

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 369**

51 Int. Cl.:

A01K 67/033 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.11.2018 PCT/US2018/061886**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019 WO19103982**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.2018 E 18880475 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3713406**

54 Título: **Sexado y esterilización por endonucleasa en insectos**

30 Prioridad:

21.11.2017 US 201762589405 P

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

26.11.2024

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US

72 Inventor/es:

KANDUL, NIKOLAY P. y
AKBARI, OMAR S.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 989 369 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

Sexado y esterilización por endonucleasa en insectos

5 **Antecedentes**

La producción y liberación masiva de machos estériles, conocida como Técnica de Insectos Estériles (SIT, por sus siglas en inglés), se ha utilizado históricamente para controlar y erradicar las poblaciones de plagas de insectos que se remontan a mediados de la década de 1930. Las metodologías anteriores se han basado en agentes que dañan el ADN para la esterilización, reduciendo sustancialmente la aptitud general y la competitividad de apareamiento de los machos liberados. Para superar estos problemas, las técnicas de infertilidad mediadas por microbios, tales como la técnica de insectos incompatibles (IIT, por sus siglas en inglés) basada en *Wolbachia* y los sistemas genéticos modernos similares a la SIT, tales como la liberación de insectos portadores de un dominante letal (RIDL, por sus siglas en inglés), y otras metodologías para liberar machos fértiles que matan genéticamente a hembras tales como RIDL específica para hembras (fsRIDL, por sus siglas en inglés), y se han desarrollado trituradoras de cromosomas X ligados a un autosoma. Si bien estas tecnologías genéticas SIT de primera generación representan avances significativos, IIT requiere estrictamente que no se liberen hembras infectadas, lo cual es difícil de lograr en el campo, y el uso de la tetraciclina conocida por eliminar la microbiota compromete la aptitud de machos fsRIDL/RIDL, y las trituradoras de cromosomas X en principio solo pueden desarrollarse en especies con cromosomas sexuales heterogaméticos, lo que limita su amplia aplicabilidad a otras especies. Por lo tanto, sería logísticamente ventajoso emplear tecnologías basadas en SIT más eficientes que se puedan implementar como huevos mediante los cuales solo los machos estériles sobrevivirían.

Kondo *et al.* (*Genetics*, vol. 195, n.º 3, 3 de septiembre de 2013 (03-09-2013), páginas 715-721) informan de la selección de genes mediante la expresión de Cas9 específica de la línea germinal en *Drosophila*. El documento WO 2015/105928 A1 informa del uso de proteínas de unión al ADN guiadas por ARN para ubicarse junto con el ARN guía en un sitio de ADN diana y actuar como impulsores génicos. Galizi *et al.* (*Scientific Reports*, vol. 6, n.º 1, 3 de agosto de 2016 (03-08-2016), páginas 1-5) informan de un sistema CRISPR-Cas9 de distorsión de la proporción de sexos para el control genético. Adelman y Zhijian (*Trends In Parasitology*, Elsevier Current Trends, vol. 32, n.º 3, 17 de febrero de 2016 (17-02-2016), páginas 219-229) informan sobre el control de enfermedades infecciosas transmitidas por mosquitos en relación con el sexo y el impulso génico. Taning *et al.* (*Journal Of Insect Physiology*, Pergamon Press, Oxford, GB, vol. 98, 18 de enero de 2017 (18-01-2017), páginas 245-257) informan sobre CRISPR/Cas9 en insectos y las aplicaciones pertinentes, las mejores prácticas y los problemas de bioseguridad. Harvey-Samuel *et al.* ("Biological Invasions", *Springer International Publishing*, Cham, vol. 19, n.º 6, 21 de febrero de 2017 (21-02-2017), páginas 1683-1703) informan sobre cuestiones relativas al control genético de las especies invasoras. Nagel *et al.* ("Sterile Insect Technique", 1 de enero de 2005 (01-01-2005), *Springer-Verlag*, Berlín/Heidelberg, páginas 499-524) informan sobre el medio ambiente y la técnica de los insectos estériles. Kandul *et al.* (*Nature Communications*, vol. 10, n.º 1, 2 de septiembre de 2019 (02-09-2019), páginas 1-12) informan de la transformación del control de la población de insectos con machos estériles guiados con precisión con demostración en moscas.

40 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona huevos de insecto que comprenden hasta un 100 % de huevos de insecto macho estériles producidos como descendencia de un método que comprende:

45 integrar al menos una secuencia de ácido nucleico en un genoma de un primer insecto, comprendiendo la al menos una secuencia de ácido nucleico al menos un primer polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica esencial para la hembra que se requiere para la viabilidad específica de la hembra y al menos un segundo polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica de esterilidad masculina que se requiere para la fertilidad específica del macho,
 50 en donde la secuencia genómica esencial para la hembra es un gen o una variante de corte y empalme de un gen, siendo el gen seleccionado del grupo que consiste en doublesex (Dsx), sex lethal (Sxl), transformer (Tra), homólogos de estos, ortólogos de estos, parálogos de estos y combinaciones de estos, y
 en donde la secuencia genómica de esterilidad masculina es un gen seleccionado del grupo que consiste en β Tubulin 85D (β Tub), cebollas borrosas (Fzo, por sus siglas en inglés), protamina A (ProtA) o detención de espermatozoides (Sa, por sus siglas en inglés);
 55 integrar una secuencia de ácido nucleico que codifique una endonucleasa en el genoma de un segundo insecto, pudiendo el segundo insecto cruzarse genéticamente con el primer insecto, en donde la endonucleasa esté dirigida por el al menos un segundo polinucleótido guía para desactivar enzimáticamente la secuencia genómica de esterilidad masculina; y
 60 cruzar genéticamente el primer insecto y el segundo insecto produciendo así la descendencia de huevos de insecto que comprenden la endonucleasa y la al menos una secuencia de ácido nucleico a partir de la cual los huevos de insecto macho maduran hasta la edad adulta; en donde:

65 (a) el insecto es un mosquito de los géneros *Stegomyia*, *Aedes*, *Anopheles* o *Culex*; opcionalmente en donde el mosquito se selecciona del grupo que consiste en *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus triseriatus*

(*Aedes triseriatus*), *Anopheles stephensi*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Anopheles freeborni*, especies de *Culex* y *Culiseta melanura*; o

(b) el insecto se selecciona del grupo que consiste en: una mosca de la fruta tefrítida seleccionada de la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*), mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsalis*), mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), mosca del melón (*Bactrocera cucurbitae*), mosca natal de la fruta (*Ceratitis rosa*), mosca de la cereza (*Rhagoletis cerasi*), mosca de la fruta de Queensland (*Bactrocera tyroni*), mosca del durazno (*Bactrocera zonata*), mosca de la fruta del Caribe (*Anastrepha suspensa*), mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsalis*), mosca de las indias occidentales (*Anastrepha obliqua*), gusano barrenador del Nuevo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*), gusano barrenador del Viejo Mundo (*Chrysomya bezziana*), mosca de las ovejas australianas/mosca de botella verde (*Lucilia cuprina*), gusano rosado del algodón (*Pectinophora gossypiella*), polilla gitana europea (*Lymantria dispar*), gusano de ombligo naranja (*Amyelois transitella*), barrenador del tallo del durazno (*Anarsia lineatella*), barrenador del tallo de arroz (*Tryporyza incertulas*), mariposas nocturnas, *Heliothinae*, escarabajo japonés (*Papilla japonica*), escarabajo de borde blanco (*Graphognathus* spp.), gorgojo del algodón (*Anthonomus grandis*), escarabajo de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), cochinita harinosa de la vid (*Planococcus ficus*), psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii*), francotirador verde azulado (*Graphocephala atropunctata*), chicharrita de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis*), polilla marrón de la manzana (*Epiphyas postvittana*), chinche pintada (*Bagrada hilaris*), chinche apestoso (*Halyomorpha halys*), polilla gitana asiática seleccionada del grupo de *Lymantria dispar* asiática, *Lymantria dispar japonica*, *Lymantria albescens*, *Lymantria umbrosa* y *Lymantria postalba*, escarabajo asiático de antenas largas (*Anoplophora glabripennis*), escarabajo rinoceronte del coco (*Oryctes rhinoceros*), barrenador esmeralda del fresno (*Agilus planipennis*), polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana*), polilla gitana europea (*Lymantria dispar*), falsa polilla de la manzana (*Thaumotibia leucotreta*), hormigas coloradas seleccionadas de *Solenopsis invicta* Buren, y *S. richteri* Forel, oruga del Viejo Mundo (*Helicoverpa armigera*), mosca linterna con manchas (*Lycorma delicatula*), abejas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), barrenador de brote y fruta (*Leucinodes orbonalis*), gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica* spp.), gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), mosca doméstica (*Musca domestica*), mosca de botella verde (*Lucilia cuprina*), gusano de seda (*Bombyx mori*), piojo rojo de California (*Aonidiella aurantia*), gusano del corazón del perro (*Dirofilaria immitis*), gorgojo del pino (*Dendroctonus frontalis*), trips del aguacate (*Thysanoptera* spp.), éstridos seleccionados de *Oestridae* spp. y *Dermatobia hominis*, mosca de caballo (*Tabanus sulcifrons*), mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*), mosca de gusano barrenador seleccionada de *Cochliomyia macellaria* (*C. macellaria*), *C. hominivorax*, *C. aldrichi*, o *C. minima*, mosca stsé-tsé (*Glossina* spp.), mosca del gorjeo seleccionada de *Hypodermabovis* o *Hypoderma lineatum*, mosca linterna con manchas (*Lycorma delicatula*), escarabajo *Khapra* (*Trogoderma granarium*), ácaro de la abeja (*Varroa destructor*), isópteros (*Coptotermes formosanus*), pulgón de la tsuga (*Adelges tsugae*), escarabajo de la rama del nogal (*Pityophthorus juglandis*), avispa taladora de madera de pino Europea (*Sirex noctilio*), gusano rosado (*Pectinophoras cutigera*), araña roja (*Tertanychus urticae*), palomilla dorso de diamante (*Plutellaxylostella*), oruga del tabaco (*Spodoptera litura*), gorgojo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*), pulgón verde del melocotonero (*Myzuspersicae*), pulgón del algodón (*Aphis gossypii*) saltamontes marrón (*Nilaparvatalugens*), gardama (*Spodoptera exigua*), trips de las flores (*Frankliniella occidentalis*), carpocapsa (*Cydia pomonella*) gorgojo del caupí (*Callosobruchus maculatus*), pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum*), polilla del tomate (*Tuta absoluta*), trips de la cebolla (*Thrips tabaci*), gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*).

La presente invención también proporciona un insecto macho estéril modificado genéticamente producido por los huevos de insecto de la presente invención, en donde el insecto macho estéril modificado genéticamente es capaz de aumentar la tasa de huevos no eclosionados apareándose con insectos hembra de tipo salvaje, y en donde el insecto macho estéril modificado genéticamente tiene una vida útil igual o superior a la de su correspondiente insecto macho de tipo salvaje.

La presente invención proporciona además un método de reducción de una población de insectos de tipo salvaje que comprende la introducción de un macho estéril modificado genéticamente de la presente invención en la población de insectos de tipo salvaje.

Divulgación adicional

Los aspectos de la presente descripción refieren a métodos que incluyen la técnica de insectos estériles guiada con precisión (pgSIT, por sus siglas en inglés).

