

P-12634

Nuevo capítulo reivindicatorio

Junio 20, 2018

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de polinucleótidos que comprende un primero y un segundo sistema de expresión génica, en el que:

- i) el primer sistema de expresión génica comprende un primer gen letal dominante operativamente unido a un primer promotor, un gen que codifica un primer factor de transcripción de activación, y una primera secuencia de control de empalme,
- ii) el segundo sistema de expresión génica comprende un segundo gen letal dominante operativamente unido a un segundo promotor, un gen que codifica un segundo factor de transcripción de activación, y una segunda secuencia de control de empalme,

en donde

cada uno de dichos factores de transcripción de activación es capaz de activar al menos uno de dichos promotores, con la condición de que ambos de dichos promotores se activan cuando se expresan ambos de dichos factores de transcripción,

cada una de la primera y segunda secuencias de control de empalme media la expresión específica para la hembra del primero y segundo gen letal dominantes, respectivamente, mediante empalme alternativo, y una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un gen *transformer* (*tra*), *doublesex* (*dsx*), o *Actina-4*.

la actividad de transactivación de cada uno del primero y el segundo factores de transcripción de activación es represible por un primero y un segundo factor de control exógeno, respectivamente, en donde dicho primer factor de control exógeno es igual o diferente de dicho segundo factor de control exógeno; y

cada uno de dichos componentes de dicho primer sistema de expresión génica es el mismo o diferente de dichos componentes de dicho segundo sistema de expresión génica.

2. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer factor de transcripción de activación es el producto génico del primer gen letal dominante y/o el segundo factor de transcripción de activación es el producto génico del segundo gen letal dominante, de manera que dicho factor de transcripción también proporciona el efecto letal conferido por dicho gen letal dominante.
3. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que una o ambas de la primera y la segunda secuencia de control de empalme media la expresión específica de la hembra por el respectivo gen letal dominante, junto con un spliceosoma mediando el empalme de un transcrito de ARN del gen letal dominante respectivo para producir un mRNA que codifica una proteína funcional y al menos un mRNA que codifica una proteína no funcional, en donde el mRNA que codifica una proteína funcional se produce en una hembra.
4. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada uno de los promotores primero y segundo es sustancialmente inactivo en ausencia del factor de transcripción de activación capaz de activar dicho promotor.
5. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal es, independientemente, tTA (activador de la transcripción reprimible con tetraciclina) o una tTAV (variante del gen tTA).
6. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal dominantes es, independientemente, uno de *tTAV* (SEQ ID NO: 26), *tTAV2* (SEQ ID NO: 27) y *tTAV3* (SEQ. ID NO: 28).
7. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un intrón *tra*, un gen *dsx* o un gen *Actina-4*.

8. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un intrón *tra*.
9. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de un Tephritid.
10. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de uno de los géneros *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* y *Rhagoletis*.
11. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de *Ceratitis capitata*.
12. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que una de la primera y segunda secuencias de control de empalme se deriva de *Ceratitis capitata* y la otra secuencia de control de empalme se deriva de una especie diferente.
13. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo sistemas de expresión de génica además comprende un potenciador asociado con el promotor respectivo, y al menos uno de los factores de transcripción de activación actúa en el potenciador respectivo.
14. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el potenciador, o uno o ambos de los potenciadores, es un elemento *tetO* (operador de tetraciclina) que comprende una o más repeticiones de *tetO*.
15. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 14, en la que cada potenciador es, independientemente, *tetOx7*, *tetOx14* o *tetOx21*.

16. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo promotores es un promotor embrionario.
17. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos de los promotores primero y segundo es un promotor mínimo.
18. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 16, en la que cada uno de los promotores primero y segundo es, independientemente, *Hsp70* (proteína de choque térmico 70) o *srya* (proteína del locus de serendipia alfa).
19. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en la que uno de los promotores primero y segundo es *Hsp70* y el otro de los promotores primero y segundo es *srya*.
20. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno del primero y segundo sistemas de expresión génica comprende un tercer gen dominante letal y un tercer promotor operativamente unido al tercer gen letal dominante, en el que el factor de transcripción de activación capaz de activar el promotor de dicho sistema de expresión génica también es capaz de activar el tercer promotor.
21. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 20, dependiente de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicho sistema de expresión génica comprende además un potenciador asociado con el promotor de dicho sistema de expresión génica, y el tercer promotor está también asociado con dicho potenciador.
22. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, en la que el tercer gen letal dominante es *VP16* (proteína del virus del herpes simple vmw65) y el tercer promotor es *Hsp70* o *srya*.

23. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la secuencia de polinucleótidos comprende además un marcador fluorescente.

24. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 23, en la que el marcador fluorescente es *DsRed2*.

25. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el primer gen letal dominante es tTAV (SEQ ID NO: 26), el primer factor de transcripción de activación es el producto del gen tTAV, el primer promotor es *Hsp70*, la secuencia de control es Ccra,

el segundo gen letal dominante es tTAV3 (SEQ ID NO: 28), el segundo factor de transcripción de activación es el producto génico tTAV3, el segundo promotor es *mya* y la segunda secuencia control de empalme es Bztra,

el primer sistema de expresión génica comprende además un primer potenciador asociado con el primer promotor, en el que el primer potenciador es tetOx7,

el segundo sistema de expresión génica comprende además un segundo potenciador asociado con el segundo promotor, en el que el segundo potenciador es tetOx14,

la secuencia de polinucleótidos comprende además un tercer gen letal dominante operativamente unido a un tercer promotor, estando asociado el tercer promotor al segundo potenciador, en el que el tercer gen dominante letal es *VP16* y el tercer promotor es *Hsp70*, en el que el segundo promotor está asociado con un extremo del segundo potenciador y el tercer promotor está asociado con el otro extremo del segundo potenciador,

la secuencia de polinucleótidos comprende además un primer marcador genético, que es *DsRed2*.

26. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la secuencia de polinucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 1.

27. Un vector recombinante, que comprende la secuencia de polinucleótidos según se describe en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

28. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 27, en el que el constructo comprende además, al menos cuatro repeticiones invertidas de transposón, formando al menos dos pares de repeticiones invertidas de transposón opuestas, en donde dicha secuencia de polinucleótidos está situada entre dos pares de repeticiones invertidas de transposón opuestas de tal manera que la escisión por una transposasa o transposasas de dichos pares, *in situ*, es efectiva para poder dejar dicha secuencia de polinucleótidos integrada en el genoma del huésped, sin repeticiones invertidas del transposón flanqueante en el genoma del huésped.

29. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 28, en la que cada una de las repeticiones invertidas del transposón que delimitan dicha secuencia de polinucleótidos es una repetición invertida terminal mínima.

30. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 28 o 29, que tiene cuatro repeticiones invertidas de transposón.

31. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 30, en la que las cuatro repeticiones invertidas de transposón forman un primero y un segundo par de repeticiones invertidas opuestas, en donde:

las cuatro repeticiones invertidas del transposón son repeticiones invertidas piggyBac,

el primer par consta de un extremo 3' piggyBac interno proximal de la secuencia de polinucleótidos y un extremo 5' *piggyBac* externo distal de la secuencia de polinucleótidos, y

el segundo par consiste en un extremo 5' piggyBac interno proximal de la secuencia de polinucleótidos y un extremo distal 3' *piggyBac* externo de la secuencia de polinucleótidos.

32. El polinucleótido de la reivindicación 31, en el que:

el extremo interno 3' *piggyBac* consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 32,

el extremo 5' *piggyBac* externo consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 30

el extremo 5' *piggyBac* interno consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 30, y

el extremo 3' *piggyBac* externo consiste en la secuencia de polinucleótidos representada por la SEQ ID NO: 31.

33. El vector recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-32, que comprende además al menos un marcador genético entre las repeticiones invertidas de transposón de al menos un par de repeticiones invertidas de transposón opuestas.

34. Un método para detectar un insecto transformado que comprende el constructo genético de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 27-33, que comprende las etapas de:

i) poner en contacto una muestra de ADN aislado de un insecto con un par de primers específico para el insecto transformado, en el que el primer primer en el par es específico para la secuencia de polinucleótidos del constructo genético del insecto y el segundo primer en el par es específico para una secuencia nucleótido genómico que flanquea la secuencia de polinucleótidos,

ii) amplificar la muestra de ADN, y

iii) detectar el ADN amplificado,

en el que el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 6 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 7; o el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 5; o el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 10 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 11.

35. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en el que la etapa i) comprende además poner en contacto la muestra de ADN con una sonda específica del producto de amplificación por PCR producido en la etapa ii), para la detección del producto de amplificación por PCR, en el que la sonda es una sonda doblemente etiquetada que comprende una molécula reportera y una molécula de desactivación fluorescente, y en el que la molécula reportera es liberada de la sonda por Taq polimerasa durante la amplificación por PCR, cuando dicha sonda se hibrida a dicho producto de amplificación

por PCR, en el que la sonda tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12.

36. Un primer, que comprende la secuencia de nucleótidos representada por una de las SEQ ID NOs: 4, 5, 6, 7, 10 u 11.

37. Un par de primers, que comprenden las secuencias de nucleótidos representadas por las SEQ ID NOs: 10 y 11.

38. Una sonda, que comprende la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12.

39. Un método para controlar una población de insectos que comprende liberar un insecto que comprende el vector recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-33.

40. El método de la reivindicación 39, en el que el insecto es *Ceratitis capitata*.