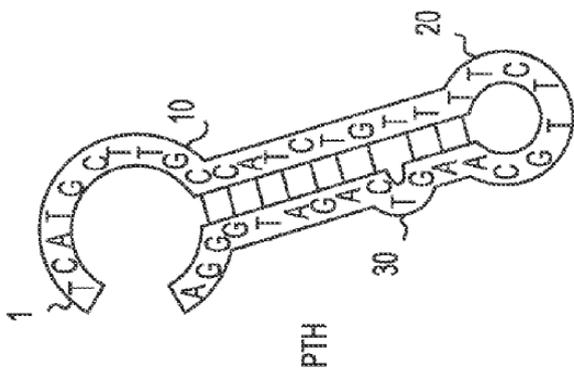


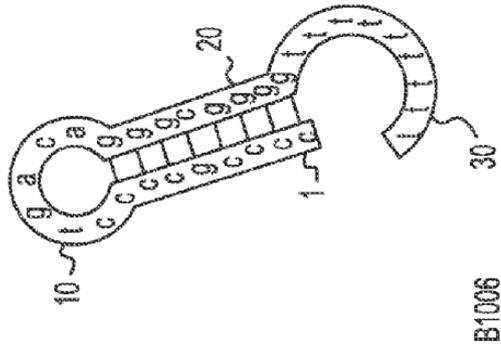
FIG. 10



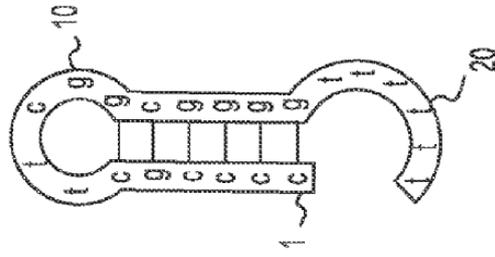
ESTRUCTURA SECUNDARIA: $\Delta G = 9,5\text{KCAL/MOL}$



ESTRUCTURA SECUNDARIA: $\Delta G = 18,5\text{KCAL/MOL}$



ESTRUCTURA SECUNDARIA: $\Delta G = 15,5\text{KCAL/MOL}$



ESTRUCTURA SECUNDARIA: $\Delta G = 24,0\text{KCAL/MOL}$

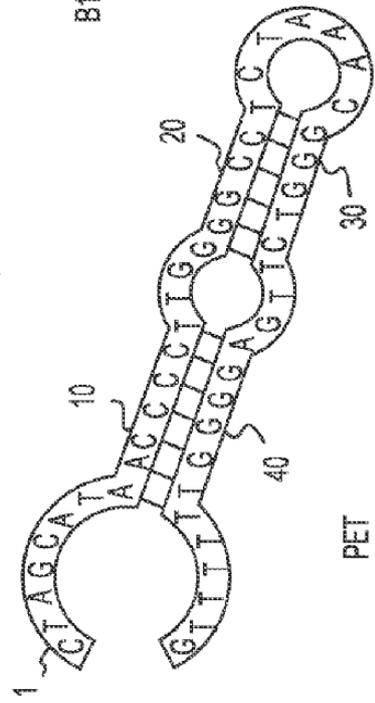


FIG. 11
CONT.