En algunos aspectos de la presente descripción, un método para dirigir el sexado masculino en un insecto modificado genéticamente incluye: integrar al menos una secuencia de ácido nucleico en un genoma de un primer insecto, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico tiene al menos un primer polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica esencial de la hembra que se requiere para la viabilidad específica de la hembra; introducir una endonucleasa en un segundo insecto, donde el segundo insecto es capaz de cruzarse genéticamente con el primer insecto; y cruzar genéticamente el primer insecto y el segundo insecto produciendo así una progenie que expresa la endonucleasa y la al menos una secuencia de ácido nucleico a partir de la cual los huevos de insecto macho maduran hasta la edad adulta.

5 En algunos aspectos de la presente descripción, un método para producir una progenie de huevos de insectos macho estériles modificados genéticamente incluye: integrar al menos una secuencia de ácido nucleico en un genoma de un primer insecto, donde la al menos una secuencia de ácido nucleico tiene al menos un primer polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica esencial de la hembra que se requiere para la viabilidad específica de la hembra; introducir una endonucleasa en un segundo insecto, donde el segundo insecto es capaz de cruzarse genéticamente con el primer insecto, en donde la al menos una secuencia de ácido nucleico incluye además al menos un segundo polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica de esterilidad masculina que se requiere para esterilidad específica masculina; y cruzar genéticamente el primer insecto y el segundo insecto para producir una progenie de huevos de insectos macho estériles modificados genéticamente.

15 En algunos aspectos de la presente descripción, la integración de al menos una secuencia de ácido nucleico en el genoma del primer insecto incluye la integración homocigótica en todas las copias cromosómicas del genoma. En algunas modalidades, la integración de la al menos una secuencia de ácido nucleico incluye la introducción de la al menos una secuencia de ácido nucleico en el primer insecto durante una etapa embrionaria.

En algunos aspectos de la presente descripción, el al menos un primer polinucleótido guía y el al menos un segundo polinucleótido guía incluyen cada uno al menos un ácido ribonucleico guía (ARNg).

20 En algunos aspectos de la presente descripción, la secuencia genómica esencial de la hembra incluye un gen esencial para la viabilidad específica de la hembra o un exón específico de la hembra esencial para el desarrollo específico de la hembra y/o la viabilidad específica de la hembra.

25 En algunos aspectos de la presente descripción, el al menos un primer polinucleótido guía incluye más de un primer polinucleótido guía, cada uno de los cuales se dirige a una región diferente de la misma secuencia genómica esencial de la hembra que se requiere para la viabilidad específica de la hembra.

30 En algunos aspectos de la presente descripción, el al menos un primer polinucleótido guía incluye más de un primer polinucleótido guía, cada uno de los cuales se dirige a una secuencia genómica esencial de la hembra diferente que se requiere para la viabilidad específica de la hembra.

35 De acuerdo con la presente invención, la secuencia genómica esencial de la hembra es un gen o una variante de corte y empalme de un gen, donde el gen se selecciona del grupo de sex lethal (Sxl), transformer (Tra), doublesex (Dsx), homólogos de estos, ortólogos de estos, parálogos de estos o combinaciones de estos.

En algunos aspectos de la presente descripción, el al menos un primer polinucleótido guía incluye más de un primer polinucleótido guía, cada uno de los cuales se dirige a un gen diferente seleccionado de Sxl, Tra o Dsx, incluidos homólogos de estos, ortólogos de estos o parálogos de estos.

40 En algunos aspectos de la presente descripción, el más de un primer polinucleótido guía incluye dos primeros polinucleótidos guía, cada uno de los cuales se dirige a un gen diferente seleccionado de Sxl, Tra o Dsx, incluidos homólogos de estos, ortólogos de estos o parálogos de estos.

45 En algunos aspectos de la presente descripción, el más de un primer polinucleótido guía incluye dos primeros polinucleótidos guía, cada uno de los cuales se dirige a un gen diferente seleccionado de Sxl o Dsx incluidos homólogos de estos, ortólogos de estos o parálogos de estos.

50 De acuerdo con la presente invención, la secuencia genómica de esterilidad masculina es un gen seleccionado de β Tubulin 85D (β Tub), cebollas borrosas (Fzo), protamina A (ProtA) o detención de espermatozoides (Sa), incluidos homólogos de estos, ortólogos de estos o parálogos de estos.

55 En algunos aspectos de la presente descripción, cuando el segundo insecto es un macho, la introducción de la endonucleasa en el segundo insecto incluye la integración homocigótica de un gen que codifica la endonucleasa, y cuando el segundo insecto es una hembra, la introducción de la endonucleasa en el segundo insecto incluye integrar de manera homocigótica o heterocigótica un gen que codifica la endonucleasa o depositar una proteína endonucleasa en el segundo insecto.

60 En algunos aspectos de la presente descripción, la introducción de una endonucleasa en un segundo insecto incluye la introducción de la endonucleasa en el segundo insecto durante una etapa embrionaria.

En algunos aspectos de la presente descripción, una progenie de huevos de insectos modificados genéticamente incluye hasta un 100 % de huevos de insectos macho producidos de acuerdo con los métodos de la presente descripción.

65 En algunos aspectos de la presente descripción, una progenie de huevos de insectos modificados genéticamente incluye hasta un 100 % de huevos de insectos macho estériles producidos de acuerdo con los métodos de la presente

descripción.

En algunos aspectos, un insecto macho estéril modificado genéticamente producido de acuerdo con los métodos de la presente descripción es capaz de aumentar la tasa de huevos sin eclosionar mediante el apareamiento con insectos hembra de tipo salvaje.

En algunos aspectos de la presente descripción, un método para reducir una población de insectos de tipo salvaje incluye introducir un macho estéril modificado genéticamente producido de acuerdo con los métodos de la presente descripción en la población de insectos de tipo salvaje.

Breve descripción de las figuras

Los dibujos adjuntos, junto con la memoria descriptiva, ilustran ejemplos de la presente descripción y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la presente descripción.

La Figura 1A es un esquema de la pgSIT que utiliza dos componentes del sistema binario CRISPR/Cas9, la endonucleasa Cas9 y los ácidos ribonucleicos guía (ARNg) (con secuencias diana específicas en azul o verde), mantenidos como líneas homocigóticas separadas, su cruzamiento da como resultado la inactivación concurrente o simultánea de un gen requerido para la viabilidad de la hembra y un gen requerido para la esterilidad del macho que da como resultado la supervivencia de solamente machos estériles F₁, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 1B es un esquema de empalme alternativo específico del sexo en los genes *sxl*, *tra* y *dsx* regulados por la expresión de las proteínas (líneas grises) Sxl (verde) y Tra (amarillo) en las hembras; la interrupción de exones específicos de la hembra de los genes clave para la determinación del sexo, *sxl*, *tra* y *dsx*, interrumpe el desarrollo de la hembra; y los exones pgSIT diana se indican mediante cruces amarillas, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 1C presenta esquemas de todas las construcciones diseñadas de acuerdo con la presente descripción, con construcciones funcionales y moscas depositadas en Addgene.org y Bloomington Drosophila Stock Center, respectivamente. Los nombres de los genes y las secuencias del sitio diana de ARNg se presentan en el recuadro. La secuencia codificante de un SpCas9 se flanqueó por dos señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) en ambos extremos y un péptido T2A de autoescisión con secuencia codificante de eGFP en el extremo C, que sirve como indicador visual de la expresión de Cas9.

La Figura 1D muestra imágenes de estereomicroscopio fluorescente de tres nuevas líneas homocigóticas que expresan Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) diseñadas de acuerdo con la presente descripción. Se desarrollaron tres líneas de *Drosophila* que apoyan la expresión de SpCas9 en la línea germinal estricta o en la línea germinal junto con células somáticas. *Nanos-Cas9* (*nos-Cas9*), *vasa-Cas9* (*vas-Cas9*) y *Ubiquitin-63E* (*Ubi-Cas9*) se insertaron en el mismo sitio en el tercer cromosoma mediante el uso de integración mediada por ϕ C31. El transgén *Opie2-dsRed* sirvió como marcador de transgénesis y una secuencia de T2A-eGFP de autoescisión, que se unió al extremo 3' de la secuencia codificante de SpCas9, proporcionó un indicador de la expresión de Cas9 como se muestra en la Figura 1C. Los niveles de expresión de dsRed y eGFP en cada línea Cas9 se compararon con moscas de tipo salvaje (*wt*, por sus siglas en inglés). La expresión de Cas9-T2A-eGFP se limitó principalmente a la línea germinal de la hembra en *nos-Cas9* y *vas-Cas9* con una fuerte expresión en *nos-Cas9*. *Ubi-Cas9* apoyó la expresión más fuerte de Cas9, medida por eGFP, tanto en la línea germinal de la hembra como la del macho, y en el soma.

La Figura 1E muestra gráficos de barras de frecuencias promedio según el sexo en la progenie F₁ de cruces con los insectos parentales modificados de acuerdo con la presente descripción. Dos paneles superiores representan frecuencias según el sexo de cruces de control bidireccionales de líneas de ARNg homocigótico a tipo salvaje (*wt*), lo que indica que tanto los machos como las hembras fértiles (♂ y ♀) están presentes en proporciones similares, pero no se identificaron intersexos estériles (♀). Las hembras fértiles se muestran en color rosa, los machos fértiles en azul, las hembras estériles en naranja y los machos estériles en gris. Los dos paneles inferiores muestran frecuencias según el sexo de cruces de *nanos-Cas9* (*nos-Cas9*) homocigotos a tipo salvaje (control) y cuatro líneas de ARNg homocigótico (experimento). Independientemente de la herencia de Cas9 materna o paterna, el 100 % de ♀ ARNg^{Sxl} transheterocigotos fueron letales, el 100 % de ♀ ARNg^{Dsx^F} y ARNg^{Tra} transheterocigotos se masculinizaron en intersexos estériles ♀, y el 100 % de ♂ ARNg^{βTu} transheterocigotos fueron estériles. Las frecuencias según el sexo y la fertilidad en transheterocigotos se compararon con las de la progenie correspondiente de cruces de control con *nos-Cas9* (líneas continuas) o ARNg (líneas discontinuas) y moscas de tipo salvaje. Cada barra muestra una frecuencia promedio según el sexo y una desviación estándar. La significación estadística se calculó con pruebas *t* asumiendo una varianza desigual, y para la esterilización del macho, los valores de *P* se calcularon mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson para tablas de contingencia (rojo *). (*P* > 0,001***).

La Figura 1F es una tabla de la progenie F₁ de los cruces entre ARNg simple homocigótico (ARNg/ARNg) y nos-

Cas9 homocigótico (nos-Cas9/nos-Cas9), de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 1G es una tabla de genotipificación de locus genómicos dirigidos por ARNg mediante la utilización de métodos de acuerdo con la presente descripción, donde indels (inserciones/delecciones) (texto en rojo) se encontraron en moscas transheterocigotas.

La Figura 2A muestra gráficos de barras de las frecuencias según el sexo (♀ (femenino), ♂ (masculino), e ♀ intersexo) de la progenie F₁ transheterocigota resultante de los cruces entre ARNg doble (ARNcd) y líneas Cas9 homocigóticas de acuerdo con la presente descripción. Tres ARN de guía doble (ARNgd), cada uno dirigido a *sxl*, *tra* o *dsx* combinado con *βTub*, se cruzaron bidireccionalmente con tres líneas Cas9 impulsadas por promotores *nanos* (*nos*), *vasa* (*vas*) y *Ubiquitin-63E* (*Ubi*) y fueron suficientes para asegurar la penetrancia completa de la letalidad/masculinización de la hembra y esterilidad del macho en cada cruzamiento recíproco como se indica en las Figuras 1C-1D. Las frecuencias según el sexo y la fertilidad en transheterocigotos se compararon con las de la progenie correspondiente de cruces de control con Cas9 (grupos de barras a la izquierda, líneas continuas) o ARNgd (paneles superiores, líneas discontinuas) y moscas de tipo salvaje. Cada barra muestra una frecuencia promedio según el sexo y una desviación estándar. La significación estadística se calculó con pruebas *t* asumiendo una varianza desigual, y para la esterilización del macho, los valores de *P* se calcularon mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson para tablas de contingencia (rojo *). (*P* > 0,01**, *P* > 0,001***).

