

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 497**

51 Int. Cl.:

A01N 25/22 (2006.01)
A01N 59/06 (2006.01)
A01N 25/10 (2006.01)
A01N 63/02 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A01N 57/16 (2006.01)
A01P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/AU2014/000255**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15089543**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14870784 (7)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3116312**

54 Título: **Composiciones de iARN de protección de plantas que comprenden ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido en partículas de hidróxido doble en capas**

30 Prioridad:

20.12.2013 AU 2013905021

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF QUEENSLAND (100.0%)
 St. Lucia, QLD 4072, AU**

72 Inventor/es:

**MITTER, NEENA;
 XU, ZHI, PING y
 LU, GAO, QING**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 751 497 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 de iARN de protección de plantas que comprenden ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido en partículas de hidróxido doble en capas

5
Campo técnico

La presente invención se refiere, entre otros, a composiciones de protección de plantas, a métodos para preparar dichas composiciones y a métodos para proteger una planta usando dichas composiciones.

10
Antecedentes de la técnica

Se entenderá claramente que, si se hace referencia a una publicación de la técnica anterior en el presente documento, esta referencia no constituye una admisión de que la publicación forme parte del conocimiento general común en la técnica en Australia o en cualquier otro país.

20
Las estrategias tradicionales para el control de plagas y enfermedades de plantas incluyen técnicas tales como la rotación de cultivos, la siembra complementaria, la protección cruzada, la detección precoz de enfermedades y la erradicación, la selección artificial para la resistencia a enfermedades y el control químico. La selección artificial para la resistencia a enfermedades y el control químico son dos de las estrategias más utilizadas para el control de plagas y enfermedades de plantas, tales como insectos, hongos, nematodos y virus.

25
Los métodos de control químico en particular se usan frecuentemente para controlar insectos y hongos que afectan a las plantas y también nematodos. Sin embargo, los agentes químicos con frecuencia son caros y, además, existen problemas de seguridad relacionados con el impacto potencial del agente químico en el medio ambiente y el uso de agentes químicos en, por ejemplo, frutas y verduras que ha de ser consumidos por personas. Estos últimos problemas son factores que han contribuido al crecimiento del mercado de frutas y verduras orgánicas.

30
Los virus son más difíciles de controlar y hay muy pocos, si es que hay, agentes disponibles en el mercado para el tratamiento de virus vegetales. No obstante, el impacto de los virus vegetales en los cultivos puede ser significativo. Por ejemplo, en el sudeste asiático, la infección del arroz con el *virus del tungro del arroz* conduce a una pérdida económica anual estimada de 1,5 mil millones de dólares anuales. Además, el *virus del bronceado del tomate* infecta a una amplia diversidad de plantas, incluyendo el tomate, el cacahuete y el tabaco, lo que conduce a pérdidas mundiales anuales estimadas de aproximadamente mil millones de dólares.

35
Un mecanismo natural de defensa de las plantas contra los virus en las plantas es la interferencia de ARN (iARN), también conocida como silenciamiento de ARN. Cada vez hay más pruebas de que este mecanismo desempeña una función importante en las defensas naturales de las plantas contra parásitos, virus, insectos, nematodos e infecciones fúngicas, así como en la actividad de transposones. A través de este mecanismo, el ARN bicatenario exógeno o endógeno (ARNbc) se corta en ARN de interferencia pequeño (ARNip), que después se incorpora en un complejo silenciador inducido por ARN (CSIA). El CSIA activo después usa el ARNip para detectar y degradar el ARN mensajero (ARNm) vírico objetivo, lo que da lugar a la defensa antivírica.

45
Las plantas pueden seleccionarse artificialmente para aprovechar la resistencia a enfermedad natural frente a diversos virus y otros organismos. Como alternativa, se han producido plantas transgénicas que emplean iARN para proporcionar resistencia a diversos virus. Los ejemplos de plantas transgénicas incluyen los cultivares de papaya (*Carica papaya*) Rainbow™ y Sun Up™ que son resistentes al virus de la mancha de anillo de la papaya de tipo W. Sin embargo, solo hay un número limitado de plantas transgénicas de iARN disponibles en el mercado y la aplicación a gran escala de plantas transgénicas se ha encontrado con resistencia del público y de las agencias reguladoras.

50
Además, el coste de desarrollar plantas transgénicas hace de esta una opción laboriosa y poco atractiva.
El mecanismo de iARN también puede inducirse a través de la aplicación exógena de ARNbc. Sin embargo, ha habido poca investigación sobre los enfoques de iARN no transgénica para la protección de plantas. La investigación que se ha realizado ha ilustrado las limitaciones de este enfoque. Por ejemplo, en un estudio no pudo detectarse el ARNbc aplicado por vía tópica 7 días después de la aplicación. Además, cuando el ARNbc se aplicó 24 horas después de la infección vírica, el ARNbc no fue capaz de proteger las plantas (Tenllado y Diaz-Ruiz (2001)). Otros estudios han ilustrado que el ARNbc fue capaz de proteger *N. benthamiana* cuando se expuso 5 días después de la pulverización, pero un retraso de 7 días entre la pulverización y la inoculación del virus no pudo proteger la planta de la infección sistémica (Tenllado *et al.* (2003) y Gan *et al.* (2010)). Un factor que tiene impacto en la inestabilidad del ARNbc en el entorno es la luz ultravioleta que cataliza la descomposición del ARNbc.

60
En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar un enfoque alternativo eficaz para el control agrícola de virus, parásitos, insectos, nematodos o infecciones fúngicas de plantas y, especialmente, un enfoque que supere al menos parcialmente al menos una de las desventajas mencionadas anteriormente o que proporcione al consumidor una opción útil o comercial.

65

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición de iARN de protección de plantas que comprende ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido en partículas de hidróxido doble en capas (HDC), en la que la relación de carga en masa de ARN bicatenario de protección de plantas: hidróxido doble en capas es de 2:1 a 1:20.

Ventajosamente, se ha descubierto que dichas composiciones, cuando se aplican a plantas, pueden proporcionar a la planta protección durante un período prolongado de tiempo contra una gama de organismos, incluyendo virus vegetales.

La composición puede ser para proteger cualquier planta adecuada. La planta puede ser un embriófito, especialmente un espermatofito, más especialmente una angiosperma (tal como una monocotiledónea (o monocot), dicotiledónea o eudicotiledónea (eudicot)) o una gimnosperma.

Las monocotiledóneas de ejemplo incluyen plantas del orden: asparagales (incluyendo las amarilidáceas (tales como puerro, cebolla, ajo, chalotas y cebollino) y asparagáceas (tales como los espárragos)); arecales (incluyendo las arecáceas (tales como las palmas, por ejemplo, la palma de coco)); dioscoreales (incluyendo las dioscoreáceas (tales como el ñame)); poales (incluyendo las bromeliáceas (tales como la piña) y las poáceas (incluyendo el maíz (maíz), trigo, arroz, cebada, mijo, sorgo, avena y bambú)); y zingiberales (incluyendo las musáceas (incluyendo el plátano) y las zingiberáceas (incluyendo el jengibre y la galanga)).

Las eudicotiledóneas de ejemplo incluyen plantas del orden:

- Apiales (incluyendo las apiáceas (tales como la chirivía, la zanahoria y el apio));
- Asterales (incluyendo las asteráceas (tales como la lechuga, la alcachofa y el girasol));
- Brassicales (incluyendo las brasicáceas (tales como el brócoli, repollo, kale, coliflor, coles de Bruselas, bok choy, choi sum, colirrábano, rábano, nabo y colza) y las caparáceas (tales como las alcaparras);
- Caryophyllales (incluyendo las amarantáceas (tales como las espinacas, las acelgas y la remolacha) y las poligonáceas (tales como el ruibarbo));
- Cucurbitales (incluyendo las cucurbitáceas (tales como el pepino, calabaza, calabaza, cantalupo, melón dulce, calabacín y sandía));
- Ericales (incluyendo las actinidiáceas (tales como el kiwi) y las ericáceas (tales como el arándano));
- Fabales (incluyendo las fabáceas (tales como diversas judías, guisantes, semilla de soja, judía mung, lentejas, cacahuete y alfalfa));
- Lamiales (incluyendo las oleáceas (tales como el olivo));
- Malpighiales (incluyendo las lináceas (tales como el lino));
- Malvales (incluyendo las malváceas (tales como el algodón));
- Myrtales (incluyendo las mirtáceas (tales como la guayaba));
- Rosales (incluyendo las cannabáceas (tales como el cáñamo), las rosáceas (tales como la fresa, manzana, pera, albaricoque, ciruela, cereza, melocotón, frambuesa, almendra y nectarina) y las moráceas (tales como el higo);
- Sapindales (incluyendo las rutáceas (tales como los cítricos, por ejemplo, naranja, limón, pomelo, lima y mandarina) y las sapindáceas (tales como el lichi));
- Solanales (incluyendo las convolvuláceas (tales como el boniato) y las solanáceas (tales como la patata, tomate, berenjena, pimientos (tales como la guindilla) y tabaco)); y
- Vitales (incluyendo las vitáceas (tales como la uva)).

En una realización, la composición es para proteger cultivos agrícolas comerciales. Los cultivos de ejemplo incluyen cereales, verduras (incluyendo raíces y tubérculos), frutas, legumbres, cultivos oleaginosos y cultivos de fibra. Los cereales pueden incluir maíz (maíz), arroz, trigo, cebada, sorgo, mijo y avena. Las verduras pueden incluir brócoli, coliflor, repollo, alcachofas, alcaparras, kale, espinaca, lechuga, bok choy, acelga, choi sum, puerros, coles de Bruselas, colirrábano, galanga, jengibre, apio, ruibarbo, espárragos, brotes de bambú, patatas, boniatos, ñame, soja, judía mung, alfalfa, zanahorias, chirivías, remolacha, rábanos, nabos, cebollas, chalotas y ajo. Las frutas pueden incluir tomates, uvas, kiwi, bayas (incluyendo las fresas, arándanos y frambuesas), guayaba, peras, melones (incluyendo los cantalupos, sandías y melones dulces), cítricos (incluyendo las naranjas, mandarinas, limones, limas y pomelos), frutas de hueso (incluyendo los albaricoques, nectarinas, ciruelas, cerezas y melocotones), lichis, piñas, higos, manzanas, plátanos, pepinos, calabaza, calabacines, calabazas, pimientos, berenjenas y aguacates. Las legumbres pueden incluir judías, guisantes y lentejas. Los cultivos oleaginosos pueden incluir cultivos de los que puede obtenerse aceite, tales como palmas, soja, semillas de colza, semillas de girasol, cacahuetes, semillas de algodón, nueces de palma, cocos y aceitunas. Los cultivos de fibra pueden incluir algodón, lino, cáñamo y bambú. El cultivo también puede ser tabaco o una planta con flores.

El ARN bicatenario (ARN_{bc}) de protección de plantas puede ser capaz de proteger una planta (especialmente a través de la interferencia de ARN) contra organismos que incluyen: un virus o viroide vegetal, parásitos, insectos, nematodo, hongos u oomicetos; especialmente contra un virus o viroide vegetal, insectos, hongos u oomicetos; más especialmente un virus o viroide vegetal. Los virus y viroides de ejemplo incluyen un virus o viroide de la familia:

- Alphaflexiviridae (especialmente el virus X de la patata (VXP));
- Bromoviridae (especialmente el virus del mosaico de la alfalfa (VMA), el virus del mosaico del pepino y el virus del mosaico del bromo (VMB));
- 5 - Bunyaviridae (especialmente el virus del bronceado del tomate);
- Caulimoviridae (especialmente el virus del mosaico de la coliflor (VMCo) y el virus baciliforme del tungro del arroz);
- Closteroviridae (especialmente el virus de la tristeza de los cítricos);
- Geminiviridae (especialmente el virus de la India del mosaico amarillo de la judía mung, el virus del mosaico de la mandioca africana, el virus *Sardinia* de la hoja rizada amarilla del tomate, el virus de la hoja rizada amarilla del
- 10 tomate y el virus del mosaico de la mandioca africana);
- Luteoviridae (especialmente el virus enano amarillo de la cebada y el virus del enrollamiento de la hoja de la patata);
- Pospoviridae (especialmente el viroide de la deformación fusiforme del tubérculo de la patata);
- Potyviridae (especialmente el virus Y de la patata (VYP), el virus del grabado del tabaco (VGT), el virus de la mancha de anillo de la papaya de tipo W (VMAP-W), el virus de la viruela del ciruelo (VVC), el virus del mosaico
- 15 de la caña de azúcar, el virus del mosaico de la judía común y el virus de la raya parda de la mandioca);
- Sequiviridae (especialmente el virus esférico del tungro del arroz);
- Tombusviridae (especialmente el virus del moteado clorótico del maíz y el virus del enanismo arbustivo del tomate);
- y
- Virgaviridae (especialmente el virus del mosaico del tabaco (VMT), el virus del mosaico del tomate, el virus del moteado leve del pimiento (VMoLP) y el virus del mosaico del moteado verde del pepino).
- 20

El virus vegetal también puede ser un virus del género Benyvirus (especialmente el virus de la vena amarilla necrótica de la remolacha).

- 25 Los hongos de ejemplo incluyen especies de *Magnaporthe* (especialmente *Magnaporthe oryzae*), especies de *Botrytis* (especialmente *Botrytis cinerea*), especies de *Puccinia*, especies de *Fusarium* (especialmente *Fusarium graminearum* y *Fusarium oxysporum*), especies de *Blumeria* (especialmente *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), especies de *Mycosphaerella* (especialmente *Mycosphaerella graminicola*), especies de *Colletotrichum*, especies de *Ustilago* (especialmente *Ustilago maydis*), especies de *Melampsora* (especialmente *Melampsora lini*), especies de *Phakopsora*
- 30 (especialmente *Phakopsora pachyrhizi*), especies de *Rhizoctonia* (especialmente *Rhizoctonia solani*) y especies de *Aspergillus*.

Los oomicetos de ejemplo incluyen especies de *Phytophthora*. Los insectos de ejemplo incluyen: gusano de algodón, gusano de la raíz del maíz, áfidos, polilla de dorso diamante, gorgojos y otros insectos lepidópteros. Un nematodo de

35 ejemplo es el nematodo de nudo de raíz. Un parásito de ejemplo es la hierba parásita *Striga asiatica* L.

En una realización, el ARNbc de protección de plantas es capaz de proteger una planta (especialmente a través de interferencia de ARN) contra un virus vegetal; especialmente un virus vegetal de la familia Bromoviridae, Potyviridae o Virgaviridae; mucho más especialmente un virus vegetal seleccionado entre el virus del mosaico del pepino, el virus

40 Y de la patata (VYP) y el virus del moteado leve del pimiento (VMoLP).

Puede seleccionarse una secuencia específica de ARNbc basándose en el organismo contra el que se busca protección y un experto podría seleccionar fácilmente una secuencia apropiada.

45 Ventajosamente, con el fin de que se produzca la interferencia de ARN, la secuencia de nucleótidos de ARN debe coincidir perfectamente con el organismo. En consecuencia, es probable que el ARNbc sea altamente específico para el organismo objetivo, limitando la posibilidad de efectos adversos en el medio ambiente o en las personas en el momento del consumo (en el caso de verduras y frutas, por ejemplo).

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "protección de plantas" y similares significa que la composición/ARNbc es capaz de prevenir, tratar o mejorar el impacto de un organismo, tal como un virus, parásitos, insectos, nematodos u hongos, en una planta. Por ejemplo, el ARNbc que protege a una planta contra un virus puede tratar una infección vírica, evitar que se produzca una infección vírica y/o mejorar la gravedad de una infección vírica. Para disipar cualquier duda, el término "tratar" incluye tratamientos completos y parciales (es decir, la planta aún puede

55 verse afectada por el organismo objetivo después del tratamiento, pero en menor medida que antes del tratamiento).

La composición puede incluir una cantidad eficaz de ARNbc de protección de plantas. La expresión "cantidad eficaz" significa que se administra una cantidad suficiente de ARNbc para tratar, prevenir o mejorar el impacto de un organismo en una planta.

60

La longitud del ARNbc puede variar dependiendo del organismo u organismos contra los que se busca protección. Ventajosamente, las ARNasas de las plantas (enzimas de tipo Dicer) escindirán secuencias largas de ARNbc en fragmentos mucho más pequeños, cada uno de los cuales tiene normalmente una longitud de 21-25 nucleótidos. Por tanto, pueden usarse secuencias largas de ARNbc de, por ejemplo, 100 a 3000 pares de bases y estas secuencias

65 más largas se escindirían en dichos fragmentos más pequeños por la planta a medida que el ARNbc se libera del HDC. Se cree que estos fragmentos más pequeños de 21 nucleótidos están implicados en el mecanismo de

interferencia de ARN.

Una única construcción de ARNbc puede diseñarse combinando secuencias específicas de múltiples patógenos y plagas que podrían dirigirse a múltiples organismos, ya que la planta escindiría la secuencia de ARNbc en fragmentos más cortos. Por ejemplo, podría usarse una única construcción de ARNbc para dirigirse a tres virus diferentes y dos insectos diferentes. El ARNbc puede dirigirse al menos a dos organismos, más especialmente de 2 a 10 organismos, incluso más especialmente de 4 a 8 organismos.