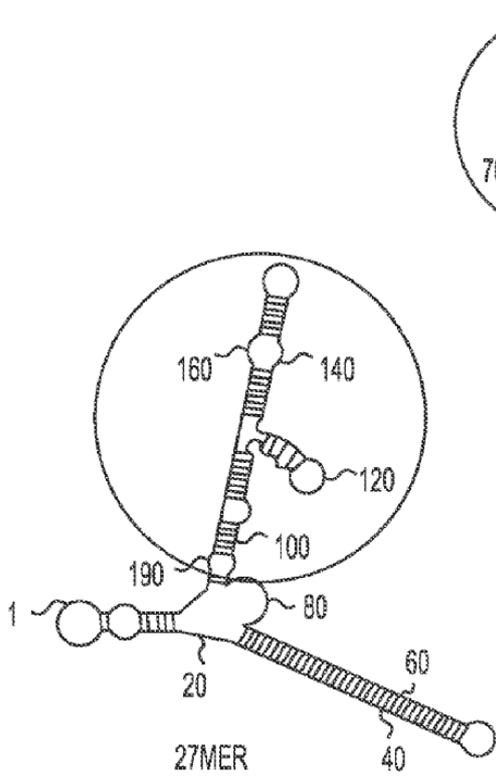


FIG. 12A

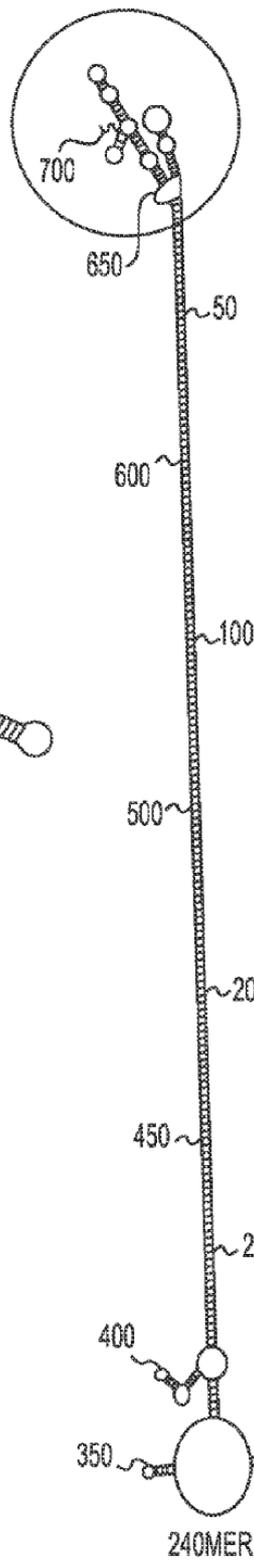