La Figura 2B es una tabla de la progenie F₁ a partir de los cruces entre ARNg doble homocigótico (ARNgs/ARNgd) y líneas Cas9 homocigóticas (Cas9/Cas9), de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 2C es una tabla de datos que muestra el orden del gen diana en la ruta de determinación del sexo (arriba) y el fenotipo de inactivación correspondiente (con imágenes) en la progenie de acuerdo con la presente descripción. Fenotipos de inactivaciones dirigidas por ARNgd y morfología intersexual en comparación con ♀ y ♂ de tipo salvaje. Las inactivaciones de *βTub*, *Sxl* ♀ desaparecen durante las etapas de pupa como se indica en las Figuras 2D-2E. Como se muestra, ARNgd^{βTub, Tra/+}; *nos-Cas9/+* intersexos (♀), pero no ARNgd^{βTub, DsxF/+}; *nos-Cas9/+* ♀, tenía peines sexuales; véanse las inserciones interiores ampliadas.

La Figura 2D muestra gráficos de barras que ilustran que la tasa de eclosión (porcentaje) estimada para huevos ARNgd^{βTub, Sxl/+}; *nos-Cas9/+* generados al cruzar homocigotos *nos-Cas9/nos-Cas9* ♀ y ARNgd^{βTub, Sxl}/ARNgd^{βTub, Sxl} ♂ no fue estadísticamente diferente de la de los huevos de tipo salvaje (*wt*) como se indica en la Tabla 2 (Ejemplo 6), de acuerdo con la presente descripción. La significación estadística se calculó mediante una prueba *t* asumiendo una varianza desigual. (*P* < 0,05^{NS}, *P* > 0,001***).

La Figura 2E muestra gráficos de barras que ilustran las tasas de diferentes resultados para larvas eclosionadas ARNgd^{βTub, Sxl/+}; *nos-Cas9/+*, de acuerdo con la presente descripción, para las cuales se criaron lotes de 50 larvas eclosionadas hasta la adultez, se registró su sexo o tiempo de desarrollo de la muerte como se indica en la Tabla 3 (Ejemplo 6). La mayoría de las muertes de larvas adicionales ocurrieron durante una transición a pupa, y el porcentaje de muerte de pupas no fue estadísticamente diferente del porcentaje de ♀ de tipo salvaje. La significación estadística se calculó mediante una prueba *t* asumiendo una varianza desigual. (*P* < 0,05^{NS}, *P* > 0,001***).

La Figura 2F es una tabla de las características fenotípicas de moscas transheterocigotas que portan Cas9 y ARNg dobles (ARNcd), de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 2G muestra imágenes microscópicas de expresividad variable de la cantidad de cerdas del peine sexual en inactivaciones de *βTub*, *Tra* ♀, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 2H muestra imágenes de microscopio de órganos reproductores internos en hembras de tipo salvaje (imagen superior): dos ovarios (*ov*), receptáculo seminal (*rs*), doble espermateca (*sp*), dos glándulas accesorias (*ga*) y útero (*ut*), y la mosca intersexual ARNgd^{βTub, Tra/+}; *nos-Cas9/+* ♀ (imagen inferior) tenía un ovario rudimentario, y órganos que se asemejaban a glándulas accesorias masculinas, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 2I es una imagen de gel de agarosa de transcripciones amplificadas que indican que tanto las variantes de corte y empalme masculinas como las femeninas del gen *Dsx* se expresan en intersexos con inactivación de *βTub*, *Tra*, de acuerdo con la presente descripción. Se utilizó RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción, por sus siglas en inglés) para evaluar variantes de corte y empalme alternativas específicas de hembras y específicas de machos de *dsx* comparando hembras de tipo salvaje (*wt*) (♀), machos de tipo salvaje (♂) e intersexos ARNgd^{βTub, Tra/+}; *nos-Cas9/+* (*βTub**, *Tra** ♀). Se identificaron transcripciones de *dsx* específicas para machos y hembras en *βTub**, *Tra** ♀. Se indica la escalera molecular (ML, por sus siglas en inglés) de ADN de cadena doble y el control sin plantilla (NTC, por sus siglas en inglés).

La Figura 2J muestra imágenes de microscopio de moscas intersexuales *ARNgd^{βTub, DsxF/+}; nos-Cas9/+* ♀ que han desarrollado un solo ovario (ov) muchas veces no conectado con un oviducto y órganos que se asemejan a glándulas accesorias (ga) específicas del macho como se indica, de acuerdo con la presente descripción.

5 La Figura 2K muestra imágenes de microscopio del sistema reproductor interno masculino en moscas ♂ *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* con testículos (ts) y glándulas suprarrenales (gs) como se indica, de acuerdo con la presente descripción.

10 La Figura 2L muestra imágenes de microscopio del sistema reproductor interno masculino en moscas ♂ *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* con testículos (ts) y glándulas suprarrenales (gs) como se indica, de acuerdo con la presente descripción.

15 La Figura 2M muestra imágenes de microscopio del testículo de tipo salvaje *wt* (imagen de la izquierda) que tiene, quistes alargados con espermátides de maduración que no se encontraron en el testículo (ts) *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* como se indica en la presente y en las Figuras 2K-2L, de acuerdo con la presente descripción.

20 La Figura 2N es un esquema de la información de la secuencia con respecto a la βTubulin85D (βTub) diana en los machos estériles (♂) transheterocigotos *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* (de doble inactivación) que muestran inserciones/delecciones (indels) en mosaico precisamente en el sitio diana de βTub, de acuerdo con la presente descripción. Los diagramas en la parte superior presentan las posiciones de los sitios diana de ARNg y los cebadores utilizados para la PCR en relación con las estructuras genéticas de los genes diana. Las lecturas de secuencia de ambos extremos suponen una diversidad de plantillas que se localizan específicamente en los sitios diana con ARNg en el ♂ estéril, mientras que el ♂ de tipo salvaje tiene alelos únicos sin ninguna ambigüedad de secuencia.

25 La Figura 2O es un esquema de la información de la secuencia con respecto al Sex Lethal (Sxl) diana en los machos estériles (♂) transheterocigotos *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* (de doble inactivación) que muestran indels en mosaico identificados en el sitio diana Sxl en los mismos machos estériles (♂) *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* y pueden estar relacionados con la letalidad de la pupa de hembras transheterocigotas observadas en las Figuras 2D-2E, de acuerdo con la presente descripción. Los diagramas en la parte superior presentan las posiciones de los sitios diana de ARNg y los cebadores utilizados para la PCR en relación con las estructuras genéticas de los genes diana. Las lecturas de secuencia de ambos extremos suponen una diversidad de plantillas que se localizan específicamente en los sitios diana con ARNg en el ♂ estéril, mientras que el ♂ de tipo salvaje tiene alelos únicos sin ninguna ambigüedad de secuencia.

30 La Figura 2P es un esquema de la información de la secuencia con respecto al Transformer (Tra) diana en los machos estériles (♂) transheterocigotos con doble inactivación *ARNgd^{βTub, Tra/+}; nos-Cas9/+* y los intersexos (♀) que muestran inserciones/delecciones (indels) en mosaico localizados en el sitio Tra diana por *ARNgd^{βTub, Tra}* ARNg de guía doble (ARNgd), de acuerdo con la presente descripción. Los diagramas en la parte superior muestran las posiciones de ARNg diana y los cebadores utilizados para la PCR en relación con las estructuras genéticas de los genes diana. Las lecturas de secuencia de ambos extremos suponen una diversidad de plantillas que se localizan específicamente en los sitios diana con ARNg en ♂ y ♀ estériles, mientras que el ♂ de tipo salvaje tiene alelos únicos sin ninguna ambigüedad de secuencia en ambos sitios.

35 La Figura 2Q es un esquema de la información de secuencia con respecto al Doublesex (DsxF) diana en el ARNg doble *ARNgd^{βTub, DsxF}* transheterocigoto en ♂ y ♀ estériles *ARNgd^{βTub, DsxF/+}; nos-Cas9/+* que muestran indels en mosaico que se identificaron en el sitio diana DsxF, de acuerdo con la presente descripción. Los diagramas en la parte superior muestran las posiciones de ARNg diana y los cebadores utilizados para la PCR en relación con las estructuras genéticas de los genes diana. Las lecturas de secuencia de ambos extremos suponen una diversidad de plantillas que se localizan específicamente en los sitios diana con ARNg en ♂ y ♀ estériles, mientras que el ♂ de tipo salvaje tiene alelos únicos sin ninguna ambigüedad de secuencia en ambos sitios.

40 La Figura 2R es un esquema de la información de la secuencia con respecto al Doublesex (DsxF) diana en el ARNg doble *ARNgd^{βTub, DsxF}* transheterocigoto en ♂ y ♀ estériles *ARNgd^{βTub, DsxF/+}; nos-Cas9/+* que muestran indels en mosaico que se identificaron en el sitio diana DsxF, de acuerdo con la presente descripción. Los diagramas en la parte superior muestran las posiciones de ARNg diana y los cebadores utilizados para la PCR en relación con las estructuras genéticas de los genes diana. Las lecturas de secuencia de ambos extremos suponen una diversidad de plantillas que se localizan específicamente en los sitios diana con ARNg en ♂ y ♀ estériles, mientras que el ♂ de tipo salvaje tiene alelos únicos sin ninguna ambigüedad de secuencia en ambos sitios.

45 La Figura 3A muestra gráficos de barras que representan la cuantificación genética del efecto dominante por carga materna de Cas9, en donde los genotipos, frecuencias según el sexo y fertilidad de moscas generadas por cruces recíprocos entre moscas *ARNgd* homocigotas y *Cas9* heterocigotas se indican mediante las barras lisas o rayadas de color rosa, azul, naranja o gris como se muestra en las leyendas de la figura. La progenie de cruces con *Cas9* heterocigoto paterno se muestra en los paneles de la izquierda y el *Cas9* heterocigoto materno se muestra en los paneles de la derecha. Cada barra muestra una frecuencia promedio según el sexo y una desviación estándar. La significación estadística se calculó mediante pruebas *t* asumiendo una varianza desigual. ($P > 0,01^{**}$, $P > 0,001^{***}$). Las barras rayadas indican la herencia de *Cas9* como gen, mientras que las barras lisas indican la herencia de +alelo.

50 La Figura 3B es una tabla esquemática que muestra combinaciones de genotipos y contribuciones maternas/cigóticas en embriones, y su penetrancia, de acuerdo con la presente descripción.

65

La Figura 3C es una tabla de la progenie F₁ a partir de los cruces entre ARNg dobles homocigotos (ARNgd/ARNgd) y Cas9 heterocigoto (Cas9/TM3, Sb), de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 3D es una tabla esquemática que muestra la acumulación de altos niveles de mosaicismo bialélico (BM, por sus siglas en inglés) a lo largo del desarrollo del insecto que conduce a la pérdida de la función genética a nivel del organismo y asegura la penetrancia completa de los fenotipos inducidos: letalidad (mosaicismo bialélico letal (LBM, por sus siglas en inglés)) (recuadros en color rosa), masculinización de las hembras o esterilidad en los machos, como se indica. La complementación de la función génica en algunas células por alelos *de tipo salvaje* no escindidos (recuadros de color verde claro) y alelos de resistencia (recuadros amarillos) generados por NHEJ, no son suficientes para rescatar el fenotipo inducido a nivel del organismo y, por lo tanto, el 100 % de la progenie transheterocigótica tiene los fenotipos inducidos. Los recuadros se vuelven más pequeños y más abundantes a medida que las células se dividen.