Por tanto, el ARNbc puede tener una longitud de 21 a 3000 pares de bases; especialmente una longitud de 21 a 2500 o de 21 a 2000 pares de bases; más especialmente una longitud de 80 a 1750, de 80 a 1500 o de 80 a 1200 pares de bases; más especialmente una longitud de 100 a 1200, de 250 a 1200, de 300 a 1200 o de 400 a 1000 pares de bases. Ventajosamente, el uso de dichas secuencias de ARNbc más largas proporciona una probabilidad mucho mayor de que la secuencia se escinda en una secuencia de nucleótidos que coincidirá con el organismo deseado para afectar (por ejemplo, destruir) al organismo. Además, es significativamente menos caro producir una construcción de ARNbc más larga que se dirija a múltiples organismos, en lugar de múltiples secuencias cortas de ARNbc que se dirigen cada una a un solo organismo.

Sorprendentemente, se ha descubierto que HDC es capaz de unirse a secuencias de ARNbc de una diversidad de longitudes independientemente de la secuencia.

En una realización, el ARNbc es una Inclusión de Nucleasa a (Nla) contra el virus Y de la patata o una construcción pGEM-IR54 contra el virus del moteado leve del pimiento.

En otra realización, el ARNbc incluye una cadena (antisentido o sentido) que es complementaria o al menos parcialmente complementaria a una secuencia como se establece en las SEQ ID NO. 1, 2 o 3; más especialmente las SEQ ID NO. 1 o 2. Como se usa en el presente documento, la frase "al menos parcialmente complementaria" significa que una cadena del ARNbc tiene al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad de secuencia con la secuencia. Se apreciaría que esta definición tenga en cuenta que el ARN usa un U en lugar de una T, como se encuentra en el ADN.

En una realización adicional, el ARNbc incluye una cadena (antisentido o sentido) que es complementaria o al menos parcialmente complementaria a un fragmento de una secuencia como se establece en las SEQ ID NO. 1, 2 o 3; más especialmente las SEQ ID NO. 1 o 2. Únicamente a modo de ejemplo, un fragmento puede incluir al menos un 5 %, un 10 %, un 15 %, un 20 %, un 25 %, un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % de una secuencia que es complementaria o al menos parcialmente complementaria a una secuencia como se establece en las SEQ ID NO. 1, 2 o 3; más especialmente las SEQ ID NO. 1 o 2.

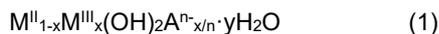
El ARNbc puede producirse de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, el ARNbc puede producirse *in vitro* a través de un kit, *in vitro* o *in vivo* a través de un bacteriófago (tal como a través de un bacteriófago de ARNbc de *Pseudomonas syringae*) o *in vivo* usando una cepa especializada de organismo, especialmente usando una bacteria (tal como una cepa de *E. coli*). Normalmente, los métodos *in vitro* son adecuados para la producción de ARNbc a menor escala. Para la producción a gran escala, se prefieren los métodos de producción *in vivo*. El ARNbc utilizado puede ser un extracto bacteriano en bruto.

El ARNbc puede estar en cualquier forma adecuada y tener cualquier secuencia adecuada. El ARNbc puede incluir cualquier modificación adecuada. Por ejemplo, el ARNbc puede incluir uno o más grupos fosfato modificados, ácidos nucleicos/nucleótidos modificados, azúcares modificados y/o extremos cebadores 5 o 3 modificados. Los grupos modificados de ejemplo que pueden estar presentes en el ARNbc incluyen, por ejemplo, inosina, metilinosina, pseudouridina, morfina, ácidos nucleicos bloqueados, péptidos (tales como ácidos nucleicos peptídicos (ANP)), biotina, colesterol, fluoróforos, radionucleidos y metales. El ARNbc también puede estar en forma de una construcción de ARNbc. Dichas modificaciones pueden potenciar la estabilidad y/o la longevidad del ARNbc.

El ARNbc es normalmente aniónico e interactúa con (y se intercala especialmente entre) las capas de HDC catiónicas. En la Figura 1 se proporciona un diagrama que ilustra una carga y liberación de ARNbc sobre y desde HDC.

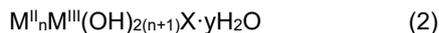
Los HDC (hidróxidos dobles en capas) son hidróxidos mixtos de metales divalentes y trivalentes que tienen un exceso de carga positiva que se equilibra mediante aniones entre capas. Las formas comunes de HDC comprenden Mg^{2+} y Al^{3+} (conocidas como hidrotalcitas) y Mg^{2+} y Fe^{3+} (conocidas como piroauritas), pero se conocen HDC que contienen otros cationes incluyendo Ni, Zn, Mn, Ca, Cr y La. La cantidad de carga positiva superficial generada depende de la relación molar de los iones metálicos en la estructura reticular y de las condiciones de preparación, ya que afectan a la formación de cristales.

El HDC puede tener la fórmula general (1):



5 donde M^{II} y M^{III} son iones metálicos di y trivalentes, respectivamente y A^{n-} es el anión entre capas de valencia n . El valor x representa la proporción de metal trivalente con respecto a la cantidad total de ión metálico presente e y denota cantidades variables de agua entre capas. Una porción limitada de A^{n-} puede estar presente en la superficie de las partículas de HDC (por ejemplo, un 5-40 %, más especialmente un 8-30 % y mucho más especialmente un 10-20 %). Esto puede explicar por qué algunos ARNbc se adsorben en la superficie.

10 La fórmula general (1) también puede escribirse como la fórmula (2):



15 en la que X es uno o más aniones o material con carga negativa para equilibrar la carga en la capa de hidróxido. X está presente normalmente en el espacio entre capas en el material de HDC. Puede haber presente una porción limitada de X en la superficie de las partículas de HDC (por ejemplo, un 5-40 %, más especialmente un 8-30 % y mucho más especialmente un 10-20 %). Esto puede explicar por qué algunos ARNbc se adsorben en la superficie.

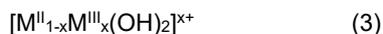
20 M^{II} es convenientemente Mg, aunque también pueden usarse otros iones metálicos de valencia 2+. M^{III} es convenientemente Al. Se apreciará que también pueden usarse otros iones metálicos de valencia 3+. Los ejemplos de otros iones metálicos que pueden usarse incluyen:

M^{II} : Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mn, Pd, Ti, Cd y Ca
 M^{III} : Co, Fe, Mn, Ga, Rh, Ru, Cr, V, In, Y, Gd, Ni y La.

25 Estas listas no deben considerarse limitantes.

Los aniones de ejemplo de las fórmulas (1) o (2) (es decir, A^{n-} o X) incluyen, pero sin limitación, $(CO_3)^{2-}$, $(SO_4)^{2-}$, Cl^- , OH^- , S^{2-} y $[Sb(OH)_6]^-$.

30 El HDC puede incluir una capa general de fórmula (3)



35 donde M^{II} , M^{III} y x son como se han definido anteriormente para las fórmulas (1) y (2), y la carga positiva $x+$ se equilibra mediante aniones (como se ha descrito anteriormente para las fórmulas (1) y (2)) que se intercalan entre las capas.

40 El HDC puede ser del grupo de hidrotalcita, el grupo de quintinita, el grupo de fougérita, el grupo de woodwardita, el grupo de cualstibita, el grupo de glaucocerinita, el grupo de wermlandita y el grupo de hidrocalumita; especialmente del grupo de hidrotalcita; más especialmente hidrotalcita ($Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$). El grupo de hidrotalcita es HDC de fórmula general (1), (2) o (3) en la que $M^{II}:M^{III}$ es 3:1 (especialmente en la que M^{II} es Mg y M^{III} es Al) con un espaciado de capa de 6,8 a 8,8 Å, especialmente de 7,3 a 8,3 Å, más especialmente de 7,6 a 8,0 Å, más especialmente de aproximadamente 7,8 Å. Un análisis sobre el grupo de hidrotalcita, el grupo de quintinita, el grupo de fougérita, el grupo de woodwardita, el grupo de cualstibita, el grupo de glaucocerinita, el grupo de wermlandita y el grupo de hidrocalumita puede encontrarse en Mills *et al.*, 2012. En otra realización, el HDC es de fórmula general (1), (2) o (3) en la que M^{II} es Mg y M^{III} es Al.

50 Se describen HDC de ejemplo y métodos para preparar HDC en la Patente Australiana N.º 2005318862. Ventajosamente, en el método que se describe en esta patente, el tamaño del HDC puede controlarse con precisión y el tratamiento hidrotermal puede dispersar los aglomerados de HDC en nanopartículas de HDC individuales.

55 Las partículas de HDC pueden tener una dimensión más grande dentro del intervalo de hasta 5 µm, más especialmente de hasta 1 µm, mucho más especialmente de hasta 750 nm o de hasta 500 nm. En una realización, las partículas de HDC pueden tener una dimensión más grande dentro del intervalo de 20-400 nm, más convenientemente de 40-300 nm o 50-200 nm, incluso más convenientemente de aproximadamente 120 nm, encontrándose el espesor de las partículas predominantemente dentro del intervalo de 5-40 nm, especialmente de 15-20 nm. Las partículas también pueden presentar una distribución de tamaño de partícula estrecha y las partículas pueden mostrar una distribución de tamaño de partícula del ± 20 % alrededor del tamaño promedio. Las partículas de HDC pueden tener una relación de aspecto que se encuentra dentro del intervalo de 5 a 10 (la "relación de aspecto" se refiere a la relación de la dimensión más grande de la partícula con respecto a su espesor o altura). Las partículas de HDC pueden combinarse para formar una capa promedio de 20-25 láminas cargadas positivamente.

60 En una realización, el ARNbc adsorbido en el HDC tiene una o más de las dimensiones, la distribución del tamaño de partícula o la relación de aspecto enumeradas anteriormente para las partículas de HDC. Las imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido han confirmado que la morfología de las partículas de HDC se mantiene sin cambios después de cargar ARNbc, como resultado de la adsorción de ARNbc.

La composición de iARN puede estar en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, la composición de iARN puede estar en forma de un sólido, pomada, gel, crema, polvo, pasta, suspensión, coloide, espuma o aerosol; especialmente una suspensión o un coloide. Las formas sólidas de la composición pueden incluir polvos finos, polvos, gránulos, microgránulos, píldoras, pastillas, comprimidos, películas cargadas (incluyendo recubrimientos de semillas) y similares, que pueden ser dispersables en agua ("humectables"). En una realización, la composición está en forma de un concentrado, especialmente un concentrado en forma de un coloide o suspensión.

En una realización, la composición es heterogénea, que comprende especialmente una fase sólida dispersa dentro de una fase fluida. La fase sólida puede comprender el ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido sobre partículas de HDC. La fase fluida puede ser, por ejemplo, un líquido, un gas o un sólido que fluye libremente, o una combinación de los mismos; especialmente un líquido; más especialmente un líquido acuoso; mucho más especialmente agua. El agua puede ser estéril o no estéril. La fase sólida puede dispersarse dentro de la fase fluida de cualquier manera adecuada. Esto dependerá de la naturaleza de la fase sólida y la fase fluida.

Dependiendo de la forma de la composición, la composición puede incluir una diversidad de otros agentes. Los agentes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes tipos de ingredientes: diluyentes, vehículos, excipientes, agentes de suspensión, agentes de aglomeración, bases, tampones, agentes amargantes, fragancias, conservantes, propelentes, agentes tixotrópicos, agentes anticongelantes y agentes colorantes. Pueden seleccionarse agentes adecuados por un experto.

La composición también puede incluir uno o más de otros principios activos. Un principio activo, como se define en el presente documento, es un ingrediente que proporciona beneficios a una planta. El principio activo puede ser, por ejemplo, un insecticida, un pesticida, un fungicida, un antibiótico, un repelente de insectos, un agente antiparasitario, un agente antivírico o un nematocida.

Cuando la composición está en forma de un coloide o suspensión, puede incluir partículas de ARNbc-HDC al 10 % p/p, especialmente hasta el 5 % p/p o hasta el 2 % p/p, incluso más especialmente aproximadamente el 1 % p/p, mucho más especialmente menos del 1 % p/p.

En otra realización, cuando la composición está en forma de un coloide o suspensión, puede incluir partículas de ARNbc-HDC a hasta 100 mg/l; especialmente hasta 50 mg/l; más especialmente hasta 20 mg/l o hasta 10 mg/l; mucho más especialmente menos de 10 mg/l. En una realización, la concentración de ARNbc-HDC en un coloide o suspensión es de 1-100 mg/l.

La composición puede formularse para la administración a la planta o a cualquier parte de la planta, de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, la composición puede formularse para la administración a las hojas, tallo, raíces, frutos, verduras, granos y/o legumbres de la planta. En una realización, la composición se formula para la administración a las hojas de la planta y es especialmente pulverizable sobre las hojas de la planta. La composición puede administrarse a la planta como una dosis medida. La composición puede formularse para la administración a la planta, por ejemplo, mediante pulverización, mediante cepillo o mediante otro aplicador.

La composición puede estar en forma de una suspensión, en cuyo caso la composición puede pulverizarse sobre la planta. La suspensión puede ser sustancialmente estable. Como se usa en el presente documento, una suspensión "sustancialmente estable" es una suspensión en la que, una vez formada, la fase sólida permanece suficientemente dispersa (es decir, no se agrega significativamente) en la fase fluida (especialmente una fase líquida, más especialmente agua) para que la suspensión se pulverice sobre una planta. En una realización, la fase sólida permanece dispersa en la fase fluida durante al menos 24 horas después de que se forma la suspensión, especialmente al menos 5 días después de que se forma la suspensión, más especialmente al menos 10, 15, 20 o 30 días después de que se forma la suspensión, mucho más especialmente al menos 60 días después de que se forma la suspensión. Si la suspensión no es sustancialmente estable, entonces la fase sólida puede agregarse conduciendo a bloqueos en el equipo cuando la suspensión se pulveriza sobre las plantas o, como alternativa, conduciendo a la aplicación de cantidades variables de material en fase sólida en un área dada, dando como resultado una protección incompleta para plantas.

Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que el ARNbc se adsorbe sobre el HDC a través del intercambio aniónico entre el ARNbc y los aniones en el HDC (de manera que las porciones catiónicas del HDC interactúen con los grupos fosfato aniónicos del ARNbc). Se cree que cuando el ARNbc se adsorbe sobre HDC, el ARNbc obtiene cierta protección contra las ARNasas y la luz UV y, por tanto, el ARNbc es significativamente más estable. Por tanto, se cree que el HDC actúa como un recubrimiento protector para el ARNbc adsorbido.

Ventajosamente, se ha descubierto que cuando el ARNbc se adsorbe sobre HDC, el ARNbc sustancialmente no se degrada, incluso cuando se almacena durante 60 días. Cuando el ARNbc se adsorbe sobre HDC, el HDC protege ventajosamente el ARNbc contra la ARNasa y la luz UV.

El ARNbc puede adsorberse sobre el HDC mediante cualquier método adecuado. Ventajosamente, un método para

adsorber el ARNbc sobre el HDC implica simplemente incubar el ARNbc con el HDC en una solución acuosa con agitación (por ejemplo, a de 100 a 300 rpm, especialmente a 200 rpm) y a una temperatura de 20 a 50 °C, especialmente de 25 a 45 °C o de 30 a 45 °C, mucho más especialmente aproximadamente 37 °C.

- 5 El ARNbc también puede adsorberse sobre el HDC a cualquier relación de carga adecuada. Las relaciones de carga (en masa) de ejemplo incluyen ARNbc:HDC de 2:1 a 1:20 o ARNbc:HDC de 1:1 a 1:10; más especialmente ARNbc:HDC de 1:1 a 1:6 o ARNbc:HDC de 1:1 a 1:5; mucho más especialmente ARNbc:HDC de 1:1 a 1:4, ARNbc:HDC de 1:1 a 1:2,5, ARNbc:HDC de 1:2 a 1:5 o ARNbc:HDC de 1:3 a 1:4. La relación de carga puede ser ARNbc:HDC 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:2,5, 1:3, 1:3,5 o 1:4.

10 Como se usa en el presente documento, el término "adsorbido" incluye tanto las circunstancias en las que el ARNbc se adsorbe sobre la superficie de una capa de HDC, como las circunstancias en las que el ARNbc se intercala entre las capas de HDC (lo que también implicaría inherentemente cierta adsorción).

- 15 Puede ser ventajoso cuando se prepara la composición para usar más ARNbc del que puede adsorberse en el HDC. Esto se debe a que si el ARNbc está completamente adsorbido en el HDC, entonces el ARNbc no puede no estar disponible inmediatamente en la planta; parte del HDC necesitaría descomponerse, o debe producirse algún intercambio aniónico (por ejemplo, a través de la captura de CO₂ y la conversión en HCO₃⁻/CO₃²⁻ para el intercambio aniónico), antes de que esté disponible cualquier ARNbc. Por tanto, mediante el uso de más ARNbc en la composición de lo que puede adsorberse en el HDC, la composición puede proporcionar protección inmediata a la planta después de la aplicación. En una realización, del 50 % al 95 % del ARNbc de la composición se adsorbe sobre el HDC (permitiendo que el resto esté disponible como ARNbc libre); especialmente del 60 % al 90 % del ARNbc de la composición se adsorbe sobre el HDC; más especialmente del 70 % al 80 % del ARNbc de la composición se adsorbe sobre el HDC. Como estimación aproximada, a una relación de masa de ARNbc:HDC de 1:10, la mayor parte del ARNbc se adsorbe en la superficie de HDC. Con una relación de masa de ARNbc:HDC de 1:5, aproximadamente el 50 % se adsorbe sobre la superficie de HDC, aproximadamente el 30-40 % se intercala y el 10-20 % está libre en solución.