FIG. 12B

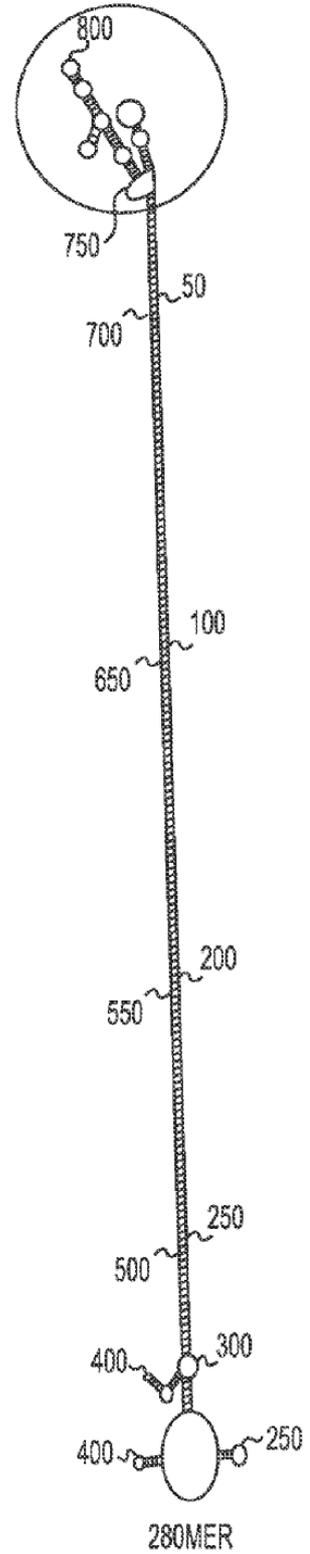


FIG. 12C