La Figura 4A es un esquema de una configuración experimental para estimar la competitividad de apareamiento de machos estériles *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* (marcados con rojo) compitiendo contra machos *de tipo salvaje* para asegurar el apareamiento con las hembras *de tipo salvaje*, de acuerdo con la presente descripción. Una hembra apareada es resistente al siguiente apareamiento durante aproximadamente 24 horas, y el éxito en el apareamiento de los machos estériles se evaluó mediante la disminución de la fertilidad (p. ej., mediante el aumento de la tasa de huevos sin eclosionar).

La Figura 4B muestra gráficos de barras que ilustran los porcentajes de huevos puestos y eclosionados donde el número de huevos puestos se normalizó frente al número más alto de huevos (n=199) para convertirlos al percentil como se indica en la tabla de la Figura 4C. La presencia de un macho estéril dio como resultado una disminución significativa en la fertilidad de la hembra (n.º 3 frente a n.º 2) que no podría contabilizarse mediante la eliminación de un macho de *tipo salvaje* (n.º 2 frente a n.º 1). La significación estadística se calculó mediante una prueba *t* asumiendo una varianza desigual comparando el grupo n.º 3 con el n.º 2 y el n.º 1 ($P > 0,003^{**}$, $P > 0,0001^{***}$).

La Figura 4C es una tabla de competitividad de apareamiento basada en huevos puestos, sin eclosionar y eclosionados para machos *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* comparados con machos de tipo salvaje con los cruces indicados, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 4D es un gráfico de las curvas de supervivencia de los machos *de tipo salvaje* (línea azul) y dos tipos de machos estériles *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+*, con herencia Cas9 paterna (línea roja) o materna (línea verde) de acuerdo con la presente descripción. Las curvas de supervivencia muestran estimaciones por máxima verosimilitud no paramétricas (NPMLE, por sus siglas en inglés) para tres grupos de machos, junto con intervalos de confianza del 95 % estimados por bootstrap que se muestran con un tono claro y la falta de unicidad se representa con un tono oscuro. El eje y muestra el porcentaje de supervivencia estimado. Ambos tipos de machos pgSIT vivieron significativamente más que los machos *de tipo salvaje* ($P < 2,2^{-16}$), mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre dos tipos de machos pgSIT. La generalización de Sun de la prueba de orden logarítmico se utilizó para probar las diferencias en las curvas de supervivencia.

La Figura 4E es una tabla de datos de longevidad (esperanza de vida en días) para machos *ARNgd^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* comparados con machos de control w-, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 4F es una tabla de los parámetros de entrada utilizados en el modelo de supresión de la población de *Aedes aegypti*, como se describe en la presente, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 4G es un gráfico del impacto predicho por el modelo de las liberaciones de huevos de pgSIT (azul oscuro) en la densidad de población del mosquito *Aedes aegypti* en comparación con las liberaciones de la técnica de insectos incompatibles (IIT) basada en *Wolbachia* (púrpura), liberación de insectos que portan un gen letal dominante (RIDL) (azul claro) y RIDL específica de hembras (fsRIDL) (rojo) mediante un modelo de supresión como se describe en la presente, de acuerdo con la presente descripción. Las liberaciones se llevan a cabo semanalmente durante un período de seis meses con tasas de liberación (en relación con los adultos de tipo salvaje) como se indica en la leyenda inscrita. Las predicciones del modelo se calcularon utilizando 2000 modalidades de la implementación estocástica del marco de simulación MGDriVE para una mezcla aleatoria de población de *Ae. aegypti* de 10.000 hembras adultas y los parámetros del modelo descritos en la tabla de la Figura 4F. Como se muestra, las liberaciones mediante pgSIT superan a las de todas las demás tecnologías de supresión o reducción, mostrando el mayor potencial para eliminar a la población local.

La Figura 4H muestra gráficos que miden la sensibilidad de las predicciones del modelo pgSIT con respecto a la competitividad de apareamiento de machos, la reducción de la esperanza de vida con una tasa de liberación de 200 huevos por adulto salvaje, manteniendo todos los demás parámetros constantes como se establece en la tabla de la Figura 4F. Las predicciones del modelo se calcularon utilizando 250 modalidades de la implementación estocástica del marco de simulación MGDriVE para una mezcla aleatoria de población de *Ae. aegypti* de 10.000 hembras adultas. Como se muestra en el gráfico de la izquierda, con una tasa de liberación semanal de 200 huevos por adulto salvaje y manteniendo constante la reducción de la esperanza de vida debido a la construcción mediante

pgSIT en 18 %, la eliminación se puede lograr de manera confiable para una competitividad de apareamiento de machos del 25 %; pero no para el 5 %, como es el caso de los machos adultos RIDL, de acuerdo con la presente descripción. Como se muestra en el gráfico de la derecha, con una tasa de liberación semanal de 200 huevos por adulto salvaje y manteniendo constante la competitividad de apareamiento de los machos en 78 %, la eliminación se puede lograr de manera confiable para reducciones de esperanza de vida menores o iguales a 75 %, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 4I es un gráfico que muestra una amplia gama de valores de parámetros (reducción de la esperanza de vida variable y competitividad de apareamiento de los machos conjuntamente, como se indica) para los cuales la eliminación local de *Ae. aegypti* se puede lograr de manera confiable (recuadros color canela) con una tasa de liberación semanal de 200 huevos por adulto salvaje, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 4J muestra gráficos que miden la sensibilidad de las predicciones del modelo pgSIT con respecto a la competitividad de apareamiento de machos, la reducción de la esperanza de vida con una tasa de liberación de 100 huevos por adulto salvaje, manteniendo todos los demás parámetros constantes como se establece en la tabla de la Figura 4F. Como se muestra en el gráfico de la izquierda, con una tasa de liberación semanal de 100 huevos por adulto salvaje y manteniendo constante la reducción de la esperanza de vida debido a la construcción mediante pgSIT en 18 %, la eliminación se puede lograr de manera confiable para una competitividad de apareamiento de machos del 50 %; pero no para el 25 %, de acuerdo con la presente descripción. Como se muestra en el gráfico de la derecha, con una tasa de liberación semanal de 100 huevos por adulto salvaje y manteniendo constante la competitividad de apareamiento de los machos en 78 %, la eliminación se puede lograr de manera confiable para reducciones de esperanza de vida menores o iguales a 50 %, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 4K es un gráfico que muestra una amplia gama de valores de parámetros (reducción de la esperanza de vida variable y competitividad de apareamiento de los machos conjuntamente, como se indica) para los cuales la eliminación local de *Ae. aegypti* se puede lograr de manera confiable (recuadros color canela) con una tasa de liberación semanal de 100 huevos por adulto salvaje, de acuerdo con la presente descripción.

La Figura 5 es un esquema que muestra una fábrica ubicada en los Estados Unidos (punto azul) para la producción de huevos mediante pgSIT para su distribución (p. ej., mediante un dron) y su liberación en ubicaciones remotas en todo el mundo (p. ej., en Sudamérica, África y Asia (puntos rosados)), de acuerdo con la presente descripción.

Descripción detallada

La técnica de los insectos estériles (SIT, por sus siglas en inglés) es una tecnología probada y segura para el medio ambiente para suprimir y reducir las poblaciones silvestres. Los aspectos de la presente descripción incluyen métodos para modificar genéticamente insectos usando una tecnología basada en CRISPR a la que se hace referencia en la presente como métodos de "SIT guiada por precisión" (pgSIT, por sus siglas en inglés). Como se describe en mayor detalle a lo largo de la presente descripción, los métodos de pgSIT se basan mecánicamente en una tecnología genética dominante que permite el sexado así como el sexado y esterilización concurrentes o simultáneos en insectos. El sexado y esterilización concurrentes o simultáneos de los huevos de insectos permite la capacidad de liberar huevos en el medio ambiente asegurando que emerjan machos adultos estériles. Para aplicaciones de campo, la liberación de huevos elimina la carga de sexar y esterilizar manualmente los machos, lo que reduce el esfuerzo general y aumenta la escalabilidad.

Para demostrar la eficacia de la tecnología pgSIT de acuerdo con la presente descripción, se diseñaron y demostraron múltiples sistemas de pgSIT en *Drosophila* como un ejemplo de insecto. Se entiende que las técnicas y métodos genéticos descritos y referenciados en este documento son aplicables a una amplia gama de insectos.

Los métodos pgSIT de sexado masculino y los métodos de sexado y esterilidad masculinos descritos en la presente utilizan la precisión y exactitud de la tecnología basada en CRISPR para inactivar los genes esenciales para la viabilidad de la hembra (para el sexado masculino) o conjuntamente o simultáneamente inactivar los genes esenciales para la viabilidad de la hembra y la fertilidad del macho. Los métodos pgSIT de la presente descripción utilizan un esquema de reproducción simple que requiere dos cepas de insectos (una primera cepa parental y una segunda cepa parental), una que expresa una endonucleasa (p. ej., Cas9) y la otra que expresa una construcción de secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un polinucleótido guía dirigido al gen o genes a inactivar. Un solo apareamiento entre estas dos cepas parentales da mecánicamente como resultado inactivaciones alélicas dominantes o bialélicas dominantes guiadas por polinucleótidos sincrónicos (p. ej., guiadas por ARN) del gen o genes diana durante el desarrollo.

La tecnología CRISPR se refiere a grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares y ha sido ampliamente estudiada y modificada para la modificación del genoma en la mayoría de los organismos estudiados, como se describe en Sternberg y Doudna, *Mol. Cell* 58, 568–574 (2015).

Como se usa en la presente, con respecto a la tecnología basada en CRISPR, el término "polinucleótido guía" se refiere a un polinucleótido que tiene una "secuencia sintética" capaz de unirse a la proteína de la enzima endonucleasa

correspondiente (p. ej., Cas9) y una secuencia diana variable capaz de unirse a la diana genómica (p. ej., una secuencia de nucleótidos que se encuentra en un exón de un gen diana). En algunos aspectos de la presente descripción, un polinucleótido guía es un ácido ribonucleico guía (ARNg). En algunos aspectos, la secuencia diana variable del polinucleótido guía es cualquier secuencia dentro de la diana que sea única con respecto al resto del

5 genoma y esté inmediatamente adyacente a un Motivo Adyacente Protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés). La secuencia exacta de la secuencia de PAM puede variar ya que diferentes endonucleasas requieren diferentes secuencias de PAM. Como se usa en la presente, la expresión "construcción heteróloga simple que tiene dos ARN de guía simple diferentes (ARNsg, por sus siglas en inglés)" se refiere a un ARN de doble guía (ARNdg).

10 Con respecto a la proteína de la enzima endonucleasa de la tecnología basada en CRISPR, el término "endonucleasa" se refiere a cualquier proteína de enzima endonucleasa adecuada o una variante de esta que será dirigida específicamente por el polinucleótido guía seleccionado para inactivar enzimáticamente la secuencia diana del polinucleótido guía. Como se usa en la presente, el término "variante de esta", como se usa con respecto a una

15 endonucleasa, se refiere a la endonucleasa referenciada en su forma enzimáticamente funcional expresada en cualquier organismo hospedador o sistema de expresión adecuados y/o incluida cualquier modificación para mejorar la actividad enzimática de la endonucleasa.