30 Ventajosamente, la composición puede adaptarse para proporcionar una liberación controlada del ARNbc después de que se haya administrado a una planta. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, después de que las partículas de ARNbc:HDC se administran a la planta, las partículas pueden permanecer funcionalmente como un recubrimiento de superficie estable. A medida que las partículas interactúan con la humedad y el CO₂ de la planta y/o el entorno, la humedad y el CO₂ simultáneamente hidratan y activan el HDC. El HDC libera lentamente ARNbc a través de intercambio aniónico inverso y/o degradación del almacén de HDC. Por tanto, el ARNbc estará protegido de la degradación y proporcionará a la planta protección contra el organismo objetivo durante un período de tiempo más largo que el que se proporcionaría usando pulverizaciones de ARNbc "desnudo". Además, la humedad y el CO₂ que entren al sistema que podrían provocar la activación del patógeno hidratarán y activarán simultáneamente las partículas de HDC, proporcionando protección a la planta cuando más se necesita.

40 El ARNbc puede liberarse del HDC a un pH ácido, especialmente a un pH inferior a 6 o inferior a 5, más especialmente a un pH inferior a 4 o inferior a 3, mucho más especialmente a un pH inferior a 2. Ventajosamente, se cree que el CO₂ atmosférico se convertirá en ácido carbónico, reduciendo el pH y permitiendo la liberación lenta del ARNbc a través de intercambio aniónico inverso y/o degradación del almacén de HDC.

45 Ventajosamente, en algunas realizaciones de la presente invención, el HDC puede descomponerse en componentes biocompatibles (tales como Mg²⁺, Al(OH)₃ y NO₃⁻). Además, incluso si queda algo de HDC, por ejemplo, en una verdura en el momento del consumo, puede ser biocompatible. Por ejemplo, un HDC tal como la hidrotalcita (por ejemplo, Mg₆Al₂(OH)₁₆CO₃·4H₂O) es un fármaco antiulceroso comercial utilizado ampliamente. La hidrotalcita no es tóxica para la mayoría de las células de mamíferos a concentraciones de hasta 200 µg/ml y no produce ningún efecto secundario cuando se inyecta por vía intravenosa en ratas con 200 mg de hidrotalcita/kg. Por tanto, la toxicidad para las células vegetales y las células de la hoja por el HDC puede ser limitada.

50 En una realización, la composición, una vez administrada a una planta, es capaz de proteger la planta durante al menos 15 días, especialmente al menos 20 días, más especialmente al menos 25 días, mucho más especialmente al menos 30 días. En una realización adicional, la composición, una vez administrada a una planta, es capaz de proteger la planta durante de 2 a 8 semanas, especialmente de 3 a 6 semanas, mucho más especialmente de 4 a 5 semanas. Una vez administradas a una planta, las nanopartículas de HDC pueden degradarse a una velocidad del 10-30 % por semana, especialmente del 15-25 % por semana, más especialmente a una velocidad del 15-20 % por semana. La duración de la protección puede verse afectada, por ejemplo, por la cantidad de lluvia en la planta. Por tanto, en un clima más seco, se espera que la duración de la protección aumente, mientras que puede proporcionarse una duración de la protección menor en un clima más húmedo.

60 En una realización, cuando el ARNbc:HDC se administra a una planta, es capaz de proporcionar un aumento de 2 a 10 veces en la duración de la protección de la planta (especialmente de 4 a 8 veces, más especialmente de 5 a 7 veces, mucho más especialmente de al menos 6 veces) sobre el uso del ARNbc solo.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para proteger una planta, comprendiendo el método la etapa de administrar a una planta una composición de iARN que comprende ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido sobre partículas de HDC.

5 Las características del segundo aspecto de la presente invención pueden ser como se describen para el primer aspecto. En una realización, por ejemplo, la etapa de administrar a una planta una composición de iARN comprende pulverizar la composición de iARN sobre las hojas de la planta.

10 La composición también puede administrarse a la planta a cualquier concentración adecuada y, ventajosamente, el ARNbc de la composición puede ser eficaz a concentraciones relativamente bajas. En una realización, pueden administrarse menos de 100 µg de ARNbc por planta, especialmente menos de 50 µg, más especialmente menos de 40, 30, 20, 10 o 5 µg, mucho más especialmente menos de 1 µg o 0,5 µg de ARNbc por planta. Cuando la composición se administra a la hoja de la planta, pueden administrarse a la planta menos de 100 µg de ARNbc por hoja, especialmente se administran menos de 50 µg, más especialmente menos de 40, 30, 20, 10 o 5 µg, mucho más especialmente menos de 1 µg o 0,5 µg de ARNbc por hoja a la planta.

15 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona la composición del primer aspecto, cuando se aplica a una planta.

20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de iARN de protección de plantas, que comprende la etapa de adsorber ARN bicatenario de protección de plantas sobre partículas de HDC. En una realización, la composición está en forma de un coloide o suspensión. En esta realización, el ARNbc puede adsorberse sobre las partículas de HDC en una solución acuosa. El coloide/suspensión resultante puede ser sustancialmente estable y pulverizable sobre la planta.

25 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido sobre partículas de HDC.

30 En un sexto aspecto, la presente invención también proporciona un kit que comprende:

- (i) partículas de HDC; y
- (ii) ARN bicatenario de protección de plantas;

35 en el que el ARN bicatenario de protección de plantas es adsorbible sobre las partículas de HDC.

40 En una realización de este aspecto, las partículas de HDC y/o el ARN bicatenario de protección de plantas se proporcionan en forma sólida o líquida (especialmente acuosa). Las partículas de HDC y/o el ARNbc de protección de plantas, dependiendo de su forma, pueden incluir una diversidad de otros agentes. Los agentes de ejemplo incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes tipos de ingredientes: diluyentes, vehículos, excipientes, agentes de suspensión, agentes de aglomeración, bases, tampones, agentes amargantes, fragancias, conservantes, propelentes, agentes tixotrópicos, agentes anticongelantes y agentes colorantes. Pueden seleccionarse agentes adecuados por un experto.

45 El kit también puede incluir uno o más principios activos adicionales. Un principio activo, como se define en el presente documento, es un ingrediente que proporciona beneficios a una planta. El principio activo puede ser, por ejemplo, un insecticida, un pesticida, un fungicida, un antibiótico, un repelente de insectos, un agente antiparasitario, un agente antivírico o un nematocida.

50 Las características de los aspectos tercero a sexto de la presente invención pueden ser como se han descrito anteriormente para los aspectos primero y segundo.

Breve descripción de los dibujos

55 Se describirán diversas realizaciones de la invención con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

la Figura 1 es un diagrama que ilustra la carga y liberación de ARNbc sobre HDC;

la Figura 2 es un perfil de restricción de electroforesis en gel de construcciones de horquilla de NIa;

60 la Figura 3 es un perfil de digestión de restricción de electroforesis en gel de una construcción de horquilla de pGEM-GF;

la Figura 4 es una electroforesis en gel de agarosa de ARNbc de NIa e IR54 expresados *in vitro* e *in vivo*;

65 la Figura 5 es una electroforesis en gel de ARNbc GF transcrito *in vitro*;

- la Figura 6 es una transferencia puntual de ARN que muestra la hibridación de una sonda de DIG-oligonucleótido con ARNbc de Nla expresado a las 2 horas de exposición;
- 5 la Figura 7 es una transferencia puntual de ARN que muestra la hibridación específica de una sonda de DIG-oligonucleótido con ARNbc de IR54 expresado a los 45 minutos de exposición;
- la Figura 8 es una transferencia puntual de ARN que muestra la especificidad de secuencia de ARNbc GF con una sonda de DIG-oligonucleótido de GFP a los 45 minutos de exposición;
- 10 la Figura 9 ilustra la distribución de tamaños de nanopartículas de HDC por espectroscopía de correlación de fotones (ECP);
- la Figura 10(A) proporciona el patrón de difracción de rayos X de nanopartículas de HDC y la Figura 10(B) proporciona imágenes de microscopía de nanopartículas de HDC;
- 15 la Figura 11 proporciona la morfología de HDC cuando se pulveriza sobre la superficie de una hoja con un microscopio electrónico de barrido (MEB) y MEB-rayos X de energía dispersiva (XED);
- la Figura 12 proporciona un análisis por espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (EM-PAI) de la descomposición de HDC durante un período de dos semanas cuando se pulveriza sobre una hoja simulada;
- 20 la Figura 13 proporciona el porcentaje de HDC restante después de la aplicación sobre hojas simuladas;
- la Figura 14 proporciona una electroforesis en gel que ilustra las relaciones de masa de carga de 500 ng de ARNbc de control sobre nanopartículas de HDC;
- 25 la Figura 15 proporciona una electroforesis en gel que ilustra la relación de masa de carga de 500 ng de ARNbc de Nla (533 pb) sobre nanopartículas de HDC;
- 30 la Figura 16 proporciona una electroforesis en gel que ilustra las relaciones de masa de carga de 500 ng de ARNbc de IR54 (997 pb) sobre nanopartículas de HDC;
- la Figura 17 proporciona una electroforesis en gel que ilustra las relaciones de masa de carga de 500 ng de ARNbc de GF (391 pb) sobre nanopartículas de HDC;
- 35 la Figura 18 ilustra la lectura de pH de HDC cargado con ARNbc de control después de la adición de ácido nítrico y NaCl (pH 2,0);
- la Figura 19 ilustra el perfil de liberación de pH de HDC cargado con ARNbc de control 1:3;
- 40 la Figura 20 proporciona una electroforesis en gel de liberación de ácido nítrico (pH 2,0) de diversos ARN bicatenarios de HDC;
- la Figura 21 proporciona una electroforesis en gel que ilustra la estabilidad de HDC cargado con ARNbc;
- 45 la Figura 22 proporciona una electroforesis en gel que ilustra la capacidad de HDC para proteger el ARNbc de factores ambientales perjudiciales (tales como ARNasa y luz UV);
- la Figura 23 proporciona fotografías de *N. tabacum* cv Xanthi nc hipersensible fotografiado 3 días después de la inoculación con VMoLP;
- 50 la Figura 24 proporciona un análisis por transferencia Northern de ARNbc de IR54 o ARNbc de IR54 cargados sobre HDC con el tiempo cuando se aplican a una hoja;
- 55 la Figura 25 proporciona fotografías de *N. tabacum* cv. Xanthi que se ha pulverizado con agua (fotos de VMoLP) o ARNbc de IR54 (fotos de ARN-arcilla) y después se expuso a VMoLP 0, 5, 10, 15 o 20 días después de la pulverización;
- la Figura 26 proporciona un gráfico que ilustra los resultados de detección por ELISA de VYP en plantas coinoculadas con VYP y otros agentes diversos; y
- 60 la Figura 27 proporciona un gráfico que ilustra los resultados de la detección por ELISA de VYP en plantas expuestas a VYP 3 días después de la pulverización otros agentes diversos.
- 65 Las características, realizaciones y variaciones preferidas de la invención pueden distinguirse de los siguientes Ejemplos que proporcionan información suficiente para que los expertos en la materia realicen la invención. Los

siguientes Ejemplos no han de considerarse limitantes del alcance del Sumario anterior de la Invención de ninguna manera.

Ejemplos

5 *Objetivos utilizados para la aplicación tópica de ARNbc*

Los objetivos utilizados fueron:

- 10 • Virus Y de la patata (VYP) - La horquilla de Inclusión de Nucleasa a (Nla) se diseñó y se sometió a ensayo anteriormente por el Laboratorio Mitter (La Universidad de Queensland) (Mitter *et al.*, 2003, Mitter *et al.*, 2006, Mitter y Dietzgen, 2012) y consiste en un intrón de peroxidasa de tabaco de 446 pb flanqueado por fragmentos de 735 pb del gen de VYP sentido y antisentido clonado por Nla en el vector binario pART7 (Gleave, 1992) que no codifica los elementos promotores T7 necesarios para la expresión de una horquilla de ARN. La secuencia parcial de Nla utilizada para expresar el ARNbc tenía 533 pb. Esta secuencia se proporciona a continuación y en la SEQ ID NO:1.
- 15

CCATGGAGGTGCGATCTATGCACGGTACATTCAGGGTGAAGAATCTACGCAGTT
TGAGCGTTCTGCCAATTAAGGTAGGGATATCATCCTCATCAAAATGCCGAAAG

ATTTCCCTGTCTTTCCACAGAAATTGCATTTCCGAGCTCCAACACAGAATGAAA
GAGTTTGTTTAGTTGGAACCAACTTTCAGGAGAAGTATGCATCGTCGATCATCA
CAGAGACAAGCACCCTTACAATATACCGGGCAGCACATTCTGGAAGCATTGG
ATTGAAACAGATAATGGACATTGTGGACTACCAGTGGTGAGTACCACCGATGGA
TGTCTAGTCGGAATCCACAGTTTGGCAAACAACAGACACACCACGAACTACTAC
TCAGCCTTCGATGAAGATTTTGAAAGCAAGTATCTCCGAACCAATGAGCACAAT
GAATGGGTCAAGTCTTGGATTTATAATCCAGACACAGTGTTGTGGGGCCCGTTG
AAACTTAAAGACAGCACTCCCAAAGGATTATTCAAGACAACAAAGCTT

- 20 • Virus del moteado leve del pimiento (VMoLP) - La construcción pGEM-IR54 en la cepa bacteriana HT115 (DE3) fue un obsequio amable de F. Tenllado, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, España. La horquilla de ARN de IR54 se dirige a una región de 997 pb del gen de replicasa de VMoLP (Tenllado *et al.*, 2003). La secuencia utilizada para expresar el ARNbc se proporciona a continuación y en la SEQ ID NO: 2.

GTCGACTCAATAGCAATTACAGATAGAATCGGTGTACAAAGGTGTTAACCTTTT
 CGTCGCAGCACCAAAAACAGGAGATGTTTCTGACATGCAATATTATTACGACAA
 GTGTTTGCCGGGAAACAGTACTATACTCAATGAGTATGATGCTGTAACCTATGCA
 AATACGAGAGAATAGTTTGAATGTCAAGGATTGTGTGTTGGATATGTCGAAATC
 GGTGCCTCTTCCGAGAGAATCTGAGACGACATTGAAACCTGTGATCAGGACTGC
 TGCTGAAAAACCTCGAAAACCTGGATTGTTGGAAAATTTGGTCGCGATGATCAA
 AAGAAATTTCAACTCTCCCGAATTAGTAGGGGTTGTTGACATCGAAGACACCGC
 TTCTCTAGTAGTAGATAAGTTTTTTGATGCATACTTAATTAAGAAAAGAAAA
 ACCAAAAATATACCTCTGCTTTCAAGGGCGAGTTTGGAAAGATGGATCGAAAA
 GCAAGAGAAGTCAACAATTGGCCAGTTGGCTGATTTTGACTTTATTGATTTACC
 AGCCGTTGATCAATACAGGCACATGATCAAGCAGCAGCCGAAACAGCGTTTGG
 ATCTTAGTATTCAAACCTGAATACCCGGCTTTGCAAACCTATTGTGTATCATAGCAA
 GAAAATCAATGCGCTTTTTGGTCCTGTATTTTCAGAATTAACAAGACAGCTGCTA
 GAGACAATTGACAGTTCAAGATTCATGTTTTATACAAGGAAAACGCCTACACAG
 ATCGAAGAATTTTTCTCAGATCTGGACTCTAATGTTTCTATGGACATATTAGAGC
 TAGACATTTCCAAGTATGACAAATCACAGAACGAATTTATTGTGCAGTCGAGT
 ATGAGATTTGGAAAAGGTTAGGCTTAGACGATTTCTTGGCTGAAGTTTGGAAAC
 ACGGGCATCGGAAGACAACGTTGAAAGACTACACAGCCGGAATAAAAACGTGT
 TTGTG

- 5 • Proteína verde fluorescente (GFP) - La horquilla GF se diseñó y se sometió a ensayo anteriormente por el Laboratorio Carroll (La Universidad de Queensland) en la construcción de pUQC251 (Brosnan *et al.*, 2007). La horquilla de GF consiste en dos fragmentos de GF de 391 pb que se dirigen al extremo 5' del ARNm de GFP (S65T) que flanquea un espaciador de repetición invertido escindible por intrón (793 pb). La secuencia utilizada para expresar el ARNbc se proporciona a continuación y en la SEQ ID NO: 3.

GAATTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCGGTTACCAGGGTGTCCGCTCGAACTTC
 ACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAAGAAGATGGTGCCTCC
 TGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGG
 TCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTGAAGGTGGTCACGAGGGT
 GGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTT
 GCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCGTT
 TACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTC
 GCCCTTGGGTACC

- 10 • Control - Control del kit de iARN MEGAscript® (500 pb).

EJEMPLO 1 - CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE VECTORES DE ARNbc

- 15 *Construcción de vectores de expresión de ARNbc*

La horquilla de Nla se subclonó por digestión con endonucleasa de restricción *Nco* I en el sistema pGEM®-T Vector System I (Promega, Madison, WI, EE.UU.) usando la cepa JM109 de *E. coli* según protocolo del fabricante, generando una horquilla de pGEM-Nla. La horquilla de pGEM-Nla se secuenció con cebadores SP6 y T7 patrón (Tabla 1), a 9,6 pM con horquilla de pGEM-Nla 500-600 nM y se completó un volumen final de 12 µl con agua tratada con pirocarbonato de dietilo (DEPC). Se enviaron muestras al Centro Australiano de Investigación del Genoma (Brisbane, Australia) para la secuenciación por separación capilar. El fragmento de horquilla de Nla I escindido por *Nco* I también se subclonó en el vector L4440 como anteriormente, generando la construcción horquilla de L4440-Nla. El vector de horquilla de L4440-Nla se mantuvo y se propagó en la cepa Top10 de *E. coli* (One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E. coli*, (Life Technologies, Carlsbad, MA, EE.UU.)). La horquilla de GF se subclonó mediante digestión con endonucleasa de restricción *Eco* RI como anteriormente, excepto porque se mantuvo en One Shot® TOP10 Electrocomp *E. coli* según el manual de instrucciones en lugar de JM109. Los perfiles de restricción de todos los plásmidos se resolvieron en un gel de agarosa al 1 %. Todos los geles en este ejemplo se resolvieron con bromuro de etidio al 0,1 % 10 mg/ml, Tris 40 mM/ácido acético 20 mM/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM (1x TAE) a 60 V durante 1 hora.