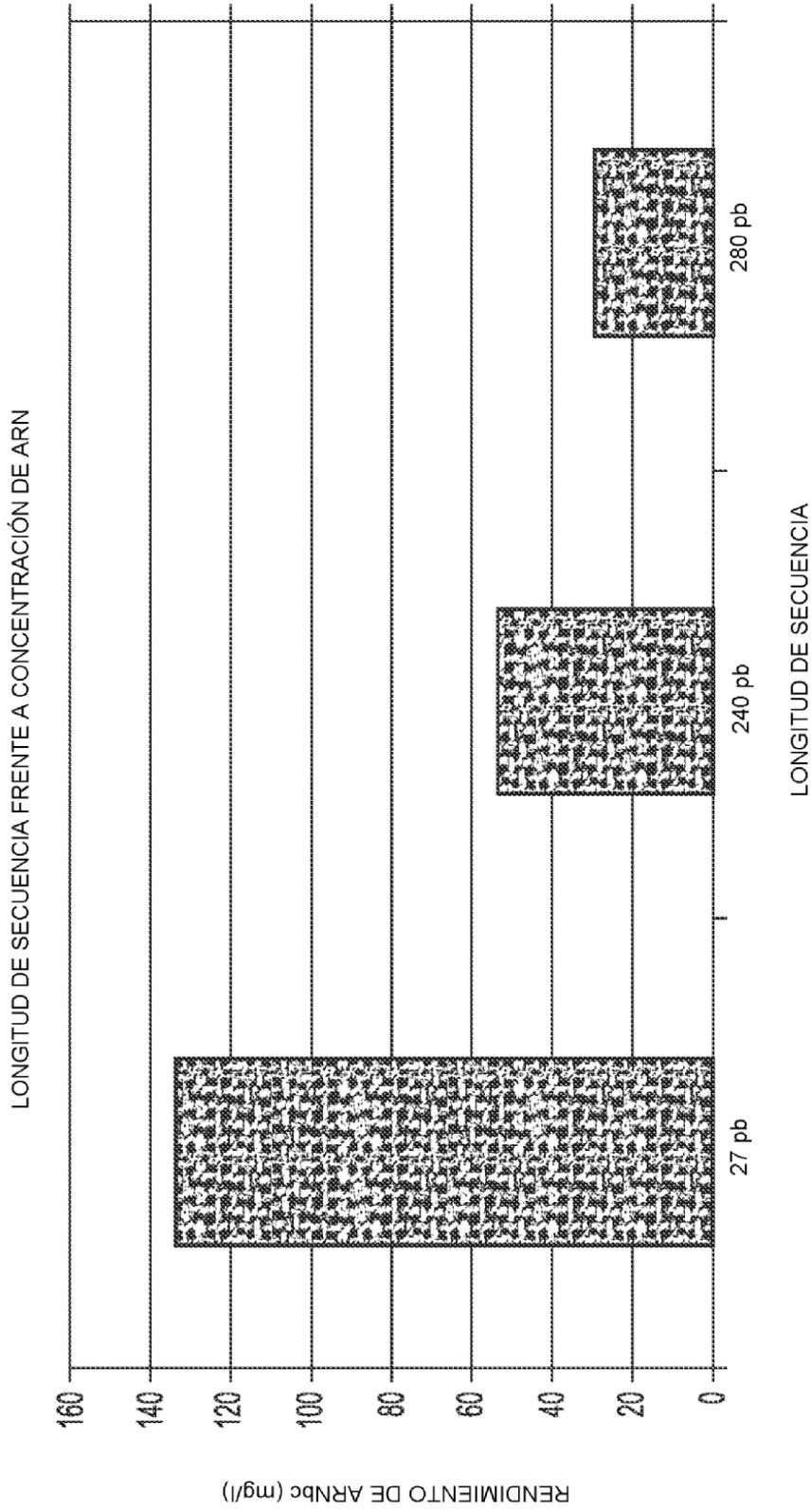


FIG. 13

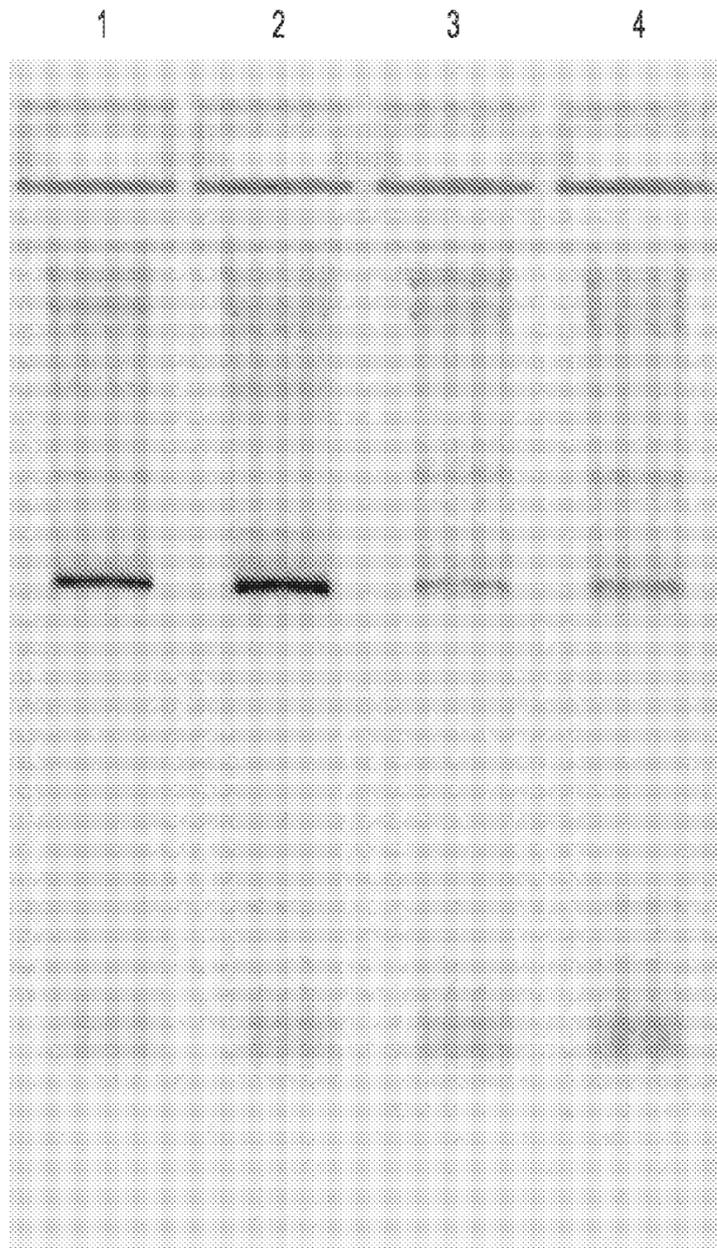