Los ejemplos descritos a lo largo de la presente descripción representan métodos para la producción de progeñe de insecto macho estéril en los que tanto un gen de viabilidad de la hembra como un gen de fertilidad del macho se inactivan mediante el uso de al menos dos polinucleótidos guía. Sin embargo, como lo entenderá un experto en la

20 técnica, los métodos para dirigir el sexado masculino incluyen el método descrito en la presente en el que se selecciona como objetivo un gen esencial para la viabilidad de la hembra y no los genes para la esterilidad del macho. Por ejemplo, con referencia a la Figura 1A, la endonucleasa del insecto parental (línea marcada Cas9) se cruza con el ARN guía parental (línea ARNg) que tiene dos ARNg (uno azul, uno verde) dirigidos a un gen esencial de la hembra y un gen de

25 esterilidad del macho. Sin embargo, para los métodos de dirigir el sexado masculino, la línea de ARNg no se modificaría genéticamente para expresar el gen de esterilidad del macho.

Como se usa en la presente, los términos "integrar", "integración" y términos similares se refieren a la introducción de una secuencia de ácido nucleico recombinante heteróloga en el insecto diana. Como lo entenderá un experto en la

30 técnica, las técnicas para la modificación genética de insectos son conocidas y descritas, por ejemplo, en Cockburn *et al.*, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2: 68-99, (1984). Integración, como se usa en la presente, puede referirse a la integración de la secuencia de ácido nucleico recombinante en el genoma del insecto diana. El genoma del insecto diana incluye al menos un cromosoma del insecto diana, pero puede incluir todas las copias cromosómicas pertinentes. Como tal, la integración en el genoma puede ser heterocigótica u homocigótica.

35

Como se usa en la presente, la expresión "introducir una endonucleasa" en un insecto diana se refiere a la introducción recombinante de una endonucleasa en el insecto de manera que la endonucleasa esté presente en el insecto. La introducción de una endonucleasa en un insecto no requiere integración genómica, pero puede incluir integración

40 genómica. Por ejemplo, la introducción de una endonucleasa incluye "depositar" la endonucleasa en el insecto como se describe, por ejemplo, en Lin y Potter, G3, (2016), doi:10.1534/g3.116.034884.

Además, aunque los ejemplos de la presente descripción incluyen métodos para obtener hasta un 100 % de progeñe masculina estéril, los métodos para producir menos del 100 % de progeñe masculina estéril también se incluyen dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, en algunos aspectos de la presente descripción, la cepa

45 de insecto parental que expresa el polinucleótido guía puede ser heterocigótica u homocigótica para el polinucleótido guía (polinucleótidos guía simples, dobles o más). En algunos aspectos, la cepa de insecto parental que expresa el polinucleótido guía es homocigótica para el polinucleótido guía, asegurando así que toda la progeñe reciba el polinucleótido guía.

50 Con referencia a las Figuras 2A y 3A, en aspectos adicionales de la presente descripción, si la cepa de insecto parental que expresa la endonucleasa es masculina, el parental macho puede ser heterocigótico u homocigótico para la endonucleasa, mientras que si la cepa de insecto parental que expresa la endonucleasa es femenina, la endonucleasa puede depositarse en la hembra, expresarse de forma heterocigótica u homocigótica.

55 Con referencia a la Figura 2F, si ambas cepas parentales son homocigóticas para su respectiva endonucleasa o polinucleótido guía, toda o casi toda la progeñe recibe la endonucleasa y el o los polinucleótidos guía como resultado de una penetrancia completa no mendeliana. Por consiguiente, los fenotipos deseados (p. ej., todos los insectos macho o todos los insectos macho y estériles) en toda la progeñe pueden producirse en una sola generación. Como se usa en la presente, el término "casi toda la progeñe" se refiere al menos al 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o el 99 % de la progeñe. Con referencia a la Tabla 3, en algunos aspectos

60 de la presente descripción, la viabilidad de la progeñe se determina en la etapa adulta.

En algunos aspectos de la presente descripción, los métodos para dirigir el sexado masculino incluyen introducir una endonucleasa en un primer insecto parental e integrar al menos una construcción de secuencia de ácido nucleico en el

65 genoma del segundo insecto parental (p. ej., un vector plasmídico), donde la secuencia de ácido nucleico tiene al menos un primer polinucleótido guía (p. ej., un ARNg o un ARNgd) que se dirige a una secuencia de nucleótidos en

una secuencia genómica esencial de la hembra) y el apareamiento del primer insecto parental y el segundo insecto parental para producir toda o casi toda la progenie masculina. Como se usa en la presente, la expresión "secuencia genómica esencial de la hembra" abarca cualquier secuencia genómica o gen específico del insecto hembra. Los ejemplos de una secuencia genómica esencial de la hembra incluyen un gen de determinación del sexo o una variante de empalme específica de la hembra, un gen o una variante de empalme de un gen que no se encuentra en el macho, un gen o una variante de empalme de un gen esencial para el desarrollo gonadal de la hembra, y/o un gen o una variante de empalme de un gen que no es esencial para la viabilidad masculina. Con referencia a la Figura 1B, los ejemplos no taxativos de secuencias genómicas esenciales de la hembra incluyen los exones específicos de las hembras en los genes de *Drosophila* para la determinación del sexo *Sxl*, *Tra* y *Dsx*, incluidos homólogos, ortólogos y parálogos de estos. Como se usa en la presente, el término "homólogo" se refiere al gen comparable de un organismo que se encuentra en otro organismo que confiere la misma función. Como se usa en la presente, los términos "ortólogos" y "parálogos" se refieren a tipos de homólogos. Los ortólogos son genes correspondientes en diferentes linajes y son el resultado de la especiación, y los parálogos son el resultado de una duplicación de genes.

15 La regulación y el empalme alternativo específico del sexo mediado por la proteína TRA o el complejo TRA/TRA-2 en insectos es conocido y abordado en Pane *et al.*, *Development* 129: 3715-3725 (2002). Los productos de empalme específicos de macho y hembra del gen *Dsx* son conocidos y abordados en Suzuki *et al.*, *Insect Biochem Mol Biol* 31: 1201-1211 (2001), Salvemini *et al.*, *BMC Evol. Biol.* 11, 41 (2011) y Scali *et al.*, *J. Exp. Biol.* 208, 3701-3709 (2005).

20 En algunos aspectos de la presente descripción, un método para dirigir el sexado masculino incluye introducir una endonucleasa en un primer insecto parental e integrar al menos una construcción de secuencia de ácido nucleico en el genoma del segundo insecto parental, donde la secuencia de ácido nucleico tiene al menos un primer polinucleótido guía que se dirige a una secuencia de nucleótidos en una secuencia genómica esencial de la hembra seleccionada de exones específicos de hembras en los genes *Tra* y/o *Dsx*, incluidos homólogos, ortólogos o parálogos de estos, donde el primer insecto parental y el segundo insecto parental se aparean para producir toda o casi toda la progenie masculina.

En algunos aspectos de la presente descripción, un método para producir huevos de insectos macho estériles incluye introducir una endonucleasa en un primer insecto parental e integrar al menos una construcción de secuencia de ácido nucleico en un genoma de un segundo insecto parental, donde la al menos una construcción de secuencia de ácido nucleico tiene al menos un primer polinucleótido guía que se dirige a una secuencia genómica esencial de la hembra requerida para la viabilidad o desarrollo específico de la hembra y al menos un segundo polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica de esterilidad masculina que se requiere para la fertilidad del macho, y el apareamiento del primer insecto parental y el segundo insecto parental para producir toda o casi toda la progenie masculina. Como se usa en la presente, la expresión "secuencia genómica de esterilidad masculina" se refiere a cualquier secuencia genómica específica del macho requerida para la fertilidad masculina en un insecto que no afecta el desarrollo del insecto macho o la viabilidad del insecto macho. Los ejemplos no taxativos de una secuencia genómica específica del macho requerida para la fertilidad del macho en un insecto incluyen los genes β Tubulin 85D (β Tub), cebollas borrosas (Fzo), protamina A (ProtA) y detención de espermatozoides (Sa) y homólogos, ortólogos, y parálogos de estos. En algunos aspectos, la construcción de la secuencia de ácido nucleico incluye uno o más segundos polinucleótidos guía que se dirigen a una o más secuencias genómicas específicas de machos requeridas para la fertilidad del macho. La conservación funcional de la β Tubulin 85D que incluye *Anopheles* y *Aedes aegypti* se describe en Catteruccia *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 23, 1414-1417 (2005) y Smith *et al.*, *Insect Mol. Biol.* 16, 61-71 (2007).

45 Como comprenderá un experto en la técnica, muchos genes importantes para la viabilidad de la hembra y la fertilidad del macho pueden seleccionarse como objetivo. La inactivación de genes adicionales específicos de insectos hembra/macho se analiza en Akbari *et al.*, *G3* 3, 1493-1509 (2013) y Papa *et al.*, (2016) doi:10.1101/081620.

50 En algunos aspectos de la presente descripción, los insectos modificados genéticamente y los métodos para generar los insectos modificados genéticamente incluyen insectos del orden *Diptera*, *Lepidoptera* o *Coleoptera*.

En algunos aspectos de la presente descripción, los insectos modificados genéticamente y los métodos para generar los insectos modificados genéticamente incluyen un insecto seleccionado de un mosquito de los géneros *Stegomyia*, *Aedes*, *Anopheles* o *Culex*. De estos géneros, los ejemplos de especies de mosquitos incluyen *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus triseriatus* (*Aedes triseriatus*), *Anopheles stephensi*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Anopheles freeborni*, especies de *Culex*, o *Culiseta melanura*.

60 Además, se han desarrollado cepas que expresan Cas9 en los principales vectores de enfermedades del dengue y la malaria, incluidos *Ae. aegypti*, *Anopheles gambiae* y *Anopheles stephensi*, como se describe respectivamente en Li *et al.*, (2017) doi:10.1101/156778, Hammond *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 34, 78-83 (2016) y Gantz *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E6736-43 (2015).