Vectores de expresión de ARNbc de horquilla de Nla e IR54

La secuencia de horquilla de Nla con la expresión de uno o más promotores T7 se construyó mediante digestión por endonucleasa de restricción y ligadura para generar vectores de expresión de horquilla de pGEM-Nla y horquilla de L4440-Nla. Las construcciones resultantes mostraron el perfil de digestión de restricción correcto con *Nco* I de pGEM-T de 3.000 pb o vector L4440 de 2.800 pb y horquilla de Nla de 1.512 pb (Figura 2). En la Figura 2, la Calle 1 es L4440 digerido con *Nco* I (2.800 pb); la Calle 2 es pGEM-T digerido con *Nco* I (3.000 pb); la Calle 3 es una horquilla de Nla digerida con *Nco* I y extraída en gel (1.512 pb); la Calle 4 es una horquilla de L4440-Nla digerida con *Nco* I; la Calle 5 es una horquilla de pGEM-Nla digerida con *Nco* I; y M es una escalera de 1 kb+. La secuenciación y el análisis BLAST confirmaron que la secuencia de Nla era correcta en la horquilla de pGEM-Nla, que se usó para crear la horquilla de L4440-Nla.

El IR54 fue enviado amablemente como una horquilla de pGEM-IR54 por F. Tenllado, sin necesidad de ninguna alteración en el vector dirigido a VMolP.

Vector de expresión de ARNbc de horquilla de GF

La horquilla de GF se clonó en pGEM-T fácil a través de ligadura de pJQC251 y pGEM-T fácil procesados con enzimas de restricción. El plásmido de horquilla de pGEM-GF resultante mostró el perfil de restricción esperado de pGEM-T fácil de 3.000 pb y de horquilla de GF de 1.575 pb cuando se digirieron con *Eco* RI (Figura 3). En la Figura 3, la Calle 1 es pGEM-T fácil digerido con *Eco* RI (1.575 pb); la Calle 2 es una horquilla de GF digerida con *Eco* RI y extraída en gel (1.575 pb); la Calle 3 son digestiones por *Eco* RI de plásmidos de horquilla de pGEM-GF; y M es una escalera de 1 kb+.

Transcripción *in vitro* e *in vivo* de vectores de expresión de ARNbc

Transcripción *in vitro*: Los plásmidos de horquilla de pGEM-Nla, L4440-Nla, pGEM-IR54 y pGEM-GF se linealizaron con *Pvu* I y se purificaron con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para la transcripción *in vitro* usando el kit de iARN MEGAScript® (Life Technologies, Carlsbad, MA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante.

Transcripción *in vivo*: Los plásmidos se transformaron en la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) (*Caenorhabditis* Genetics Center, Minnesota, EE.UU.). Los protocolos de competencia química de CaCl₂ de células HT115, transformación e inducción utilizados se suministraron con las bacterias (Timmons y Fire, 2001). El ARN total se extrajo con el reactivo TRIzol® (Life Technologies, Carlsbad, MA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante y se trató con ADNasa I y ARNasa A en condiciones de alta sal (NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,030 M). El rendimiento promedio de ARNbc obtenido de HT115 fue de 0,5 mg/ml a partir de un cultivo iniciador de 100 ml.

Producción de ARNbc de Nla e IR54

Las horquillas de pGEM-Nla y de L4440-Nla se usaron para la expresión *in vitro* o *in vivo* que requiere transformación en la cepa de *E. coli* resistente a tetraciclina HT115 (DE3). El ARNbc derivado *in vitro* o *in vivo* resultante se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 4). En la Figura 4, la Calle 1 es una horquilla de pGEM-Nla expresada en HT115 (1 µl); la Calle 2 es una horquilla de pGEM-Nla expresada *in vitro* (0,5 µl); la Calle 3 es una horquilla de L4440-Nla expresada en HT115 (1 µl); la Calle 4 es una horquilla de L4440-Nla expresada *in vitro* (0,5 µl); la Calle 5 es una horquilla de pGEM-IR54 expresada en HT115 (1 µl); y M es una escalera de 1 kb+. Se obtuvieron mayores rendimientos por µl para la horquilla de pGEM-Nla y la horquilla de L4440-Nla transcritas *in vitro* (Calles 2 y 4), sin embargo, el kit solo produce 150 µl de ARNbc por reacción. El ARNbc de horquilla de pGEM-Nla expresado en HT115 no parecía expresar el ARNbc de Nla (Calle 1). La horquilla de L4440-Nla expresada en HT115 (Calle 3) produjo un volumen de 1 ml a una dilución 1:2 aproximada de transcrito *in vitro* (Calle 4).

Producción de ARNbc de GF

El vector de horquilla de pGEM-GF se usó para la transcripción *in vitro* y se transformó en HT115. Solo se expresó y se sometió a ensayo ARNbc de GF *in vitro* (Figura 5). En la Figura 5, la Calle 1 es ARNbc de control de kit transcrito *in vitro*; la Calle 2 es ARNbc de GF transcrito *in vitro* (391 pb); y M es una escalera de 1 kb+. Al igual que con otros ARNbc transcritos *in vitro*, se obtuvo un alto rendimiento (~1,5 µg/µl) del ARNbc de GF.

Detección de ARNbc

Se evaluaron ARNbc de Nla, IR54 y GF expresados *in vitro* o *in vivo* de los respectivos vectores mediante hibridación por transferencia puntual. El ARN bicatenario se colocó en membranas de nylon con carga positiva (Roche Applied Science, Basilea, Suiza), se reticuló con las membranas mediante la CÁMARA UV GS GENE LINKER™ (BIO-RAD Laboratories, Hércules, CA, EE.UU.) y se prehibridó en 10 ml de tampón de hibridación ULTRAhyb®-Oligo (Life Technologies, Carlsbad, MA, EE.UU.) durante 1 hora a 38 °C en una incubadora HyBaid Shake 'n' Stack. El ARNbc expresado se detectó usando sondas oligonucleotídicas (Tabla 1) y se marcó con DIG mediante el kit de marcado en el extremo 3' de oligonucleótidos DIG, 2^{da} generación (Roche Applied Science, Basel, Suiza). La señal quimioluminiscente se capturó desde 1 hora hasta 24 horas en Super RX (FujiFilm, Tokio, Japón) y se reveló mediante el procesador de película automático Okamoto X3 (KODAK, Rochester, NY, EE.UU.).

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos utilizadas

Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'3')	SEQ ID NO:
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	4
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	5
DIG de horquilla de Nla	TCAGGAGAAGTATGCATCGTC	6
DIG de horquilla de IR54	TGACATCGAAGACACCGCTTCT	7
DIG de horquilla de GF	GAAGAAGTCGTGCTGCTTCATG	8

Confirmación de ARNbc de Nla y IR54

Los ARNbc de Nla y IR54 expresados se analizaron para determinar la complementariedad con VYP o VMoLP mediante análisis por transferencia puntual usando sondas de oligonucleótido marcado con DIG específicas (Figuras 6 y 7). En la Figura 6, el Panel A es ARNbc de pGEM-Nla transcrito *in vitro*; el panel B es ARNbc de L4440-Nla inducido en HT115; el panel C es ARNbc de L4440-Nla transcrito *in vitro*; y el Panel D es ARNbc de pGEM-IR54 inducido en HT115. En la Figura 7, el panel A es ARNbc de IR54 inducido en HT115; y el Panel B es ARNbc de control de kit.

El ARNbc de Nla muestra hibridación con una sonda específica de VYP (Figura 6 A, B y C), mientras que el ARNbc de IR54 utilizado como control negativo no se une a la sonda de VYP (Figura 6 D). De manera similar, el ARNbc de IR54 sondeado con una sonda específica de VMoLP muestra una unión específica (Figura 7 A) mientras que el ARNbc de control negativo (del kit de iARN MEGAscript®) no muestra ninguna unión (Figura 7 B).

Confirmación de ARNbc de GF

Se sometió a ensayo ARNbc de GF expresado *in vitro* para determinar la complementariedad de secuencia mediante análisis de transferencia puntual de ARN (Figura 8). En la Figura 8, el Panel A es ARNbc de GF transcrito *in vitro*; y el Panel B es ARNbc de control. El ARNbc de GF se hibridó con la sonda de DIG-oligonucleótido específica de GFP (Figura 8 A), mientras que el ARNbc de control no muestra ninguna quimioluminiscencia (Figura 8 B).

EJEMPLO 2 - NANOPARTICULOS DE HIDRÓXIDO DOBLE EN CAPAS

Se preparó HDC a pequeña escala de fórmula $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ usando un método de coprecipitación no acuoso. Brevemente, se añadieron gota a gota 10 ml de solución de metanol que contenía $Mg(NO_3)_2$ 6 mM y $Al(NO_3)_3$ 2 mM a 40 ml de solución de metanol que contenía NaOH 16 mM con agitación vigorosa durante 10 minutos con burbujeo de N_2 . Después, la mezcla se trató a 100°C durante 16 horas. La suspensión se recogió y se lavó dos veces con 20 ml de agua desionizada mediante centrifugación y después se resuspendió en 40 ml de agua desionizada, dando como resultado una suspensión de HDC que contenía aproximadamente nanopartículas de Mg_3Al -HDC dispersadas homogéneamente 10 mg/ml (Chen *et al.*, 2013). Las características de las nanopartículas de HDC resultantes se proporcionan en la Tabla 2 y el tamaño de partícula, medido mediante Espectroscopía de Correlación de Fotones (ECP) usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern instruments, Worcestershire, Reino Unido), se ilustran en la Figura 9. Las nanoláminas de HDC se sintetizaron con una dimensión lateral promedio de 120 nm y un espesor de 15-20 nm, se combinaron entre sí para formar una capa promedio de 20-25 láminas cargadas positivamente (Figura 10). En la Figura 10, el Panel A es un patrón de difracción de rayos X (DRX) de nanopartículas de HDC y el Panel B es una imagen de microscopía electrónica de transmisión (MET) de nanopartículas de HDC.

Tabla 2: Características y propiedades físicas de las nanopartículas de HDC utilizadas en este estudio.

Z-Prom (d.nm)	IPd	Media de Intensidad	Media de número	Concentración de HDC
---------------	-----	---------------------	-----------------	----------------------

		(d.nm)	(d.nm)	(mg/ml)
34,1	0,217	44,20	12,11	10,55

Análisis de HDC después de la aplicación por pulverización sobre la superficie de una hoja

5 Para definir el mantenimiento de la morfología de HDC sobre las hojas, se pulverizó 1 ml de HDC sobre una hoja W38 de *Nicotiana tabacum* cv (W38) y se comparó con 1 ml de agua corriente para control. Las muestras se examinaron a través de un microscopio de barrido electrónico (MEB) y observación por MEB-rayos X de energía dispersiva (XED). La morfología del HDC se ilustra en la Figura 11. En esta Figura, el Panel A ilustra la hoja W38 pulverizada con agua bajo el MEB; el Panel B proporciona un espectro de microscopio electrónico de barrido - rayos X de energía dispersiva (MEB-XED) de la hoja pulverizada con agua; el panel C ilustra la hoja W38 pulverizada con HDC bajo el MEB (la flecha apunta a un posible agregado de HDC); y el Panel D proporciona un espectro de MEB-XED de hoja pulverizada con HDC, que muestra un rendimiento aumentado de iones de Mg y Al que indica la presencia de HDC.

10 Las nanoláminas de HDC formaron una suspensión uniforme cuando se disolvieron en agua y pudieron pulverizarse fácilmente sobre la hoja. No hubo ninguna diferencia visible a simple vista entre las hojas pulverizadas y sin pulverizar y la planta conservó todas las características de crecimiento normales.

Ensayo de espectrometría de masas con ICP para determinar la estabilidad de HDC

Estabilidad de HDC tras la aplicación sobre papel

20 Se realizó un análisis de descomposición de HDC en papel (una hoja sintética) durante un período de dos semanas. El papel utilizado se cortó en trozos de 7 cm². La suspensión de HDC (500 µl de HDC 10,55 mg/ml - 5,275 mg) o agua (500 µl) se extendió sobre el papel y se mantuvo en condiciones de invernadero. Las muestras se recogieron los días 0, 7 y 14. Las muestras se hirvieron en 10 ml de ácido nítrico. La ebullición se realizó hasta que quedaron aproximadamente 2 ml de un líquido de color amarillo pálido transparente. Las muestras se completaron hasta un volumen total de 10 ml con agua desionizada y se enviaron a los servicios forenses y científicos de CaSS (Brisbane, Australia) para el análisis por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (EM-PAI) de iones de magnesio (Mg) y aluminio (Al).

30 El análisis mostró una disminución gradual desde el valor basal durante el período de dos semanas (Figura 12 - las barras representan el error típico sobre la media). Como cabía esperar, el resultado basal fue de 49 mg l⁻¹ para Al (9,3 %) y 131,875 mg l⁻¹ para Mg (25 %). Estos resultados se usaron para calcular el porcentaje de HDC descompuesto durante el período de dos semanas (Figura 13 - Los resultados del análisis por EM-PAI se convirtieron en porcentaje restante; las barras representan el error típico sobre la media). En la primera semana se observó una caída del 18 %.

35 Se observó un 20 % adicional entre la primera y la segunda semana, lo que indica que el 62 % del HDC aplicado por vía tópica todavía permanecía sobre el papel después de dos semanas. Esto indica que el HDC se descompondrá completamente entre 4-5 semanas (aproximadamente 35 días).

Carga de ARNbc sobre HDC

40 Se sometieron a ensayo diferentes relaciones de masa para optimizar la unión completa de ARNbc a HDC. Se cargó HDC con ARNbc de control del kit de iARN MEGAscript® (ARNbc de control) (500 pb) incubando muestras a 37 °C durante 10 minutos con agitación (200 rpm). ARN bicatenario (500 ng): Las relaciones de masa de HDC (500 ng) se establecieron en 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:10 y se resolvieron en un gel de agarosa al 1 %. Se repitieron las relaciones de carga con ARNbc de N1a, IR54 y GF transcrito *in vitro*.

50 La capacidad de carga de HDC del ARNbc de control se ilustra en la Figura 14, del ARNbc de N1a *in vitro* en la Figura 15, del ARNbc de IR54 *in vitro* en la Figura 16 y del ARNbc de GF *in vitro* en la Figura 17 (en estas figuras M = escalera de 1kb+). La electroforesis en gel reveló que una vez que el ARNbc se carga sobre HDC, permanece en el pocillo y no migra, como puede observarse mediante fluorescencia en el pocillo, mientras que el ARNbc no unido migra al gel. Puede observarse un ejemplo de carga completa en la Figura 14 con relaciones de masa de 1:4 y superiores, mientras que puede observarse ARNbc unido y no unido para relaciones de 1:3 e inferiores. La carga completa varió ligeramente entre cada construcción, donde el ARNbc de control, el ARNbc de N1a de 533 pb y el ARNbc de IR54 de 997 pb se unieron completamente a una relación de masa de 1:4 (Figuras 14-16) mientras que el ARNbc de GF de 391 pb se unió completamente a HDC a una relación de masa de 1:3 (Figura 17).

Liberación de ARN bicatenario de nanopartículas de HDC

60 Como prueba de la unión de ARNbc a HDC, se realizó una liberación artificial rápida mezclando las nanopartículas de HDC de control cargadas con ARNbc (relación de ARNbc:HDC = 1:3) 10 µl de suspensión con 30 µl de NaCl 1 M durante 20 minutos para precipitar las nanopartículas de HDC unidas a ARNbc y libres en la solución y centrifugar a 14.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se retiró y se verificó en un gel de agarosa al 1 % para detectar la presencia/ausencia de ARNbc, mientras que el sedimento se resuspendió en soluciones con un pH de 1,0 a 14,0 preparadas con ácido nítrico y solución de NaOH. Las muestras se resolvieron en agarosa al 1 %. La liberación de

ARN bicatenario fue visible en la solución de pH 2,0, por lo que se realizó una lectura de pH de la reacción con fines matemáticos. Por tanto, se añadieron 5 ml de solución de $\text{NH}_3 + \text{NaCl}$ 1 M pH 2,0 a 2,5 ml de HDC 1000 ng/ μl y 5 ml de NaCl 1 M. El pH se leyó después de 0, 3, 10, 30 y 60 minutos.

5 La solución ácida inicial se neutralizó a medida que se descomponía el HDC (liberando iones Mg^{2+} , así como H_2O y $\text{Al}(\text{OH})_3$), como se ilustra en la Figura 18, en la que la medición inicial de pH de 3,9 cambió rápidamente en los primeros 2 minutos y se equilibró a pH 7,52 después de 1 hora. Este análisis muestra que el pH 2,0 debería liberar ARNbc, sin embargo, se analizó adicionalmente un perfil de pH que variaba de pH 1,0 a 14,0.

10 Se realizó un perfil de liberación de pH artificial de ARNbc de control:HDC 1:3 mediante la adición de NaCl para precipitar HDC unido y no unido a ARNbc de la solución. El sedimento se resuspendió en soluciones que variaban de pH 1,0 a 14,0 y se resolvió mediante electroforesis en gel inmediatamente o después de 1, 8 o 24 horas de incubación a temperatura ambiente (Figura 19). En la Figura 19, el Panel A ilustra la resolución inmediata de ARNbc-HDC después de la resuspensión en soluciones de pH (1,0-14,0); y el Panel B ilustra la resolución de ARNbc-HDC después de 24 horas de incubación en soluciones de pH (1,0-14,0) (M = escalera de 1kb+).