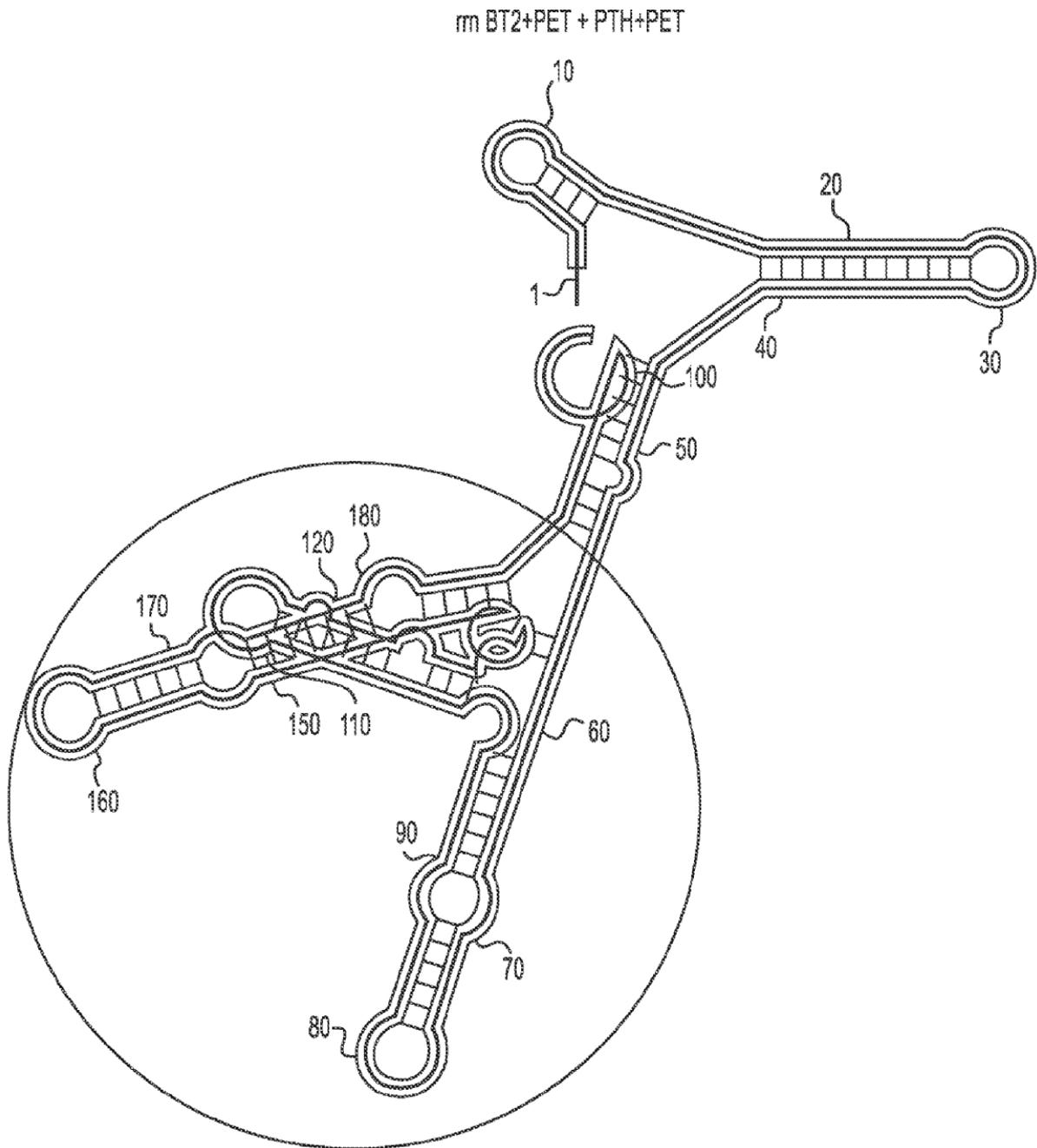
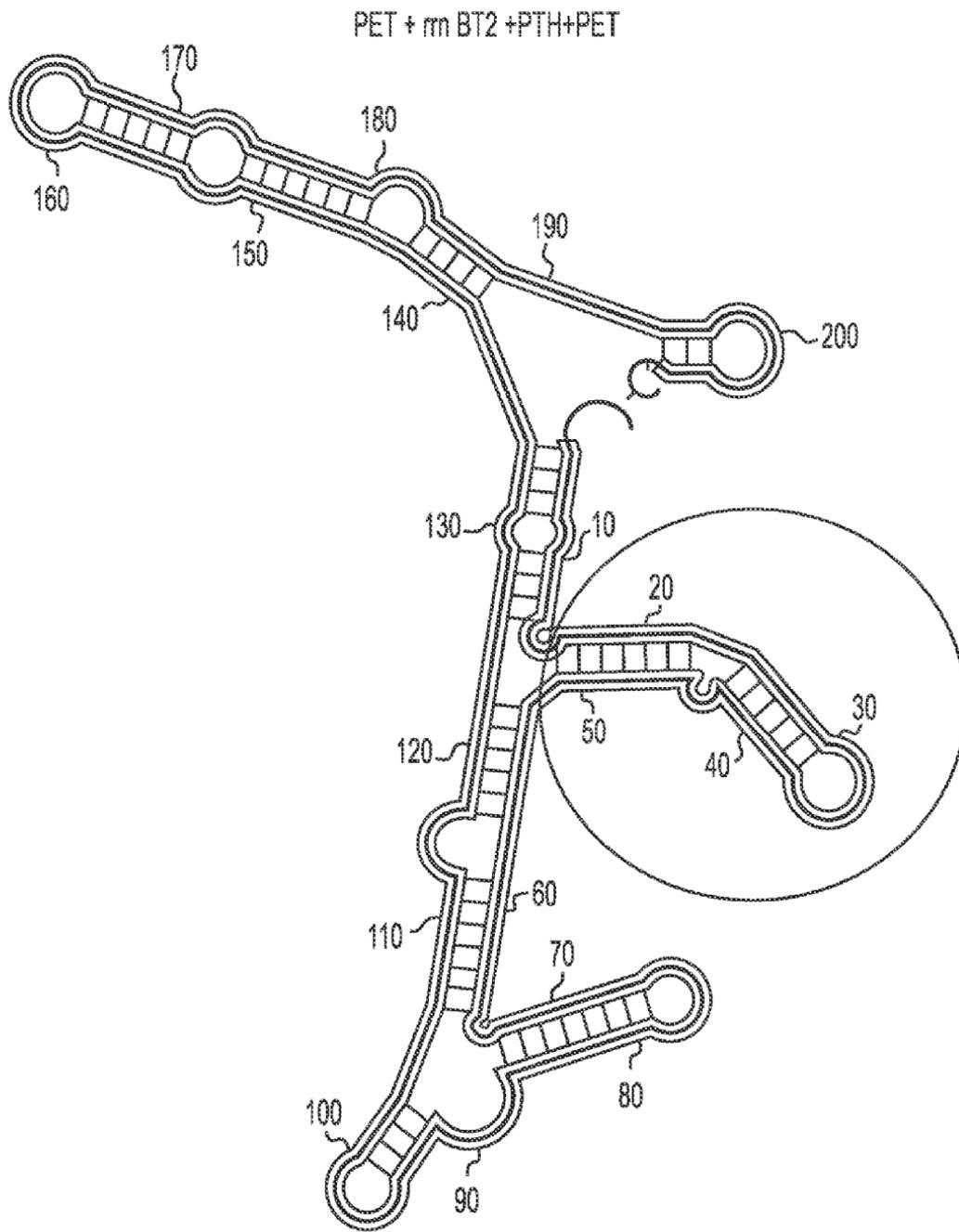