65 En algunos aspectos, los insectos modificados genéticamente y los métodos para generar los insectos modificados genéticamente incluyen cualquier insecto seleccionado de uno de los siguientes: mosca de la fruta teñida seleccionada de la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*), mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsalis*), mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), mosca del melón

(*Bactrocera cucurbitae*), mosca natal de la fruta (*Ceratitis rosa*), mosca de la cereza (*Rhagoletis cerasi*), mosca de la fruta de Queensland (*Bactrocera tyroni*), mosca del durazno (*Bactrocera zonata*), mosca de la fruta del Caribe (*Anastrepha suspensa*), mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsalis*), mosca de las indias occidentales (*Anastrepha obliqua*), gusano barrenador del Nuevo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*), gusano barrenador del Viejo Mundo (*Chrysomya bezziana*), mosca de las ovejas australianas/mosca de botella verde (*Lucilia cuprina*), gusano rosado del algodón (*Pectinophora gossypiella*), polilla gitana europea (*Lymantria dispar*), gusano de ombligo naranja (*Amyelois transitella*), barrenador del tallo del durazno (*Anarsia lineatella*), barrenador del tallo de arroz (*Tryporyza incertulas*), mariposas nocturnas, *Heliothinae*, escarabajo japonés (*Papilla japonica*), escarabajo de borde blanco (*Graphognatus* spp.), gorgojo del algodón (*Anthonomous grandis*), escarabajo de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), cochinilla harinosa de la vid (*Planococcus ficus*), psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii*), francotirador verde azulado (*Graphocephala atropunctata*), chicharrita de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis*), polilla marrón de la manzana (*Epiphyas postvittana*), chinche pintada (*Bagrada hilaris*), chinche apestoso (*Halyomorpha halys*), polilla gitana asiática seleccionada del grupo de *Lymantria dispar asiatica*, *Lymantria dispar japonica*, *Lymantria albescens*, *Lymantria umbrosa* y *Lymantria postalba*, escarabajo asiático de antenas largas (*Anoplophora glabripennis*), escarabajo rinoceronte del coco (*Oryctes rhinoceros*), barrenador esmeralda del fresno (*Agilus planipennis*), polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana*), polilla gitana europea (*Lymantria dispar*), falsa polilla de la manzana (*Thaumotobia leucotreta*), hormigas coloradas seleccionadas de *Solenopsis invicta* Buren, y *S. richteri* Forel, oruga del Viejo Mundo (*Helicoverpa armigera*), mosca linterna con manchas (*Lycorma delicatula*), abejas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), barrenador de brote y fruta (*Leucinodes orbonalis*), gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica* spp.), gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), mosca doméstica (*Musca domestica*), mosca de botella verde (*Lucilia cuprina*), gusano de seda (*Bombyx mori*), piojo rojo de California (*Aonidiella aurantia*), gusano del corazón del perro (*Dirofilaria immitis*), gorgojo del pino (*Dendroctonus frontalis*), trips del aguacate (*Thysanoptera* spp.), éstridos seleccionados de *Oestridae* spp. y *Dermatobia hominis*), mosca de caballo (*Tabanus sulcifrons*), mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*), mosca de gusano barrenador seleccionada de *Cochliomyia macellaria* (*C. macellaria*), *C. hominivorax*, *C. aldrichi*, o *C. minima*, mosca stés-tsé (*Glossina* spp.), mosca del gorjeo seleccionada de *Hypodermabovis* o *Hypoderma lineatum*, mosca linterna con manchas (*Lycorma delicatula*), escarabajo Khapra (*Trogoderma granarium*), ácaro de la abeja (*Varroa destructor*), isópteros (*Coptotermes formosanus*), pulgón de la tsuga (*Adelges tsugae*), escarabajo de la rama del nogal (*Pityophthorus juglandis*), avispa taladora de madera de pino Europea (*Sirex noctilio*), gusano rosado (*Pectinophoras cutigera*), araña roja (*Tertanychus urticae*), palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), oruga del tabaco (*Spodoptera litura*), gorgojo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*), pulgón verde del melocotonero (*Myzus persicae*), pulgón del algodón (*Aphis gossypii*) saltamontes marrón (*Nilaparva talugens*), gardama (*Spodoptera exigua*), trips de las flores (*Frankliniella occidentalis*), carpocapsa (*Cydia pomonella*) gorgojo del caupí (*Callosobruchus maculatus*), pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum*), polilla del tomate (*Tuta absoluta*), trips de la cebolla (*Thrips tabaci*), gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*).

En algunos aspectos de la presente descripción, una endonucleasa adecuada incluye una endonucleasa de secuencia 9 (Cas9) asociada a CRISPR o una variante de esta, una endonucleasa de secuencia 13 (Cas13) asociada a CRISPR o una variante de esta, una endonucleasa de secuencia 6 (Cas6) asociada a CRISPR o una variante de esta, una endonucleasa CRISPR de Prevotella y Francisella 1 (Cpf1) o una variante de esta, o una endonucleasa CRISPR de Microgenomates y Smithella 1 (Cms1) o una variante de esta.

En algunos aspectos de la presente descripción, una endonucleasa adecuada incluye una Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), una Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), una Cas9 de *Francisella novicida* (FnCas9) o una variante de estas. Las variantes pueden incluir un motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) SpCas9 (xCas9), SpCas9 de alta fidelidad (SpCas9-HF1), SaCas9 de alta fidelidad o FnCas9 de alta fidelidad.

En otros aspectos de la presente descripción, la endonucleasa comprende una nucleasa de fusión Cas que comprende una proteína Cas9 o una variante de esta fusionada con una nucleasa FokI o una variante de esta. Las variantes de la proteína Cas9 de esta nucleasa de fusión incluyen una Cas9 catalíticamente inactiva (p. ej., Cas9 muerta).

En algunos aspectos de la presente descripción, la endonucleasa puede ser una proteína Cas9, Cas13, Cas6, Cpf1, CMS1, o cualquier variante de estas que se derive o exprese de *Methanococcus maripaludis* C7, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium efficiens* YS-314, *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* R, *Corynebacterium kroppenstedtii* (DSM 44385), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Nocardia farcinica* IFM10152, *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Rhodococcus jostii* RHA1, *Rhodococcus opacus* B4 (uid36573), *Acidothermus cellulolyticus* 11B, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, *Kribbella flavida* (DSM 17836, uid43465), *Thermomonospora curvata* (DSM43183), *Bifidobacterium dentium* Bd1, *Bifidobacterium longum* DJO10A, *Slackia heliotrinireducens* (DSM 20476), *Persephonella marina* EX H1, *Bacteroides fragilis* NCTC 9434, *Capnocytophaga ochracea* (DSM 7271), *Flavobacterium psychrophilum* JIP02 86, *Akkermansia muciniphila* (ATCC BAA 835), *Roseiflexus castenholzii* (DSM 13941), *Roseiflexus* RS1, *Synechocystis* PCC6803, *Elusimicrobium minutum* Pei191, filotipo de bacterias de grupo 1 termita sin cultivar Rs D17, *Fibrobacter succinogenes* S85, *Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Listeria innocua*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Streptococcus agalactiae*-5-A909, *Streptococcus agalactiae* NEM316, *Streptococcus agalactiae* 2603, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis* GGS 124, *Streptococcus equi zooepidemicus* MGCS10565, *Streptococcus gallolyticus* UCN34 (uid46061), *Streptococcus*

gordonii Challis subcepa CH1, *Streptococcus mutans* NN2025 (uid46353), *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, *Streptococcus pyogenes* MGAS5005, *Streptococcus pyogenes* MGAS2096, *Streptococcus pyogenes* MGAS9429, *Streptococcus pyogenes* MGAS10270, *Streptococcus pyogenes* MGAS6180, *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus pyogenes* SSI-1, *Streptococcus pyogenes* MGAS10750, *Streptococcus pyogenes* NZ131, *Streptococcus thermophiles* CNRZ1066, *Streptococcus thermophiles* LMD-9, *Streptococcus thermophiles* LMG 18311, *Clostridium botulinum* A3 Loch Maree, *Clostridium botulinum* B Eklund 17B, *Clostridium botulinum* Ba4 657, *Clostridium botulinum* F Langeland, *Clostridium cellulolyticum* H10, *Fingoldia magna* (ATCC 29328), *Eubacterium rectale* (ATCC 33656), *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma mobile* 163K, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma synoviae* 53, *Streptobacillus moniliformis* (DSM 12112), *Bradyrhizobium* BTAi1, *Nitrobacter hamburgensis* X14, *Rhodopseudomonas palustris* BisB18, *Rhodopseudomonas palustris* BisB5, *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1, *Dinoroseobacter shibae*. DFL 12, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 FAPERJ, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 JGI, *Azospirillum* B510 (uid46085), *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 11170), *Diaphorobacter* TPSY (uid29975), *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2, *Neisseria meningitidis* 053442, *Neisseria meningitidis* alpha14, *Neisseria meningitidis* Z2491, *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638, *Campylobacter jejuni* doyley 269 97, *Campylobacter jejuni* 81116, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* RM2100, *Helicobacter hepaticus*, *Wolinella succinogenes*, *Tolumonas auensis* DSM 9187, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c, *Shewanella pealeana* (ATCC 700345), *Legionella pneumophila* Paris, *Actinobacillus succinogenes* 130Z, *Pasteurella multocida*, *Francisella tularensis novicida* U112, *Francisella tularensis holarctica*, *Francisella tularensis* FSC 198, *Francisella tularensis*, *Francisella tularensis* WY96-3418, o *Treponema denticola* (ATCC 35405).

Con referencia a las Figuras 4A-4C, la competitividad de apareamiento de los machos estériles producidos mediante los métodos pgSIT de acuerdo con aspectos de la presente descripción, indican que estos machos estériles son capaces de aparearse con éxito y son capaces de competir con éxito por parejas hembras en la naturaleza. Además, con referencia a las Figuras 4D-4E, el tiempo de vida de los machos estériles producidos mediante los métodos pgSIT de acuerdo con aspectos de la presente descripción indican que estos machos estériles tienen una esperanza de vida (en cantidad total de días) que es al menos tan larga, si no más larga, que la de los correspondientes machos de tipo salvaje. La competitividad de apareamiento y la longevidad son factores dominantes para lograr la eliminación local, ya que una vez que se ha logrado la supresión o reducción inicial, los recursos larvarios son abundantes y, por lo tanto, un mayor consumo de formas inmaduras liberadas tiene menos impacto. Las liberaciones de huevos dan como resultado una rápida supresión o reducción de la población desde el principio, ya que las larvas que eclosionan consumen recursos que de otro modo estarían disponibles para las larvas fértiles. Además, de acuerdo con aspectos de la presente descripción, tras su liberación en la naturaleza los huevos macho estériles pgSIT pueden resultar en la eclosión de larvas, ya que la letalidad de la hembra ocurre durante las etapas embrionaria/larval, lo que resulta en un consumo máximo de recursos larvarios por las formas inmaduras liberadas.

Además, los métodos pgSIT descritos en la presente no se basan en translocaciones cromosómicas, quimioesterilizantes, irradiación, antibióticos o infecciones bacterianas, que pueden comprometer gravemente la aptitud y la competitividad de apareamiento de los machos estériles liberados.

Con referencia a las Figuras 4F-4K, utilizando el marco de simulación MGDive como se describe en el Ejemplo 5 en la presente, las liberaciones semanales simuladas de pgSIT de 200 huevos macho estériles por adulto salvaje indican una amplia gama de valores de parámetros para los cuales la eliminación de *Ae. aegypti* se logra de forma confiable.

Con referencia a la Figura 5, los métodos para suprimir o reducir las poblaciones de insectos de especies de insectos que incluyen vectores de enfermedades y plagas agrícolas incluyen la introducción de huevos macho estériles producidos mediante los métodos pgSIT de la presente descripción en un área que necesita la supresión o reducción de insectos.

Algunos aspectos de la presente descripción incluyen el desarrollo de una instalación de cría para la propagación de cepas que expresan ARNgd y endonucleasa homocigótica (p. ej., Cas9) por separado. En algunos aspectos, se implementa un procedimiento automatizado para clasificar por sexo las etapas inmaduras (p. ej., hembras Cas9 con machos de ARNgd) y combinarlas en jaulas para la maduración, apareamiento y propagación de huevos. La clasificación por sexo se puede lograr de diversas formas adecuadas, incluida mediante la separación mecánica por tamaños, la plataforma copas de clasificación automática por sexo (Union Biometrica) combinada con una cepa de sexado genético o la clasificación óptica robótica automatizada. Los métodos adecuados de clasificación por sexos se abordan en Papatianos *et al.*, *Transgenic insects: techniques and applications* 83–100, (octubre de 2014) y Gilles *et al.*, *Acta Trop.* 132, S178-S187 (2014).