La resuspensión a un pH de 1,0 o 2,0 liberó inmediatamente ARNbc (Figura 19 A), mientras que la incubación de 24 horas en pH 3,0 también liberó ARNbc (Figura 19 B). No se observó liberación a pH alcalino. La resuspensión de ARNbc-HDC en pH 13,0 y pH 14,0 no se cargó en el pocillo de carga de gel de agarosa y, por tanto, no pudo resolverse.

20 La confirmación de la liberación de ARNbc del HDC también se realizó con ARNbc de Nla 1:3 transcrito *in vitro*, ARNbc de Nla expresado en HT115 y HDC cargado con ARNbc de IR54 usando la solución de pH 2,0. La liberación de este ARNbc se resolvió en un gel de agarosa al 1 % (Figura 20). En la Figura 20, la Calle 1 es un ARNbc de Nla transcrito *in vitro* liberado de HDC con solución de pH 2,0; la Calle 2 es ARNbc de Nla expresado en HT115 liberado de HDC con solución de pH 2,0; la Calle 3 es ARNbc de IR54 expresado en HT115 liberado de HDC con solución de pH 2,0; M = escalera de 1kb+.

Vida útil en el almacenamiento de nanopartículas de HDC cargadas con ARNbc

30 La estabilidad de dos conjuntos de nanopartículas cargadas con ARNbc 1:3 (ARNbc de control: HDC = 500 ng: 1500 ng) se sometió a ensayo por triplicado durante un período de 60 días cuando se almacenó en tubos de 1,5 ml. Las muestras se almacenaron en cuatro condiciones diferentes de luz u oscuridad y agua tratada con DEPC estéril o agua corriente no estéril. Se analizaron muestras estériles oscuras a los 0, 3, 7, 10, 20, 30 y 60 días. Se analizaron muestras no estériles claras y oscuras a los 1, 5, 10, 30 y 60 días, mientras que se analizaron muestras estériles claras a los 10, 30 y 60 días. Se liberó artificialmente un conjunto de HDC cargado con ARNbc 1:3 según lo anterior con pH 2,0. La estabilidad de las nanopartículas cargadas con ARNbc se evaluó mediante electroforesis en gel (gel de agarosa al 1 %).

40 Se descubrió que el ARNbc unido a HDC era estable incluso después del almacenamiento durante 60 días, independientemente de si el ARNbc unido a HDC se almacenó con agua estéril o no estéril o en condiciones de luz u oscuridad. No se observó degradación del ARNbc unido a HDC por electroforesis en gel (Figura 21). En la Figura 21, la Calle 1 es 500 ng frescos de ARNbc de Nla transcrito *in vitro*; la Calle 2 es 2,5 μg de HDC suspendido en agua no estéril y almacenado a la luz durante 60 días; la Calle 3 es ARNbc de Nla:HDC transcrito *in vitro* 1:5 suspendido en agua no estéril y almacenado a la luz durante 60 días; y M es la escalera de 1kb+.

Protección de ARNbc cargado en nanopartículas de HDC

50 Se examinó la capacidad de HDC para encapsular el ARNbc y protegerlo de factores ambientales perjudiciales (tales como ARNasa y luz UV). En este experimento, 2,5 μg de HDC, ARNbc de Nla "desnudo" expresado en HT115 (500 ng) y ARNbc de Nla:HDC 1:5: (i) se incubaron a 37 °C durante 20 min con 1 ng de ARNasa A; o (ii) se colocaron debajo de una lámpara UV durante 8 horas. La Figura 22 muestra que el tratamiento con ARNasa A degradó completamente el ARNbc de Nla "desnudo" (Figura 22, Calle 5), mientras que el ARNbc de Nla:HDC muestra protección (Figura 22, Calle 8). Las muestras expuestas a UV mostraron una degradación completa de ARNbc de Nla "desnudo" mientras quedaba algo de ARN degradado (Figura 22, Calle 6). El ARNbc de Nla:HDC expuesto a la luz UV (Figura 22, Calle 9) no mostró ninguna degradación en comparación con el ARNbc de Nla:HDC no tratado (Figura 22, Calle 7). En la Figura 22, la Calle 1 es HDC no tratado; la Calle 2 es HDC tratado con ARNasa A; la Calle 3 es HDC tratado con UV; la Calle 4 es ARNbc de Nla no tratado; la Calle 5 es ARNbc de Nla tratado con ARNasa A; la Calle 6 es ARNbc de Nla tratado con UV; la Calle 7 es ARNbc de Nla:HDC 1:5 no tratado; la Calle 8 es ARNbc de Nla:HDC 1:5 tratado con ARNasa A; la Calle 9 es ARNbc de Nla:HDC 1:5 tratado con UV; y M es una escalera de 1 kb+.

EJEMPLO 3 - APLICACIÓN TÓPICA DE ARNbc:HDC EN PLANTAS

Análisis de la aplicación por pulverización para tratamientos

65 Los siguientes experimentos requirieron la aplicación por pulverización de tratamientos (agua, ARNs, HDC o HDC cargado con ARNbc) sobre la hoja o la planta entera. Para cuantificar la cantidad de líquido liberado por pulverización,

se llenaron botellas con agua y se pulverizaron en recipientes de pesado. Se registró el peso por pulverización y se convirtió de g a ml.

Inóculo vírico para experimentos de exposición

5 El inóculo de VMoLP fue un obsequio amable del Dr. Geering, QAAFI como muestra de hoja infectada. El inóculo de VYP estaba disponible en el laboratorio Mitter. El inóculo vírico se multiplicó por inoculación mecánica en *N. benthamiana* o W38. Brevemente, las hojas infectadas se molieron en tampón de fosfato de potasio 5 mM, pH 7,5. Las hojas que se iban a inocular se espolvorearon con polvo de carborundo y después se frotaron suavemente con la savia molida que llevaba el virus. Los síntomas se registraron a los 3-15 días después de la inoculación (ppp).

ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)

15 El título de virus en las hojas inoculadas y sistémicas (hojas nuevas no inoculadas), según corresponda, se determinó mediante un kit de ELISA específico para cada virus (Agdia, Elkhart, IN, EE.UU.) según el protocolo del fabricante usando tres discos de 8 mm recogidos al azar de la muestra de hoja. Las placas se leyeron usando un lector de placas PowerWave Xs (Bio Tex, Winooski, VT, EE.UU.) a 405 nm. El valor de absorbancia se usó como indicador del título del virus.

20 *Experimentos de protección de VMoLP*

Coinoculación del virus VMoLP y pulverización de ARNbc de IR54

25 El inóculo vírico patrón utilizado fue un disco recortado de 8 mm de hoja de *N. benthamiana* infectada con VMoLP homogeneizada en 1 ml de tampón de fosfato de potasio 5 mM, diluido a 1:500 o 1:100.

30 Las hojas de *N. tabacum* hipersensible hospedador de lesión local cv. Xanthi nc se usaron para analizar la eficacia de ARNbc para silenciar la infección por VMoLP. Las hojas se expusieron a VMoLP solo en el lado izquierdo, mientras que el lado derecho se expuso a VMoLP después del tratamiento de ARNbc de IR54 "desnudo", HDC solo o ARNbc de IR54:HDC 1:2,5. La concentración de ARNbc utilizada fue de 1 µg por hoja. El inóculo vírico utilizado se diluyó a 1:100. Se usaron tres hojas para cada tratamiento, registrándose las lesiones víricas a 3 ppp.

35 Los resultados se proporcionan en la Figura 23 y la Tabla 3. En la Figura 23, la fotografía A es la mitad derecha de ARNbc de IR54 "desnudo" + VMoLP; la mitad izquierda es VMoLP solamente. La fotografía B es la mitad derecha HDC solamente + VMoLP; la mitad izquierda es VMoLP solamente. La fotografía C es la mitad derecha ARNbc de IR54:HDC 1:2,5 + VMoLP; la mitad izquierda es VMoLP solamente. Se observó que el ARNbc de IR54 "desnudo" redujo las lesiones en comparación con VMoLP solamente (Figura 23 A), mientras que HDC solo (Figura 23 B) no provocó mucha reducción (Tabla 3). El ARNbc de IR54:HDC muestra una ligera reducción en las lesiones locales pero requiere optimización (Figura 23 C).

40 Tabla 3: Número promedio de lesiones locales en un hospedador hipersensible infectado con VMoLP y tratado con ARNbc de IR54 y nanopartículas de HDC.

	VMoLP/ agua solamente	VMoLP/ VMoLP + ARNbc de IR54	VMoLP/ VMoLP + HDC	VMoLP/ VMoLP + ARNbc de IR54:HDC 1:2,5
N.º Promedio de lesiones	29/1	53/13	34/35	61/46

45 La estabilidad de ARNbc frente a ARNbc:HDC se sometió a ensayo en hojas de *Nicotiana tabacum* cv Xanthi. Las hojas se pulverizaron con ARNbc de IR54 "desnudo" y ARNbc de IR54:HDC 1:2 hasta un volumen total de 500 µl. La concentración de ARNbc utilizada fue de 1 µg por hoja. Las muestras se recogieron los días 0, 5, 10, 15 y 20 después de la pulverización y el ARN total se cargó en un gel de PAGE para análisis por transferencia Northern. El análisis por transferencia Northern de las hojas mostró que el ARNbc de IR54 "desnudo" se degradó casi por completo 10 días después de la pulverización. Por el contrario, el ARNbc de IR54:HDC era mucho más estable y todavía se detectó 20 días después de la pulverización (véase la Figura 24). En la Figura 24, + es ARNbc (control positivo) y - es hojas no pulverizadas (control negativo).

Experimento en el transcurso de tiempo para la protección de VMoLP

55 Se descubrió que la dilución 1:100 de VMoLP era demasiado concentrada, ya que las lesiones se unieron, lo que dificultaba contar las lesiones individuales (Figura 23). Como resultado, el análisis en el transcurso de tiempo usó una dilución 1:500 del inóculo que se aplicó sobre la hoja completa.

60 Las hojas del hospedador hipersensible *N. tabacum* cv. Xanthi nc se pulverizaron solo con agua o ARNbc de IR54:HDC 1:2 el día 0 y se inocularon con VMoLP los días 0, 5, 10, 15 y 20 después de la pulverización. La concentración de ARNbc utilizada fue de 1 µg por hoja. En este experimento, la relación de ARNbc:HDC utilizada fue de 1:2 ya que en

esa relación el ARNbc no se une completamente a HDC y, por tanto, parte de él estará disponible como ARNbc libre (Figura 16). Además, el inóculo utilizado se diluyó a 1:500. El experimento se realizó con tres hojas para cada tratamiento en cada punto temporal. Se fotografiaron las plantas y se contaron las lesiones locales a 6 ppp. El HDC solo no se sometió a ensayo, debido a la confirmación de que no hay protección contra VMoLP (Figura 23 B).

5 Se observó una reducción de las lesiones en hojas coinoculadas con ARNbc de IR54:HDC el día 0 (Figura 25). Puede hacerse una observación similar con hojas expuestas a VMoLP 5, 10, 15 y 20 días después de pulverizar ARNbc de IR54:ARNbc (Figura 25). El ARNbc de IR54 cargado con HDC fue capaz de proporcionar protección hasta 20 días después de la aplicación (Figura 25). En la Figura 25, el hospedador hipersensible *N. tabacum* cv Xanthi nc se exponea a VMoLP en los días 0, 5, 10, 15 y 20 de tratamiento. Todas las plantas se fotografiaron 6 días después de la inoculación con VMoLP.

Experimentos de protección frente a VYP

15 Co-inoculación del virus VYP y pulverización de ARNbc de NIa

El inóculo patrón utilizado fue un disco recortado de 8 mm de hoja W38 infectada con VYP homogeneizada en 1 ml de tampón de fosfato de potasio 5 mM, diluido a 1:1000.

20 Las hojas de W38 se trataron solo con agua, ARNbc de control:HDC 1:5 o ARNbc de NIa:HDC 1:5. Las plantas se expusieron a VYP el mismo día (Figura 26). La concentración de ARNbc fue de 500 ng por hoja. Se pulverizaron dos hojas en una sola planta con agua y ARNbc de control:HDC 1:5, mientras que dos hojas en dos plantas se pulverizaron con ARNbc de NIa:HDC 1:5. Tanto la hoja inoculada como una hoja apical o sistémica se analizaron mediante ELISA específico para VYP.

25 La Figura 26 proporciona los resultados de la detección por ELISA de VYP en plantas tratadas expuestas a VYP, ilustrando los resultados de la coinoculación de VYP y agua (Control de agua), ARNbc de control:HDC (ARNbc de control:HDC) y ARNbc de NIa:HDC 1:5 (ARNbc de NIa:HDC - Planta 1 y ARNbc de NIa:HDC - Planta 2).

30 Las plantas pulverizadas con ARNbc de NIa:HDC 1:5 y expuestas a VYP mostraron un título vírico reducido cuando se expusieron inmediatamente después de la pulverización y no se pudo detectar VYP el día 30 tanto en hojas inoculadas como sistémicas (Figura 26).

Experimento en el transcurso del tiempo para la protección contra VYP

35 Se pulverizaron plantas enteras en etapa de cuatro hojas con agua solamente, HDC solamente, ARNbc de NIa "desnudo" o ARNbc de NIa:HDC 1:2,5 el día 0. Se usó una concentración de 1 µg de ARNbc de NIa de HT115 por planta. Se usó una relación de carga de masa de ARNbc:HDC 1:2,5 para tener algo de ARNbc disponible inmediatamente después de la pulverización. Las plantas se inocularon con VYP (dilución 1:1000) 3 días después de la pulverización. El inóculo vírico diluido 1:1000 se inoculó mecánicamente sobre dos hojas. Se observaron síntomas de VYP y se recogieron muestras de ELISA a 10 y 20 ppp. Las plantas se cultivaron en condiciones de invernadero de una temperatura promedio de 25-26 °C (temperatura mínima de más de 23 °C y una temperatura máxima de menos de 29 °C (normalmente menos de 27 °C)).

45 Los resultados del experimento para dos plantas replicadas por tratamiento se proporcionan en la Figura 27. Se detectó VYP los días 10 y 20 en plantas pulverizadas con agua, HDC solamente y ARNbc de NIa "desnudo". Las plantas pulverizadas con ARNbc:HDC 1:2,5 y expuestas a VYP 3 días después, no registraron virus en hojas inoculadas o sistémicas (Figura 27). Estos resultados indican que el ARNbc de NIa "desnudo" se degradó en las hojas a los 3 días de aplicación, mientras que ARNbc de NIa: HDC protegió el ARNbc de NIa de la degradación y confirió resistencia al VYP.

50 En la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones (si es que aparece), la expresión "que comprende" y sus derivados que incluyen "comprende" y "comprenden" incluyen cada uno de los números enteros indicados pero no excluyen la inclusión de uno o más números enteros adicionales.

55 LISTA DE CITAS

60 Brosnan, C., N. Mitter, M. Christie, N. Smith, P. Waterhouse y B. Carroll, (2007) *Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 14741-14746.

Chen, M., H.M. Cooper, J.Z. Zhou, P.F. Bartlett y Z.P. Xu, (2013) *Reduction in the size of layered double hydroxide nanoparticles enhances the efficiency of siRNA delivery*. *of Colloid and Interface Science* 390: 275-281.

65 Gan, D., J. Zhang, H. Jiang, T. Jiang, S. Zhu y B. Cheng, (2010) *Bacterially expressed dsRNA protects maize against SCMV infection*. *Plant Cell Reports* 29: 1261-1268.

Gleave, A. P., (1992) *A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. Plant Molecular Biology* 20: 1203-1207.

5 Mills, S.J., A.G. Christy, J.-M.R. Génin, T. Kameda, y F. Colombo, (2012) *Nomenclature of the hydrotalcite supergroup: natural layered double hydroxides. Mineralogical Magazine* 76: 1289-1336.

Mitter, N. y R.G. Dietzgen, (2012) *Use of hairpin RNA constructs for engineering plant virus resistance. Methods Molecular Biology* 894: 191-208.

10 Mitter, N., R. Mitchell y R.G. Dietzgen, (2006) *Fate of hairpin transcript components during RNA silencing and its suppression in transgenic virus-resistant tobacco. Journal of Biotechnology* 126: 115-122.

15 Mitter, N., E. Sulistyowati y R.G. Dietzgen, (2003) *Cucumber mosaic virus infection transiently breaks dsRNA-induced transgenic immunity to Potato virus Y in tobacco. Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 936-944.

Tenllado, F. y J.R. Diaz-Ruiz, (2001) *Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. Journal Virology* 75: 12288-12297.

20 Tenllado, F., B. Martínez-García, M. Vargas y J.R. Diaz-Ruiz, (2003) *Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. Biomedicalcentral Biotechnology* 3: 3.