FIG. 14



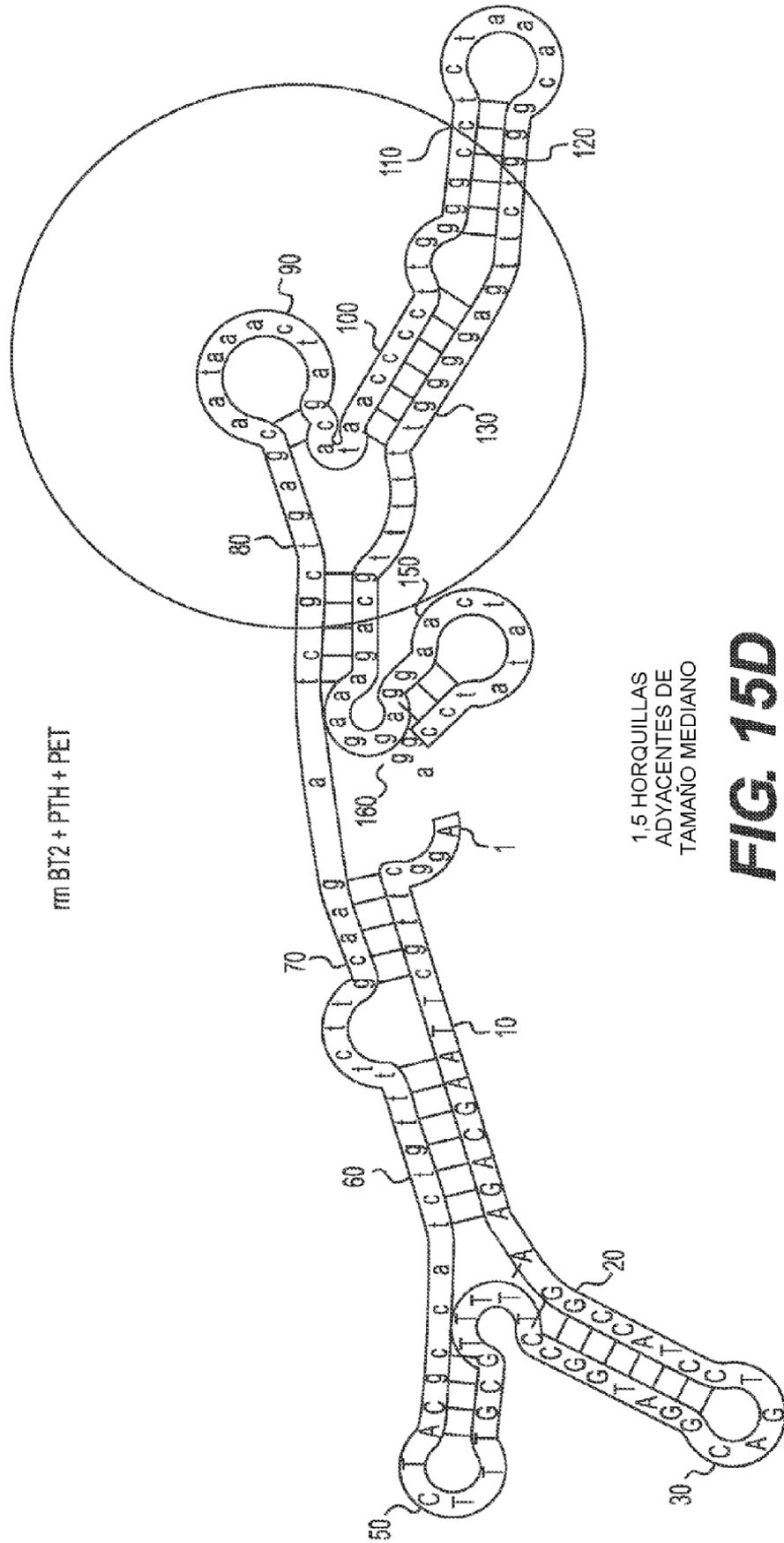
3 HORQUILLAS ADYACENTES
DE TAMAÑO MEDIANO