En algunos aspectos, los métodos pgSIT para la producción de huevos macho estériles son particularmente efectivos para las especies de insectos con una diapausa durante la etapa de huevo. Los insectos que tienen una diapausa durante la etapa de huevo, incluyen, por ejemplo, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*, como se describe en Diniz *et al.*, *Parasit. Vectors* 10, 310 (2017). Esta diapausa permitiría la acumulación graduable de huevos para liberaciones inundativas. Por consiguiente, como se muestra en general en la Figura 5, una sola instalación para la producción de huevos derivados de pgSIT eficiente puede distribuir huevos derivados de pgSIT a muchos sitios de campo remotos en todo el mundo, donde simplemente pueden incubarse, criarse y liberarse, eliminando o reduciendo la carga logística de la clasificación manual por sexo, la esterilización y la liberación de machos adultos frágiles en cada ubicación de

campo, lo que aumenta la escalabilidad y la eficiencia y permite una mayor capacidad de supresión o reducción de la población a gran escala.

5 Los siguientes ejemplos se presentan únicamente con fines ilustrativos y no limitan el alcance o contenido de la presente solicitud.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1. Masculinización/Letalidad de la hembra inducida por CRISPR binarios, o infertilidad del macho.** Para diseñar pgSIT, se generaron líneas de expresión de ARN guía único (ARNgs) y spCas9 (en adelante Cas9) en *Drosophila*. En total, se desarrollaron nueve líneas de ARNgs homocigotas para seleccionar como objetivo genes esenciales para la viabilidad de la hembra, o genes importantes para la fertilidad del macho. Para la viabilidad de la hembra, estos genes incluyeron genes de determinación del sexo empalmados alternativamente y específicos del sexo, incluidos *sex lethal* (*Sxl*, dos líneas transgénicas separadas -ARNgs^{Sxl}, ARNgs^{Sxl-B}), *transformer* (*tra*, dos líneas separadas - ARNgs^{Tra}, ARNgs^{Tra-B}), o *doublesex* (*dsxF*, ARNgs^{DsxF}) como se muestra en las Figuras 1B-1C y se describe en Slee y Bownes, Q. Rev. Biol. 65, 175-204 (1990); Bell *et al.*, Cell 65, 229-239 (1991); Boggs *et al.*, Cell 50, 739-747 (1987), y Burtis y Baker, Cell 56, 997-1010 (1989). Para interrumpir la fertilidad del macho, se seleccionaron como objetivo genes activos durante la espermatogénesis, tales como *βTubulin 85D* (*βTub*, ARNgs^{βTub}), *cebollas borrosas* (*fzo*, ARNgs^{Fzo}), *protamina A* (*ProtA*, ARNgs^{ProtA}) o *la detención de espermatozoides* (*sa*, ARNgs^{Sa}) como se muestra en la Figura 1C y se describe en Kempthues *et al.*, Cell 21, 445-451 (1980), Hales y Fuller, Cell 90, 121-129 (1997), Kanippayoor *et al.*, Spermatogenesis 3, e24376 (2013), y Lim *et al.*, Spermatogenesis 2, 158-166 (2012). Para promover la expresión contundente de Cas9, se establecieron tres líneas de expresión de Cas9 homocigóticas bajo el control de dos fuertes promotores específicos predominantemente de la línea germinal, incluidos *nanos* (*nos-Cas9*) o *vasa* (*vas-Cas9*) como se describe en Sano *et al.*, Mech. Dev. 112, 129-139 (2002) y Doren *et al.*, Curr. Biol. 8, 243-246 (1998). Además, el promotor ubicuo *Ubiquitin 63E* (*Ubi-Cas9*) <https://paperpile.com/c/cKXxhc/zEwAO> como se describe en Akbari *et al.*, BMC Cell Biol. 10, 8 (2009) e ilustrado en la Figura 1D se estableció para permitir una expresión contundente tanto en los tejidos somáticos como los de línea germinal durante casi todas las etapas de desarrollo de la vida. Se insertaron un péptido T2A autoescindible y una secuencia codificante de eGFP en dirección (3') al Cas9 impulsado por el promotor, sirviendo juntos como un indicador visual de la actividad del promotor como se muestra en las Figuras 1C-1D y se describe en Li *et al.*, (2017). doi:10.1101/156778.

Para evaluar la actividad genética de las líneas ARNgs, cada cepa se cruzó con *nos-Cas9*, y se analizó la progenie F₁ transheterocigótica resultante. De estos cruces 4/9 de los ARNgs, incluidos ARNgs^{Sxl}, ARNgs^{Tra}, ARNgs^{DsxF}, ARNgs^{βTub}, mostraron los fenotipos esperados y se sometieron a una caracterización adicional. Para evaluar más a fondo estos cuatro ARNgs, cada una de estas cuatro cepas seleccionadas se cruzó bidireccionalmente con tipo salvaje *wt* (número de réplicas de cruces entre 10♀ y 10♂, N=24; número de progenie, n=3519), o con homocigotos *nos-Cas9* (N=28, n=3628) como se muestra en la Figura 1F. Con referencia a las Figuras 1E-1F, los cruces *de tipo salvaje* no produjeron desviaciones significativas de la proporción de género ni comprometieron la fertilidad (N=30, n=4371). Continuando con la referencia a las Figuras 1E-1F, independientemente de si *nos-Cas9* fuera heredado por vía materna o paterna, todos los ARNgs^{Sxl}F₁ transheterocigotos heredados fueron 100 % masculinos (N=7, n=540), y el 100 % de las hembras transheterocigotas que heredaron ARNgs^{Tra} o ARNgs^{DsxF} se convirtieron en intersexos estériles masculinizados incapaces de poner huevos (N=14, n=942), y el 100 % de ARNgs^{βTub} de los machos transheterocigotos eran estériles (N=7, n=517). Estos fenotipos se exploraron molecularmente en los locus genéticos diana y todas las moscas secuenciadas (n =16) tenían inserciones/deleciones (indeles) mosaico en los locus diana como se muestra en la Figura 1G.

50 **Ejemplo 2. Creación de poblaciones de hasta un 100 % de machos estériles.** En algunos aspectos de la presente descripción, la metodología pgSIT descrita puede utilizarse para inactivar genes esenciales para la viabilidad de la hembra y/o la esterilidad del macho. En algunos aspectos, la metodología pgSIT descrita puede utilizarse para inactivar de forma concurrente o simultánea genes esenciales para la viabilidad de la hembra y la esterilidad del macho con el fin de conducir genéticamente a la mayoría o a la totalidad (hasta 100 %) de la descendencia superviviente de F₁ a ser machos estériles. Para lograr este sexado y esterilidad dirigidos, se generaron tres cepas homocigotas adicionales que expresan combinaciones de ARNg doble multiplexado (*ARNdg*), que incluyen *ARNdg*^{βTub,Sxl}, *ARNdg*^{βTub,Tra} y *ARNdg*^{βTub,DsxF}, como se muestra en la Figura 1C. Para evaluar genéticamente la actividad de estas cepas pgSIT, cada cepa se cruzó bidireccionalmente con Cas9 (ya sea *nos-Cas9*, *vas-Cas9* o *Ubi-Cas9*) *de tipo salvaje* u homocigota. Con referencia a las Figuras 2A-2B, los cruces *de tipo salvaje* no produjeron desviaciones de género significativas ni comprometieron la fertilidad (N=36, n=5747). Continuando con la referencia a la Figura 2B, los cruces de *ARNdg*^{βTub,Sxl} con cada cepa Cas9 dieron como resultado un 100 % de letalidad de la hembra debido a la inactivación de *sxl*, además de un 100 % de esterilidad masculina debido a la inactivación concurrente o simultánea de *βTub* (N=24, n= 2521). Además, el 100 % de las hembras de los cruces entre cada cepa Cas9 y *ARNdg*^{βTub,Tra} (N=24, n=1697) o *ARNdg*^{βTub,DsxF} (N=24, n=1791) fueron masculinizadas en intersexos estériles debido a la inactivación de *tra* o *dsx*, y el 100 % de la descendencia masculina fue estéril debido a la inactivación concurrente o simultánea de *βTub* (N=48, n=4231). Por consiguiente, con referencia a las Figuras 2A-2C, la metodología pgSIT de la presente descripción produce complejos de Cas9-ARNg altamente activos que no están saturados por ARNgd y producen hasta un 100 % de descendencia de machos adultos estériles de forma reproducible y con una eficacia sin precedentes.

Con respecto al análisis fenotípico de la progenie F1 de los cruces de las Figuras 2A-2C, el 100 % de las hembras con inactivación de *ARNgd^{βTub, Sxl}* perecieron durante las etapas de preadultez y la mayoría murieron durante la transición pupal como se muestra en las Figuras 2D-2E. Para los fenotipos intersexuales, la fertilidad siempre estuvo comprometida, sin embargo, como se muestra en las Figuras 2C y 2F, se observó una expresividad variable ya que el grado de masculinización anatómica varió entre individuos y fue más pronunciado en las inactivaciones de *ARNgd^{βTub, Tra}* en comparación con el *ARNgd^{βTub, Dsx^F}*. Por ejemplo, con referencia a las Figuras 2F y 2H, los intersexos con inactivación de *ARNgd^{βTub, Tra}* tenían peines sexuales con cantidades de cerdas variables y rara vez desarrollaron más de un ovario rudimentario. Además, con referencia a la Figura 2I, desde el punto de vista molecular, los intersexos con inactivación de *ARNgd^{βTub, Tra}* expresaron tanto variantes de empalme alternativas específicas de machos como de hembras del gen *dsx*, presumiblemente debido a la ausencia de *Tra*, que es importante para inhibir el empalme específico de machos y promover el empalme alternativo específico de hembras de *dsx* como se describe en Nagoshi *et al.*, Cell 53, 229-236 (1988). Por el contrario, con referencia a las Figuras 2C, 2F y 2J, no se observó que los intersexos con inactivación de *ARNgd^{βTub, Dsx^F}* desarrollaran peines sexuales, y algunos intersexos tenían ovarios normales que les permitían preñarse, aunque incapaces de poner huevos.

A fin de analizar fenotipos de infertilidad del macho, se visualizó la anatomía de los testículos y espermátides en desarrollo en los machos estériles F₁ mediante una línea transgénica generada que expresa eGFP bajo el control del promotor *βTub85D (βTub-GFP)* para etiquetar fluorescentemente los testículos y esperma como se representa en la Figura 1C. fue sujeto a introgresión con las cepas *ARNgd*. Con referencia a la Figura 2K, cuando se sujetaron a introgresión con *nos-Cas9* homocigota, los machos estériles F₁ con *ARNgd^{βTub, Sxl/+; βTub-GFP}* nos-Cas9 transheterocigotos mostraron glándulas accesorias (ag) y testículos (ts) en espiral completamente desarrollados. Sin embargo, el desarrollo de espermátides en estos machos estériles F₁ fue completamente interrumpido con fenotipos coherentes con informes anteriores de inactivación de *βTub* como se describe en Kempfues *et al.*, Cell 21, 445-451 (1980). Por ejemplo, con referencia a la Figura 2L, solo se identificaron quistes redondos y espermátides tempranos en los testículos (ts) de machos estériles marcados con GFP, mientras que con referencia a la Figura 2M, los testículos (ts) de tipo salvaje tenían quistes marcados con GFP contundentes con espermátides tardías alargadas. Con referencia a la Figura 2F, aunque no se identificaron testículos positivos para GFP en intersexos con inactivación de *ARNgd^{βTub, Tra}* o *ARNgd^{βTub, Dsx^F}* (n>20), en ambos tipos intersexuales estaban presentes órganos parecidos a posibles glándulas accesorias masculinas, como se muestra en las Figuras 2H, 2J y 2K. Para confirmar los cambios moleculares que dieron lugar a fenotipos de inactivación, ambos locus diana de moscas F₁ individuales fueron secuenciados. Con referencia a las Figuras 1G y 2N-2Q, en comparación con las moscas de control (n=32), cada mosca examinada de doble inactivación (n=20) tenía indels en mosaico precisamente en los sitios de escisión que impedían la secuenciación a través de ambos extremos de los amplicones de PCR.