Timmons, L. y A. Fire, (2001) *Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in Caenorhabditis elegans. Gene* 263: 103-112.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> La Universidad de Queensland

30 <120> Composición

<130> 131408PC/DH

<150> AU2013905021

35 <151> 20-12-2013

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

40

<210> 1

<211> 533

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Nla

<400> 1

50

ES 2 751 497 T3

ccatggaggt gcgatctatg cacggtacat tcagggtgaa gaatctacgc agtttgagcg 60
 ttctgccaat taaaggtagg gatatcatcc tcatcaaaat gccgaaagat ttccctgtct 120
 ttccacagaa attgcatttc cgagctccaa cacagaatga aagagtttgt ttagttggaa 180
 ccaactttca ggagaagtat gcatcgtcga tcatcacaga gacaagcacc acttacaata 240
 taccgggcag cacattctgg aagcattgga ttgaaacaga taatggacat tgtggactac 300
 cagtggtgag taccaccgat ggatgtctag tcggaatcca cagtttgga aacaacagac 360
 acaccacgaa ctactactca gccttcgatg aagattttga aagcaagtat ctccgaacca 420
 atgagcacia tgaatgggtc aagtcttggg tttataatcc agacacagtg ttgtggggcc 480
 cgttgaaact taaagacagc actcccaaag gattattcaa gacaacaag ctt 533

5 <210> 2
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción pGEM-IR54

<400> 2

gtcgactcaa tagcaattac agatagaatc ggtgtacaaa ggtgttaacc ttttcgtcgc 60
 agcaccaaaa acaggagatg tttctgacat gcaatattat tacgacaagt gtttgccggg 120
 aaacagtact atactcaatg agtatgatgc tgtaactatg caaatacgag agaatagttt 180
 gaatgtcaag gattgtgtgt tggatatgtc gaaatcgggtg cctcttccga gagaatctga 240
 gacgacattg aaacctgtga tcaggactgc tgctgaaaaa cctcgaaaac ctggattggt 300
 ggaaaatttg gtcgcatga tcaaaagaaa tttcaactct cccgaattag taggggttgt 360

ES 2 751 497 T3

tgacatcgaa gacaccgctt ctctagtagt agataagttt tttgatgcat acttaattaa 420
 agaaaagaaa aaaccaaaaa atatacctct gctttcaagg gcgagtttg aaagatggat 480
 cgaaaagcaa gagaagtcaa caattggcca gttggctgat tttgacttta ttgatttacc 540
 agccgttgat caatacaggc acatgatcaa gcagcagccg aacacagcgtt tggatccttag 600
 tattcaaaact gaatacccg ctttgcaaac tattgtgtat catagcaaga aatcaatgc 660
 gctttttggt cctgtat tttt cagaattaac aagacagctg ctagagacaa ttgacagttc 720
 aagattcatg ttttatacaa ggaaaacgcc tacacagatc gaagaat tctcagatct 780
 ggactcta at gttcctatgg acatattaga gctagacatt tccaagtatg acaaatcaca 840
 gaacgaat ttt cattgtgcag tgcagtatga gatttggaaa aggttaggct tagacgattt 900
 cttggctgaa gtttggaaac acgggcatcg gaagacaacg ttgaaagact acacagccgg 960
 aataaaaacg tgtttgtg 978

5 <210> 3
 <211> 391
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> GFP
 <400> 3

gaattcgatg cccttcagct cgatgcggtt caccagggtg tgcacctcga acttcacctc 60
 ggcgcggggtc ttgtagttgc cgtcgtcctt gaagaagatg gtgcgctcct ggacgtagcc 120
 ttcgggcatg gcggacttga agaagtcgtg ctgcttcatg tggtcggggt agcggctgaa 180
 gcaactgcacg ccgtaggtga aggtggtcac gaggtggggc cagggcacgg gcagcttgcc 240
 ggtggtgcag atgaacttca gggtcagctt gccgtagggtg gcatcgccct cgcctcgc 300
 ggacacgctg aacttgtggc cgtttacgtc gccgtccagc tcgaccagga tgggcaccac 360
 cccggtgaac agctcctcgc ccttgggtac c 391

15 <210> 4
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> SP6

25 <400> 4
 atttaggtga cactatag 18

30 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 751 497 T3

	<220> <223> T7	
5	<400> 5 taatacgact cactataggg	20
10	<210> 6 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> DIG de horquilla de N1a <400> 6 tcaggagaag tatgcatcgt c	21
20	<210> 7 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> DIG de horquilla de IR54 <400> 7 tgacatcgaa gacaccgctt ct	22
30	<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> DIG de horquilla de GF <400> 8 gaagaagtcg tgctgcttca tg	22

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de interferencia de ARN (iARN) de protección de plantas que comprende ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido sobre partículas de hidróxido doble en capas (HDC), en la que la relación de carga en masa de ARN bicatenario de protección de plantas: hidróxido doble en capas es de 2:1 a 1:20.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que el ARN bicatenario de protección de plantas es capaz de proteger una planta contra un virus o viroide vegetal.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el ARN bicatenario de protección de plantas tiene una longitud de 80 a 1500 pares de bases.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el hidróxido doble en capas es del grupo de la hidrotalcita.
- 15 5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la composición está en forma de un sólido, suspensión o coloide.
- 20 6. La composición de la reivindicación 5, en la que la composición puede pulverizarse sobre las hojas de la planta.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la relación de carga en masa de ARN bicatenario de protección de plantas: hidróxido doble en capas es de 1:1 a 1:5.
- 25 8. Un método para proteger una planta, comprendiendo el método la etapa de administrar a una planta una composición de interferencia de ARN que comprende ARN bicatenario de protección de plantas adsorbido sobre partículas de hidróxido doble en capas, en la que la relación de carga en masa de ARN bicatenario de protección de plantas: hidróxido doble en capas es de 2:1 a 1:20.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en la que el ARN bicatenario de protección de plantas es capaz de proteger una planta contra un virus o viroide vegetal.
10. El método de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en la que el ARN bicatenario de protección de plantas tiene una longitud de 80 a 1500 pares de bases.
- 35 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en la que el hidróxido doble en capas es del grupo de la hidrotalcita.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en la que la composición está en forma de un sólido, suspensión o coloide.
- 40 13. El método de la reivindicación 12, en el que la etapa de administrar a una planta una composición de interferencia de ARN comprende pulverizar la composición de interferencia de ARN sobre las hojas de la planta.
- 45 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, en la que la relación de carga en masa de ARN bicatenario de protección de plantas: hidróxido doble en capas es de 1:1 a 1:5.
- 50 15. Un método para preparar una composición de interferencia de ARN de protección de plantas, que comprende la etapa de adsorber ARN bicatenario de protección de plantas sobre partículas de hidróxido doble en capas, en la que la relación de carga en masa de ARN bicatenario de protección de plantas: hidróxido doble en capas es de 2:1 a 1:20.