FIG. 15B



1 HORQUILLA DE TAMAÑO MEDIANO

FIG. 15C



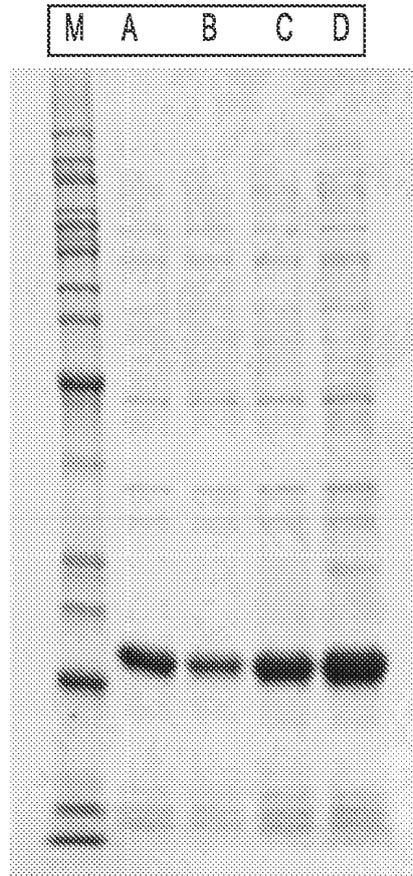


FIG. 16

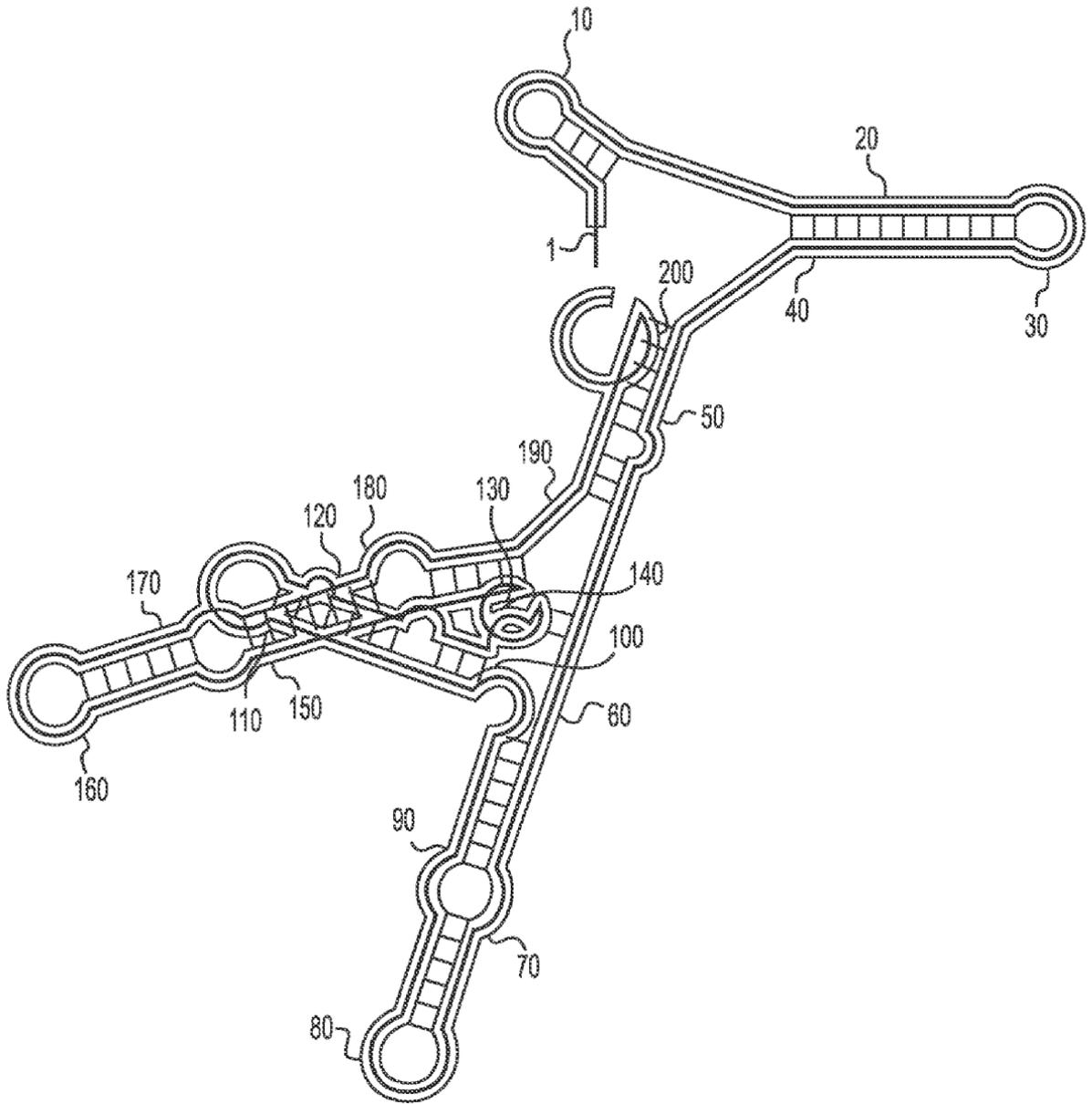


FIG. 17A

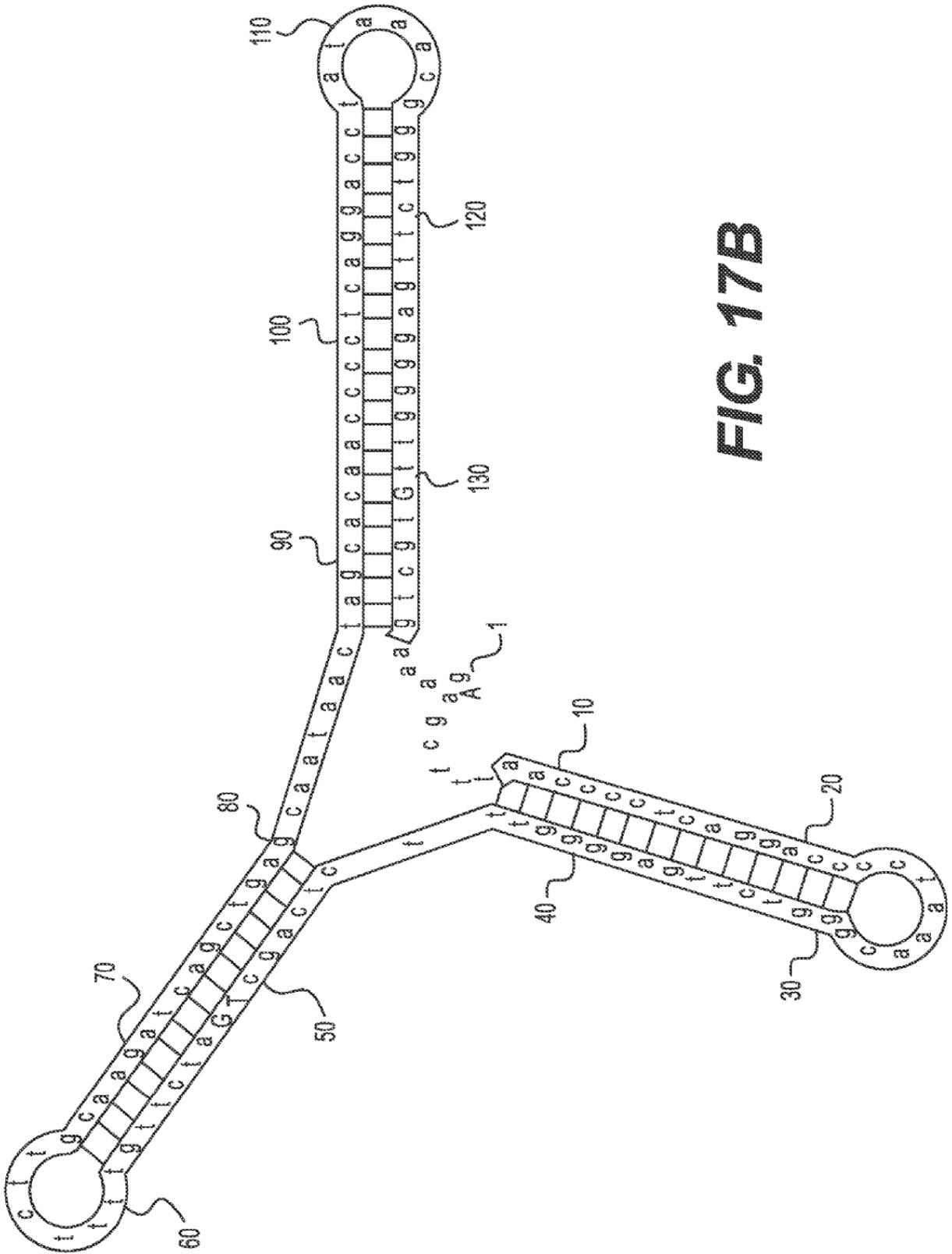


FIG. 17B

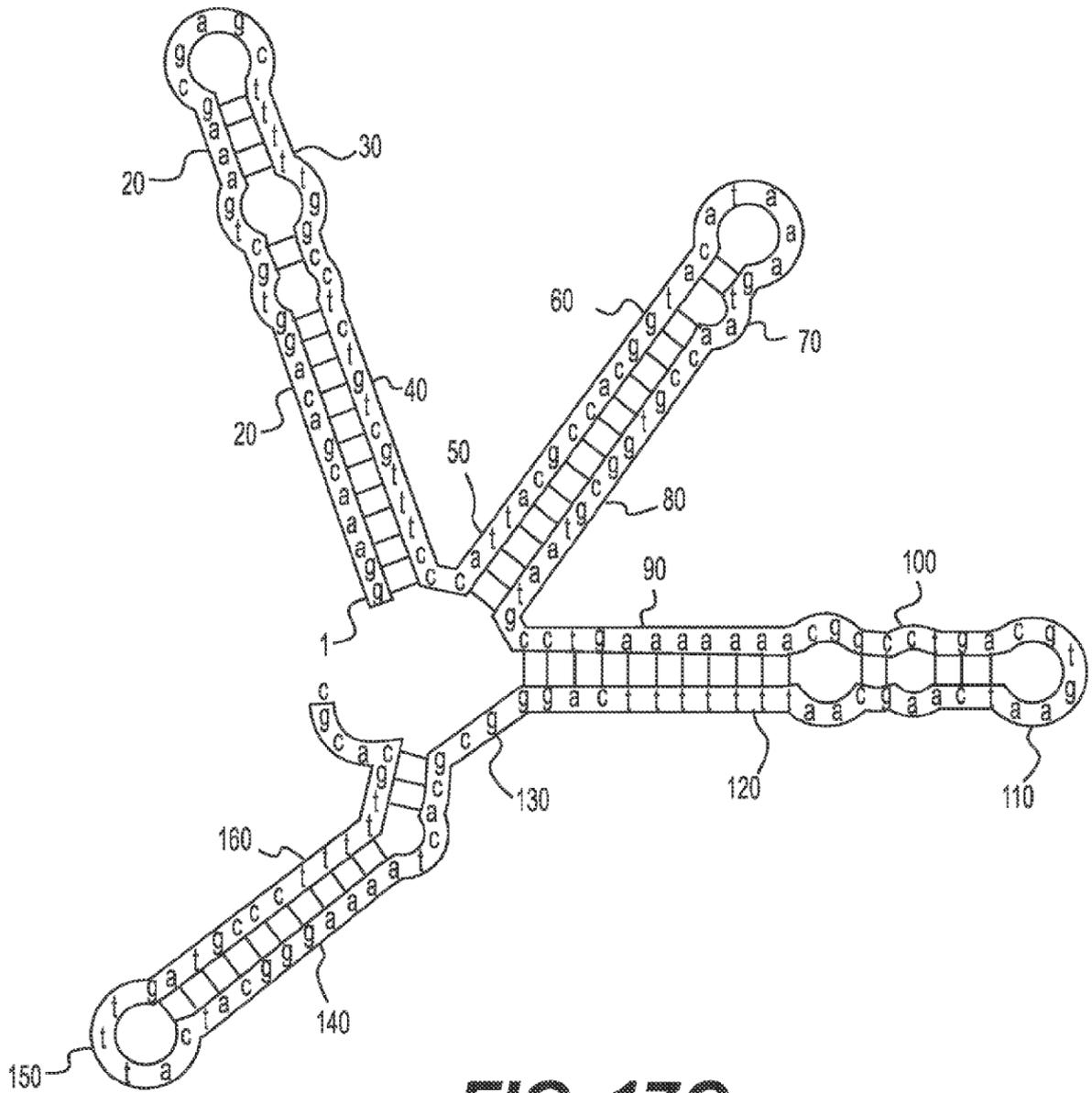


FIG. 17C