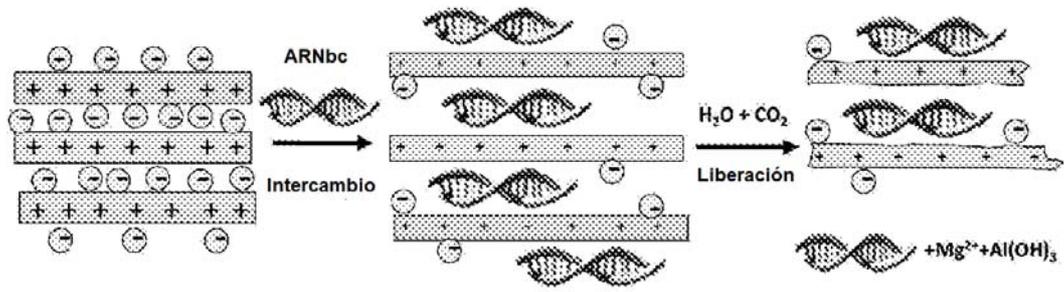


Figura 1

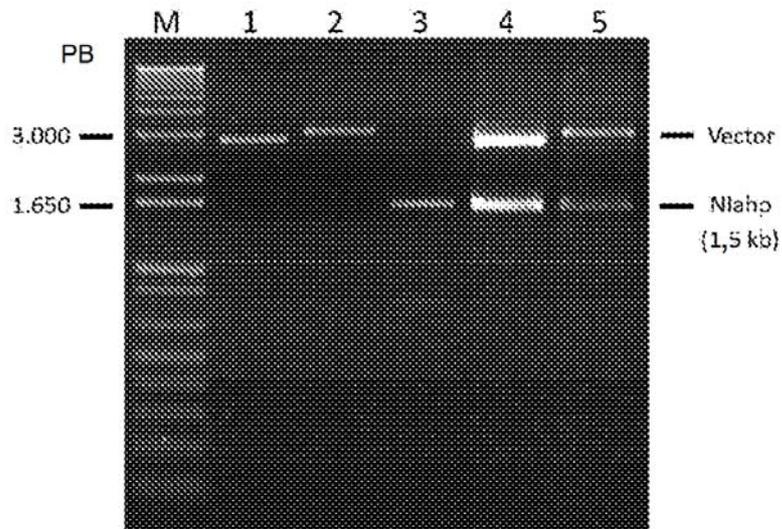


Figura 2

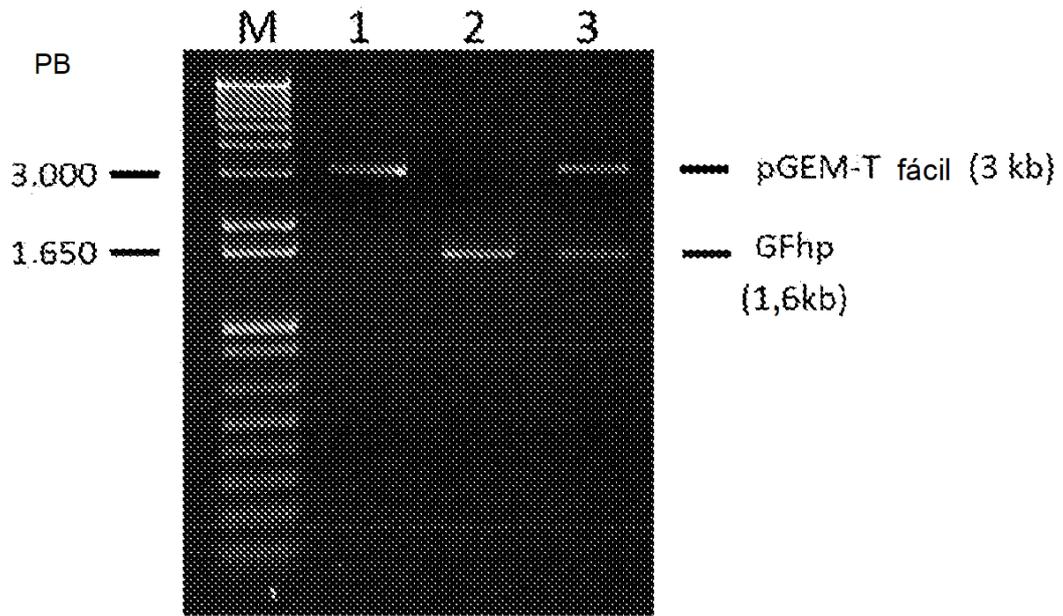


Figura 3

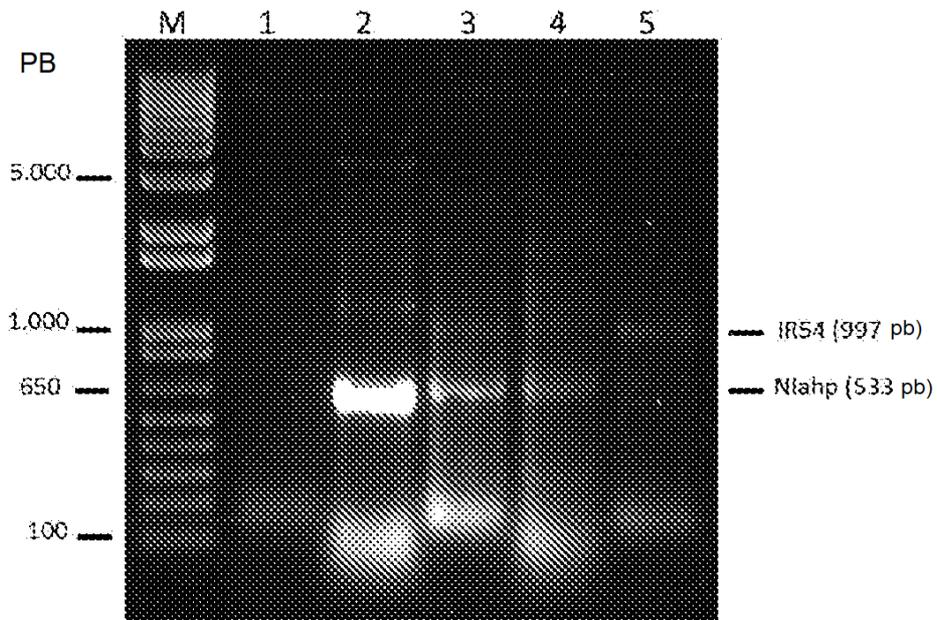


Figura 4

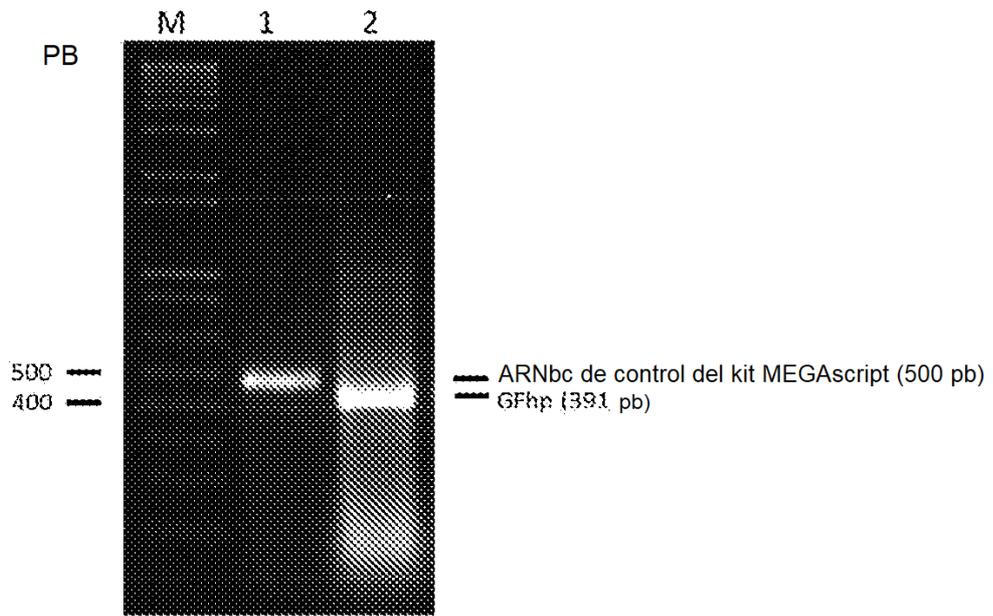


Figura 5

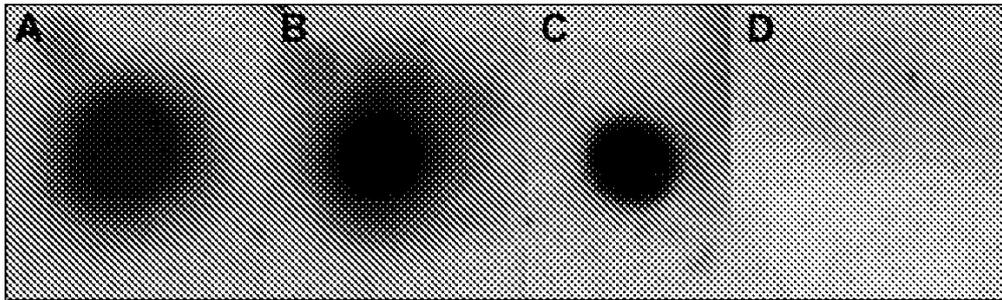


Figura 6

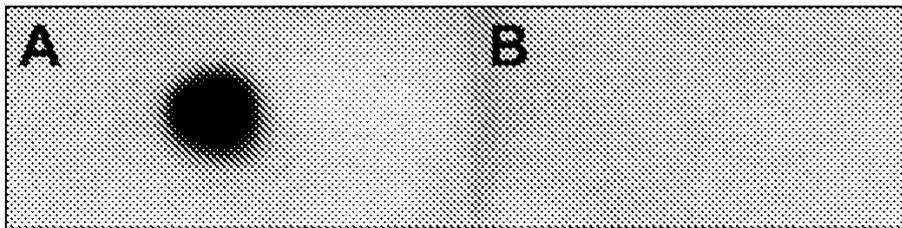


Figura 7

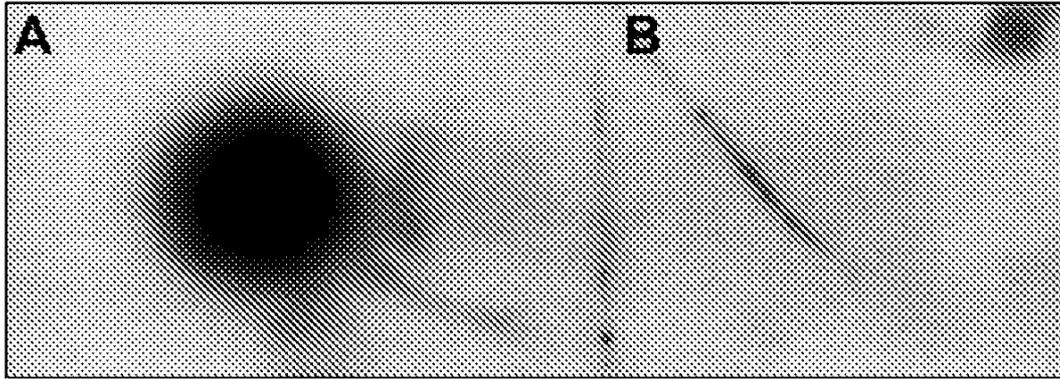


Figura 8

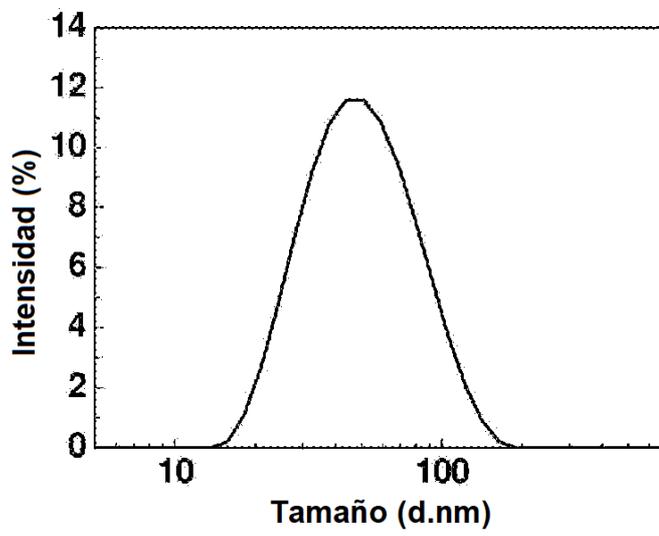


Figura 9

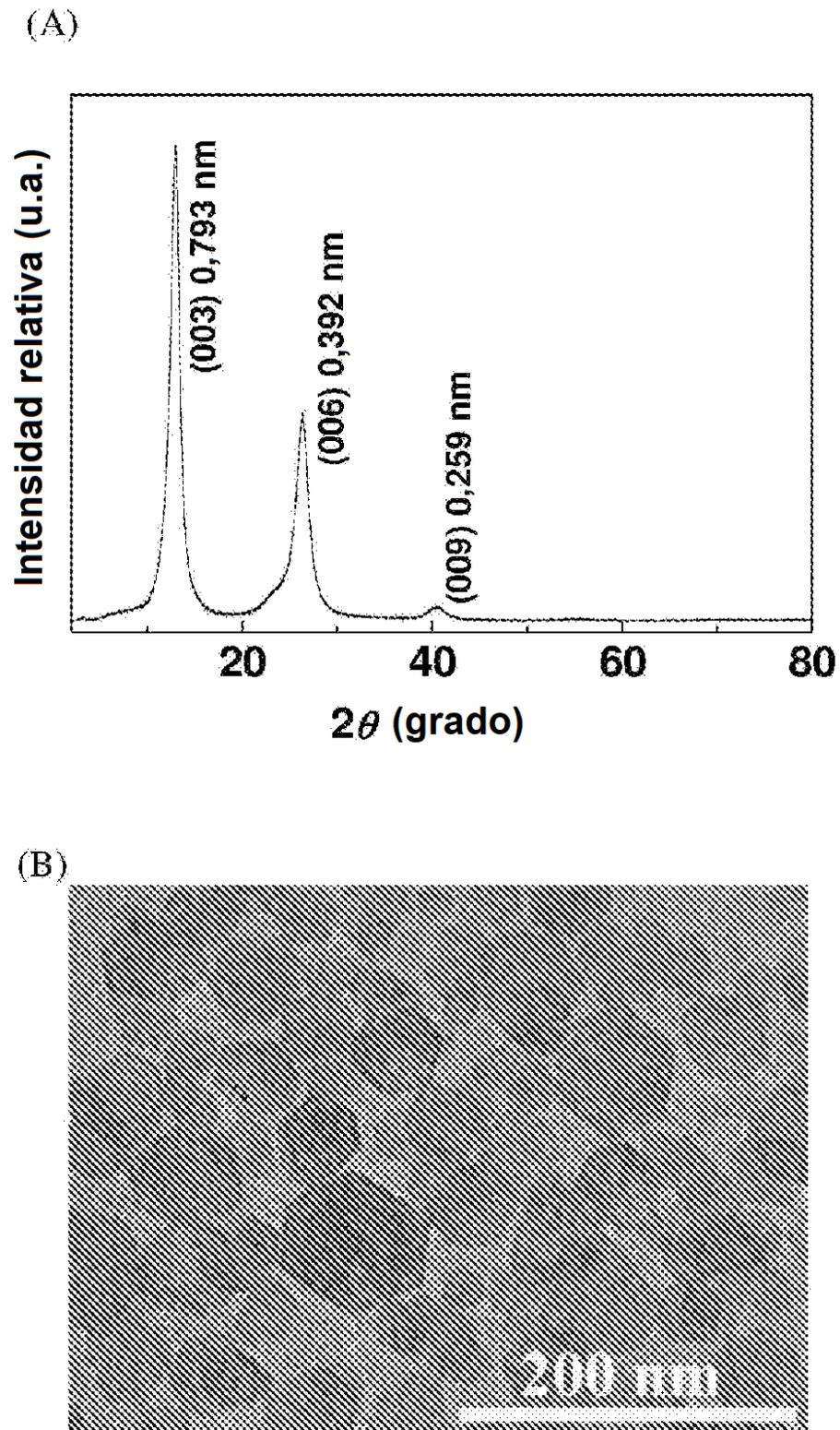


Figura 10

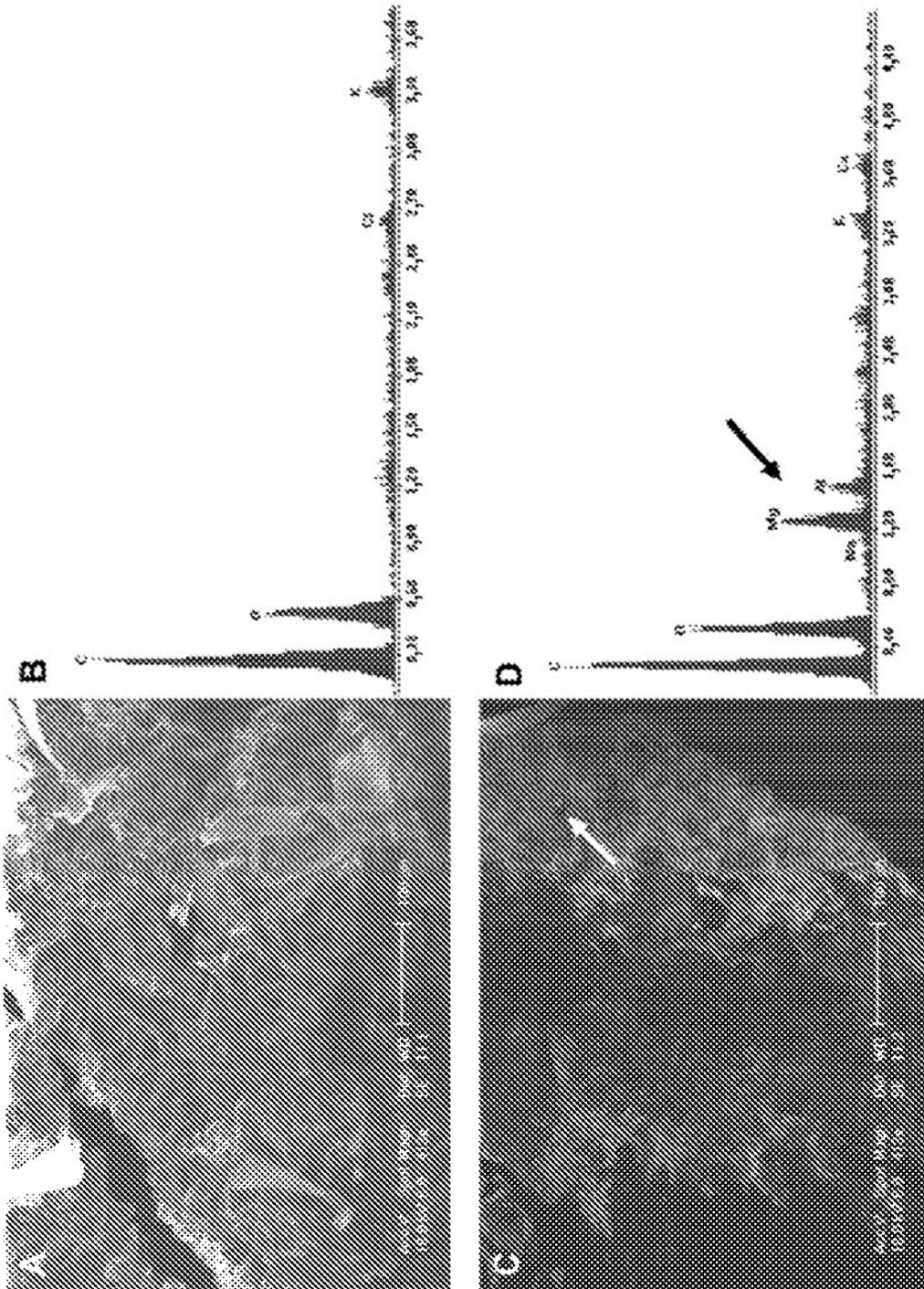


Figure 11

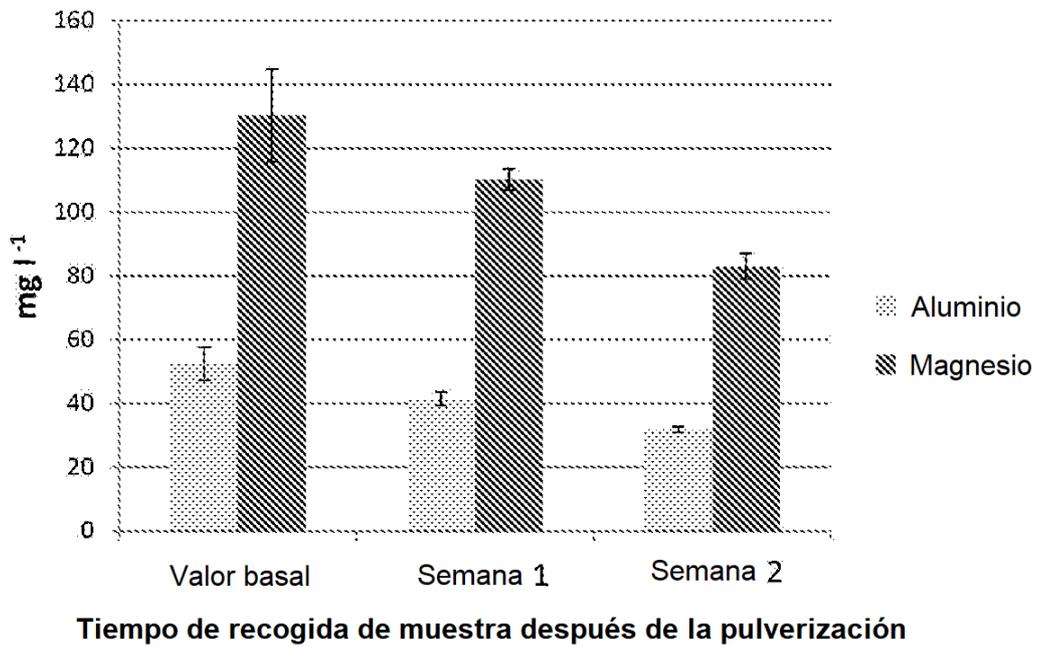


Figura 12

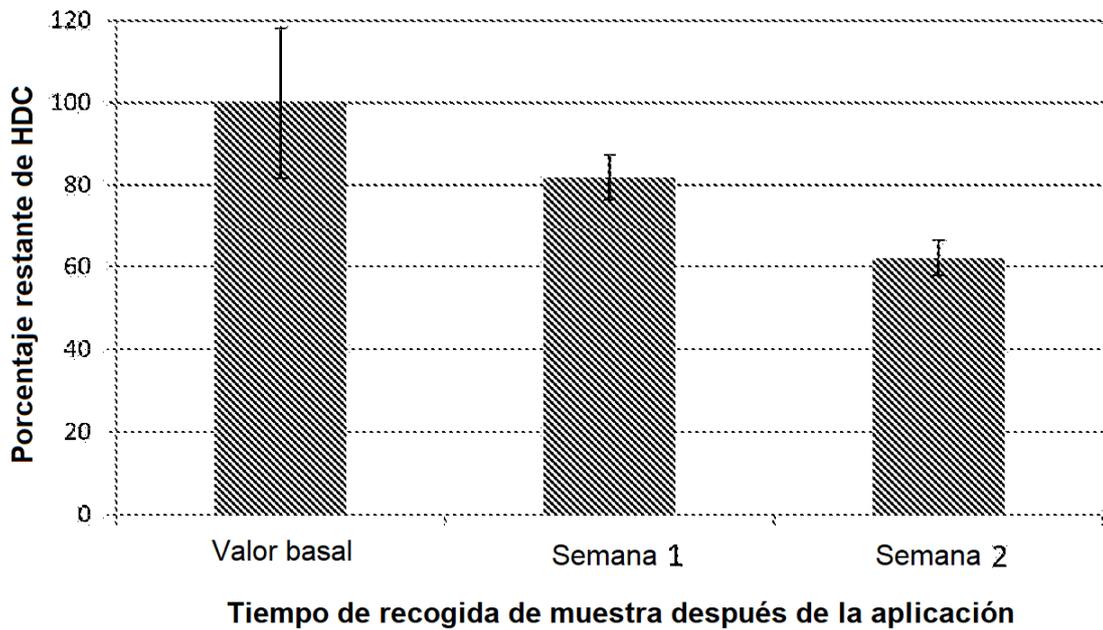


Figura 13

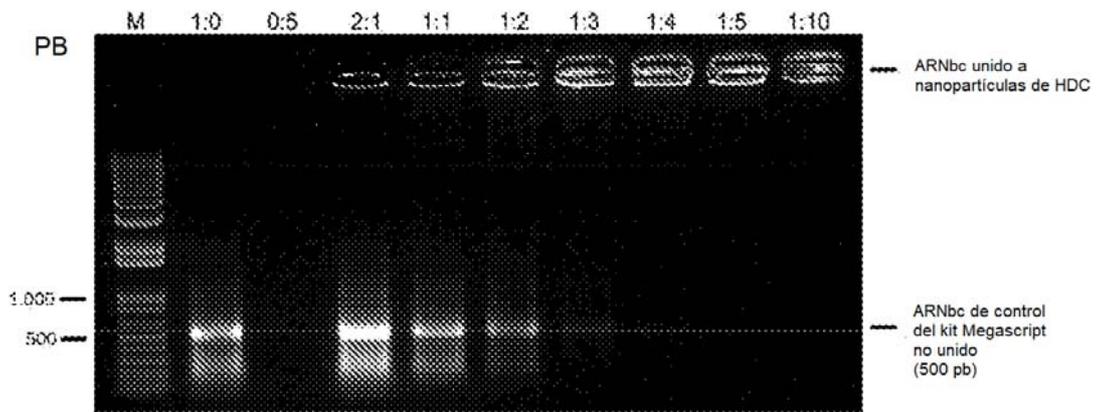


Figura 14

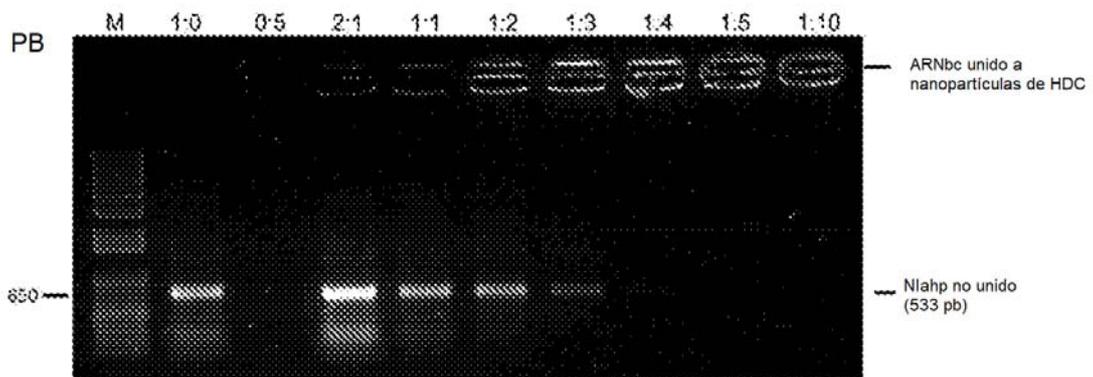


Figura 15

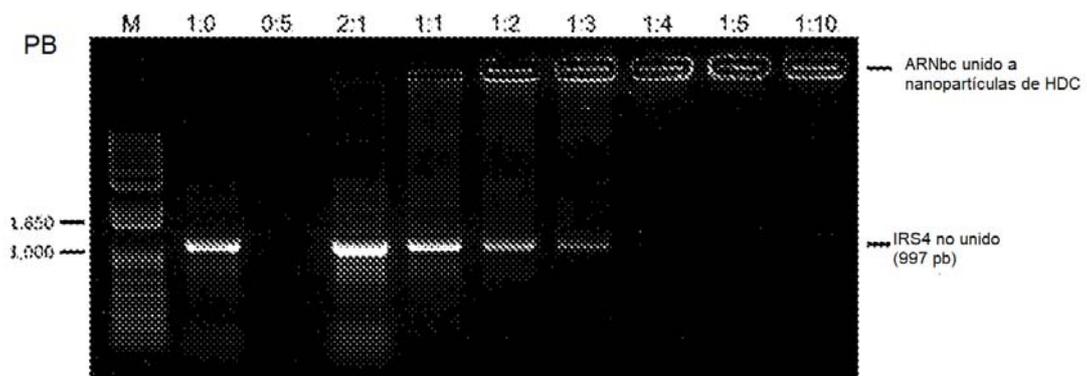


Figura 16

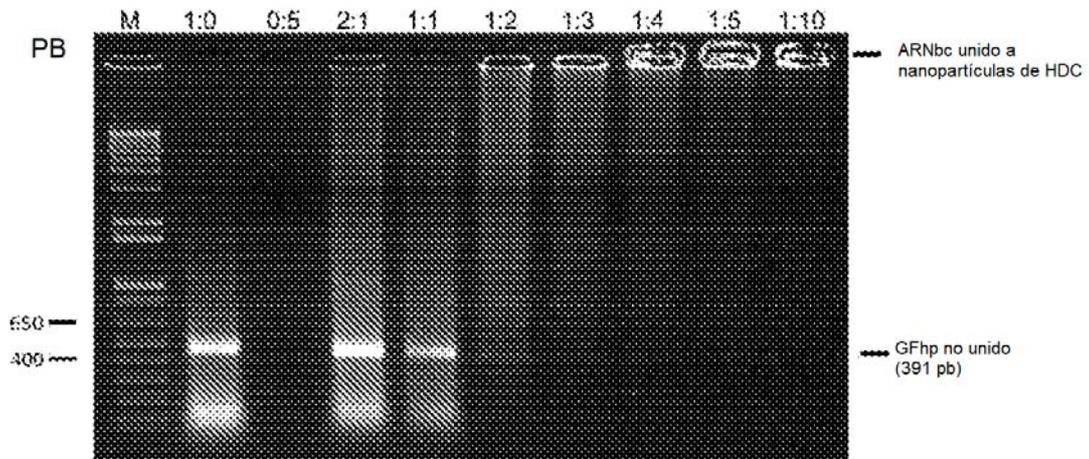


Figura 17

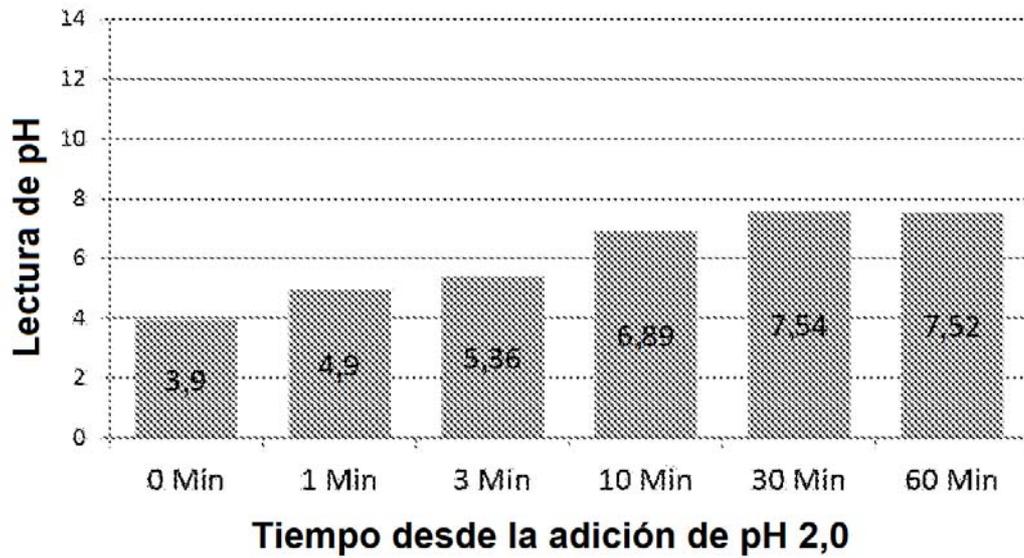


Figura 18

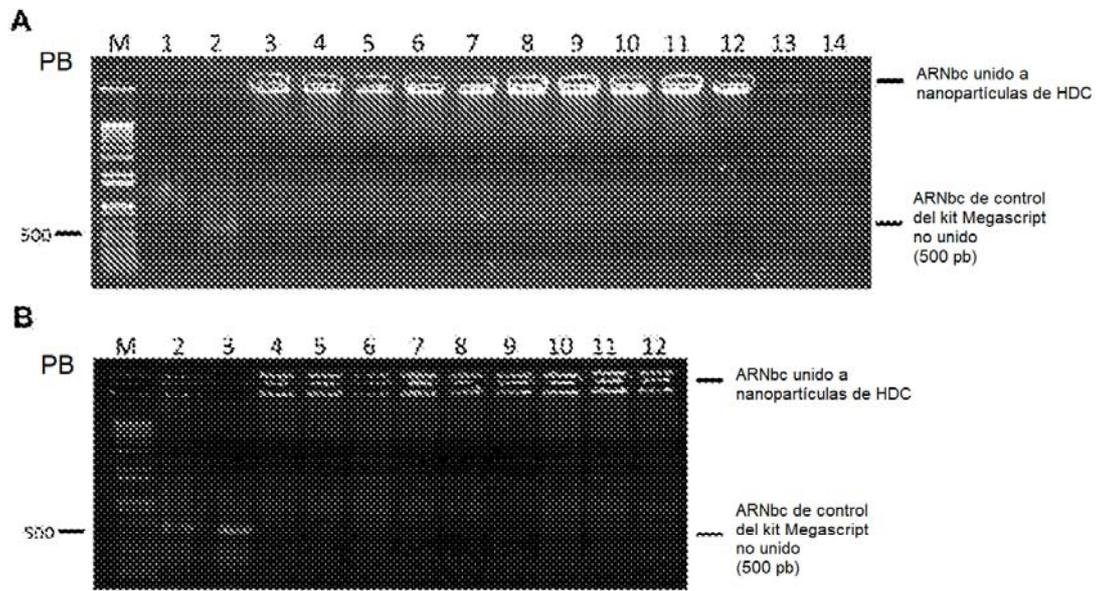


Figura 19

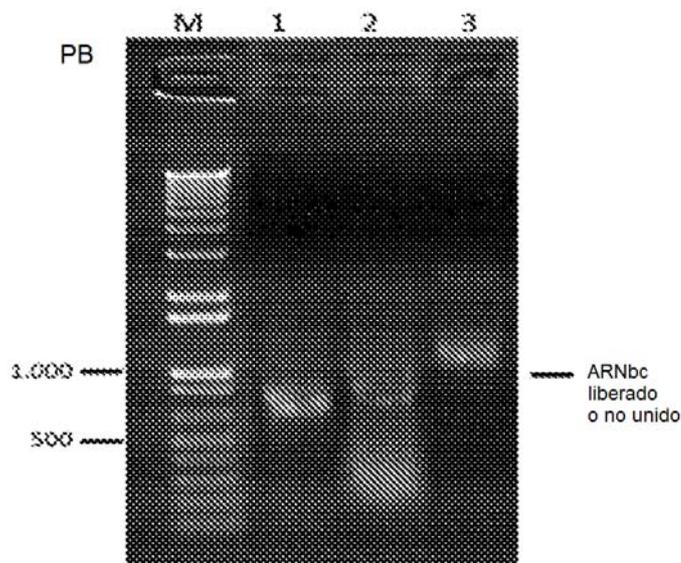


Figura 20

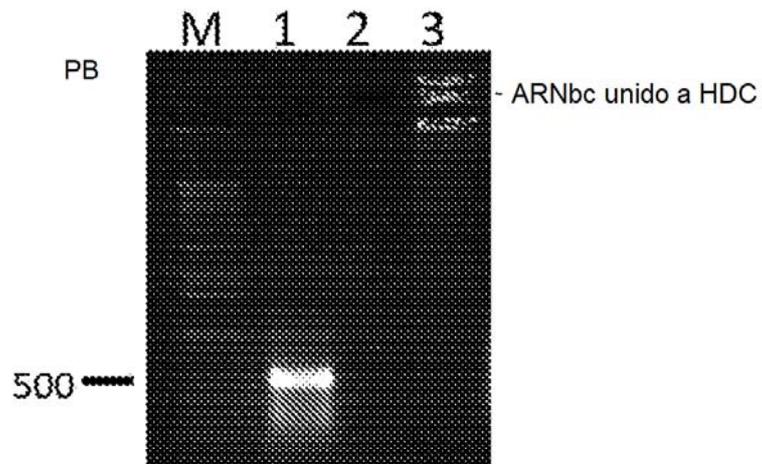


Figura 21

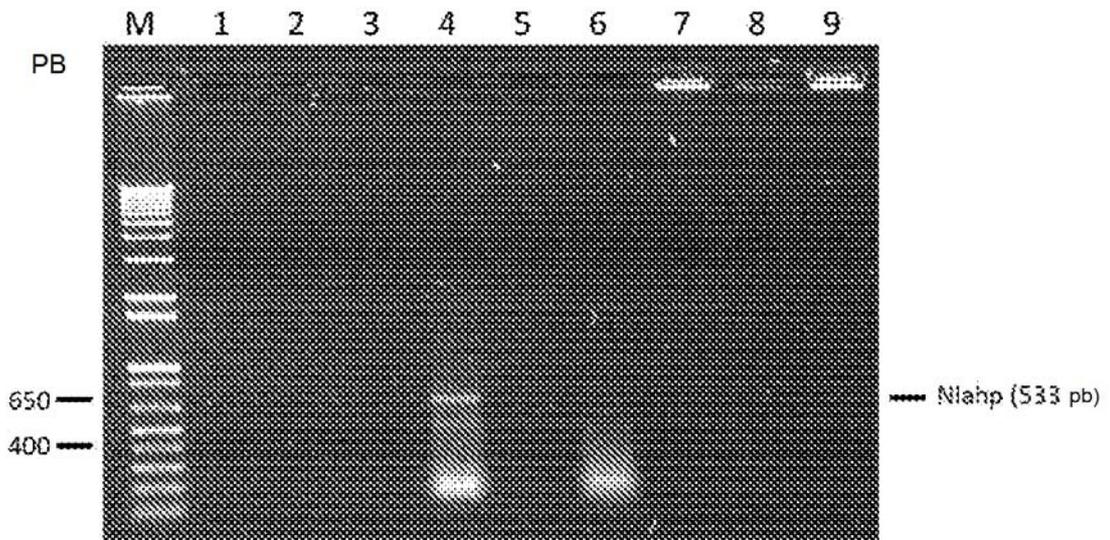


Figura 22

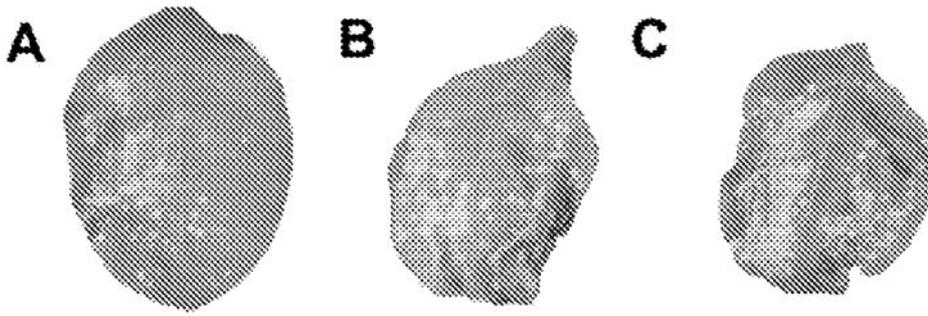


Figura 23

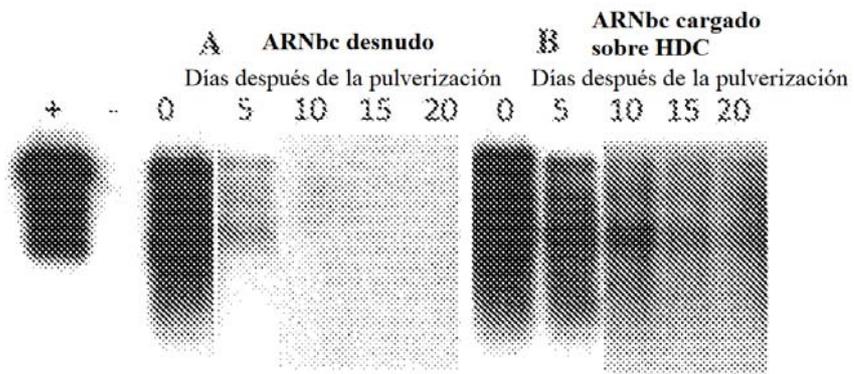


Figura 24



Figura 25

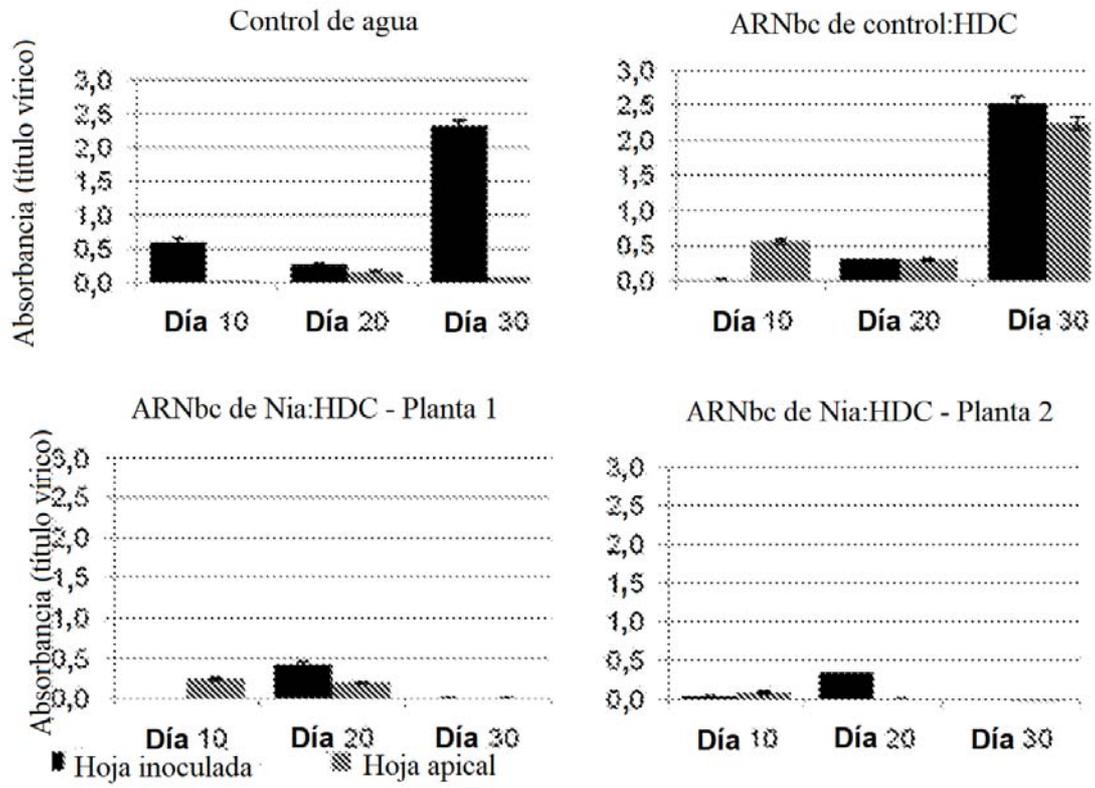


Figura 26

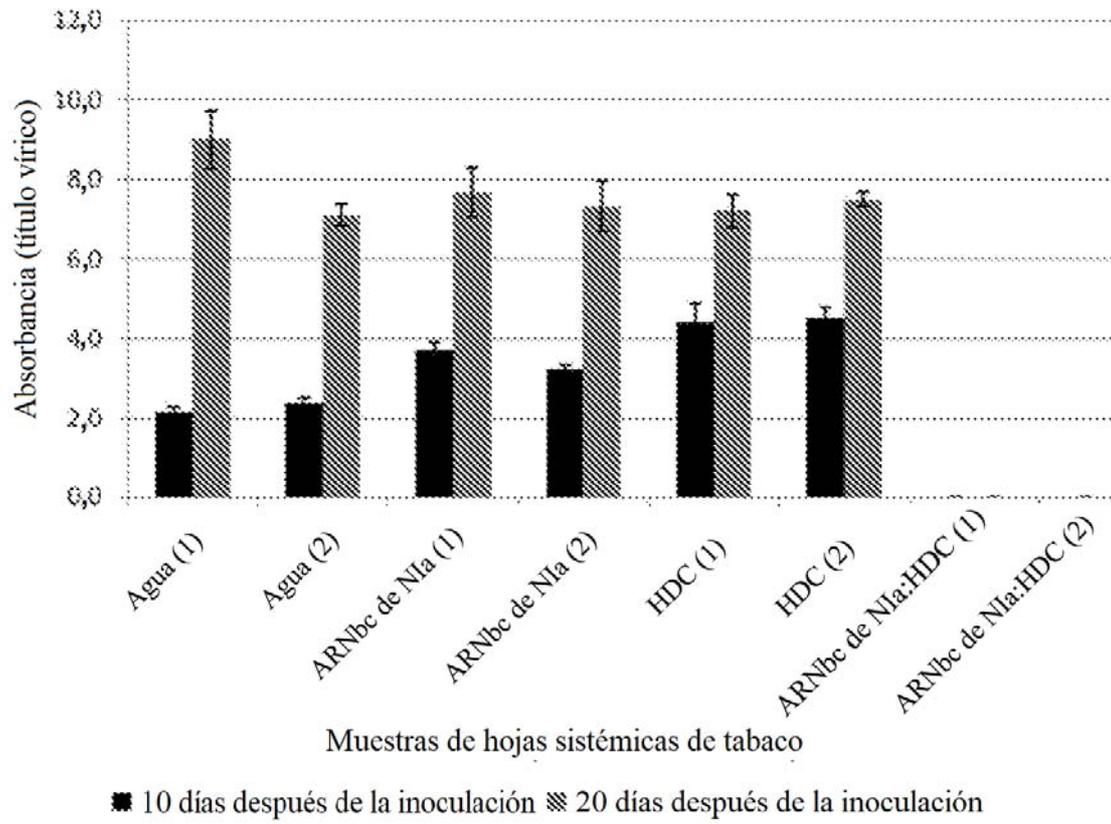


Figura 27