Ejemplo 3. Penetrancia completa resultante de la expresión cigótica. La deposición materna de complejos de Cas9/ARNg en embriones en desarrollo es suficiente para asegurar la herencia no mendeliana de mutaciones en la progenie receptora, incluso si esa progenie no hereda genéticamente los genes que codifican los componentes de edición. Este fenómeno se conoce como efecto materno dominante, como se describe en Lin y Potter, G3 (2016) doi:10.1534/g3.116.034884. En este sentido, se investigó la herencia paterna de uno de los componentes centrales (p. ej., *Cas9* o *ARNgd*), combinada con el depósito materno del componente compatible para determinar si cualquiera de ellos sería suficiente para generar mutaciones hereditarias. Con referencia a las Figuras 1G y 3B, los apareamientos entre padres homocigotos Cas9 y madres heterocigotas que expresan ARNgd no fueron suficientes para inducir mutaciones (n=12), o fenotipos de inactivación (N=6, n=252), en la progenie F₁ que no heredó los ARNgd como un gen. Sin restringirse a ningún mecanismo o teoría en particular, este resultado puede ser causado por un resultado de una semivida corta de ARNgd en ausencia de Cas9 durante el depósito materno. Con referencia a las Figuras 3A y 3C, los apareamientos entre padres heterocigotos Cas9 y madres homocigotas que expresan ARNgd resultaron en fenotipos de esterilidad del macho y letalidad/masculinización de la hembra en toda la progenie F₁ transheterocigota que heredó el gen *Cas9* (N=27, n=2191), mientras que toda la progenie F₁ que heredó solamente los genes que codifican ARNgd mantuvo características normales (N=27, n=2640). Continuando con la referencia a las Figuras 3A y 3C, los cruces entre madres heterocigotas Cas9 y padres homocigotos que expresan ARNgd resultaron en fenotipos de esterilidad del macho y letalidad/masculinización de la hembra en toda la progenie F₁ transheterocigota (N=36, n=3019). Además, con referencia a la Figura 3A, la contribución materna de la proteína Cas9 fue suficiente para inducir fenotipos intersexuales en la progenie que no recibió el gen *Cas9* al dirigirse a *tra* o *dsx* (N=24, n=782), demostrando un efecto materno dominante. Sin embargo, con referencia a las Figuras 3A-3B, la contribución materna de Cas9 solo mediante *Ubi-Cas9* (N=4; n=0, número de hembras supervivientes), pero no *nos-Cas9* ni *vas-Cas9* (N=8, n=556), indujo la letalidad de la hembra *ARNgd^{βTub, Sxl/+; +/-}* lo que indica que la fuerza del promotor puede afectar la eficacia de la mutación. Con referencia a las Figuras 1G y 3B, a pesar de la falta de fenotipos de letalidad en las hembras que recibieron la proteína Cas9 cargada por vía materna de *nos-Cas9* y que recibieron el gen *ARNgd^{βTub, Sxl}*, estas hembras supervivientes tenían indels en mosaico en el locus *Sxl* (n=2). De manera similar, con referencia a las Figuras 1G y 3A-3B, toda la progenie masculina que heredó solo los genes *ARNgd* (N=36, n=1490), y tenía proteína Cas9 cargada por vía materna, fue fértil para todas las cepas Cas9 indicadas, aunque cada macho genotipado (n=6) tenía indels en mosaico en el locus *βTub*. De acuerdo con la presente descripción, como se muestra en la Figura 3D, la herencia paterna de un polinucleótido guía (p. ej., un ARNg) junto con el depósito materno de la endonucleasa (p. ej., Cas9) en embriones en desarrollo, en ausencia de Cas9 heredado como gen, es suficiente para inducir un mosaicismismo bialélico detectable.

Ejemplo 4. Los machos pgSIT compiten sexualmente por parejas y su supervivencia no se reduce. Con referencia a la Figura 4A, para evaluar la aptitud general y de apareamiento de los machos pgSIT que tienen inactivaciones precisas de genes individuales necesarios para la viabilidad específica de la hembra y la maduración de la espermatide, se implementó un ensayo de competencia de apareamiento y se calcularon las curvas de supervivencia estimadas. Con referencia a las Figuras 4B-4C, los machos generados por pgSIT pudieron cortejar, aparearse y competir con éxito con los machos *de tipo salvaje*. Continuando con la referencia a las Figuras 4B-4C, la reducción de la tasa de eclosión de los huevos observada del $47,9\% \pm 13,8\%$ para un macho *de tipo salvaje* junto con un macho pgSIT frente a $85,1\% \pm 13,5\%$ para dos machos *de tipo salvaje* ($N=5$, $P>0,003$) o $87,6\% \pm 7,2\%$ para un macho *de tipo salvaje* ($N=5$, $P>0,001$) fue coherente con una competitividad de apareamiento del 78 % para los machos pgSIT en relación con los machos *de tipo salvaje*. Con referencia a la Figura 4D, la longevidad (p. ej., la esperanza de vida) no se vio comprometida en los machos pgSIT en comparación con los machos *de tipo salvaje*. Además, como Lin y Potter informaron, G3 (2016) doi:10.1534/g3.116.034884, se sabe que la Cas9 depositada por vía materna afecta el fenotipo de la progenie, dos tipos de machos pgSIT - uno con Cas9 heredada por vía paterna y la otra Cas9 por vía materna - se consideraron por separado. Con referencia a las Figuras 4D-4E, la mediana del tiempo de supervivencia para los machos *de tipo salvaje* se estimó en $32,3 \pm 1,3$ días ($N=5$, $n=275$) mientras que la mediana de los tiempos de supervivencia de los machos pgSIT fue $52,7 \pm 1,6$ ($N=5$, $n=220$) y $53,7 \pm 0,9$ días ($N=5$, $n=275$) para los machos portadores de Cas9 paterna y Cas9 materna, respectivamente. Con referencia a la Figura 4D, ambos de estos machos pgSIT Cas9 sobrevivieron significativamente más tiempo que los machos *de tipo salvaje* ($P<2,2^{-16}$), mientras que no se identificaron diferencias significativas entre la esperanza de vida (tiempo de supervivencia medido en días) para estos dos tipos de machos pgSIT. Teniendo en cuenta que se informaron diferentes medianas del tiempo de supervivencia para los machos de tipo salvaje de *Drosophila*, por ejemplo, 35,5 días (informado en Tatar *et al.*, Science 292, 107-110 (2001) y 57 días (informado en Clancy *et al.*, Science 292, 104 -106 (2001) y Lin *et al.*, Science 282, 943-946 (1998), se sabe que las condiciones de reproducción, tales como la composición de los alimentos, la temperatura, etc., afectan el tiempo de supervivencia. Como la mediana del tiempo de supervivencia de los machos pgSIT es comparable al mayor tiempo de supervivencia informado para los machos *de tipo salvaje* y los machos pgSIT muestran una competitividad de apareamiento del 78 %, ni la supervivencia (p. ej., la esperanza de vida) ni la competitividad de apareamiento se ven comprometidas en los insectos macho pgSIT modificados genéticamente producidos de acuerdo con los métodos de la presente descripción.

Ejemplo 5. El potencial de pgSIT para suprimir o reducir las poblaciones de mosquitos supera al de los métodos actuales.

Para evaluar cómo las metodologías pgSIT de la presente descripción se comparan con las tecnologías de supresión o reducción autolimitantes actualmente disponibles (p. ej., RIDL, fsRIDL e IIT), se simularon esquemas de liberación para cada una de estas tecnologías utilizando el marco de simulación MGDriVE como se describe en Sánchez. *et al.*, (2018), doi:10.1101/350488. Este marco de simulación modela las etapas de vida del huevo, la larva, la pupa y el mosquito adulto con generaciones superpuestas, la mortalidad larvaria aumenta con la densidad larvaria y una estructura de apareamiento en la que las hembras retienen el material genético del macho adulto con el que se aparean durante la vida adulta. Con referencia a la tabla de la Figura 4F, el marco de simulación se programó para liberaciones en una población de mezcla aleatoria que consiste en 10.000 mosquitos hembra adultos, con el modelo y los parámetros de intervención indicados.

Con referencia a las Figuras 4F-4G, se simularon liberaciones semanales de machos adultos para RIDL e IIT y se simularon huevos para fsRIDL y pgSIT durante un período de 6 meses. Las proporciones de liberación de adultos fueron de 10 machos adultos RIDL/IIT por adulto salvaje, siguiendo el precedente de un ensayo de campo de RIDL de mosquitos *Ae. aegypti* en Brasil como se describe en Carvalho *et al.*, (2015) (*supra*), y las proporciones de liberación de huevos fueron de 200 huevos por adulto de tipo salvaje, dado que las hembras *Aedes (Ae) aegypti* producen aproximadamente 20 huevos por día en climas templados como se describe en Otero *et al.*, 2006 (*supra*). Los resultados de estas simulaciones sugieren que los sistemas mediante los que se liberan huevos (p. ej., PgSIT y fsRIDL) dan como resultado la supresión o reducción más rápida de la población en las primeras tres semanas, ya que los huevos liberados eclosionan rápidamente como larvas y reducen la supervivencia de larvas fértiles como consecuencia de la competencia larvaria en función de la densidad. El enfoque pgSIT muestra la mayor supresión o reducción a partir del final del primer mes y el mayor potencial para eliminar la población durante el período de liberación. Esto se debe a la mayor competitividad de apareamiento de los machos pgSIT (78 % de la de los machos *de tipo salvaje*) véase los machos fsRIDL (aproximadamente 5 % el de los machos *de tipo salvaje*, con base en ensayos de campo de RIDL en las Islas Caimán y Brasil) (Harris *et al.*, 2011 y Carvalho *et al.*, 2015, respectivamente) (*supra*), que se convierte en un factor dominante en bajas densidades de población cuando el mayor consumo de recursos larvarios por parte de las formas inmaduras liberadas tiene menos impacto en la supresión o reducción. La supresión o reducción de la población resultante de las liberaciones de 10:1 de machos adultos RIDL siguen las huellas de las liberaciones de huevos fsRIDL por 2 a 3 semanas debido a la demora en el impacto sobre la competencia larvaria en función de la densidad; pero es similar en magnitud. Las liberaciones equivalentes de machos adultos mediante IIT tienen menos impacto para la estrategia simulada porque la incompatibilidad del macho se induce a través de la infección por *Wolbachia* y la posibilidad de una liberación no intencionada de hembras infectadas con *Wolbachia* que interfieren con la supresión o reducción se reduce mediante la irradiación de bajo nivel, como se informa en Zhang *et al.*, 2015¹ y Zhang *et al.*, 2015² (*supra*), lo que da como resultado que la longevidad de los machos liberados mediante

IIT se reduzca aproximadamente a la mitad, como se informa en Yamada *et al.*, 2014 (*supra*).

Ejemplo 6. Materiales y métodos.

5 **Diseño de sitio diana CRISPR.** Para lograr la letalidad de la hembra y la esterilidad del macho, se eligieron sitios diana para los ARN guía (ARNg) dentro de exones específicos de la hembra de los genes de determinación del sexo, Sex Lethal (Sxl), Transformer (tra) y Doublesex (dsx), y en genes específicos del macho, β Tubulin 85D (β Tub), cebollas borrosas (fzo), Protamina A (ProA) y detención de espermatoцитos (sa), respectivamente. CHOPCHOP v2 (como se describe en Labun *et al.*, Nucleic Acids Res. 44, W272-6 (2016), se utilizó para elegir sitios diana de ARNg de la

10 secuencia especificada en el genoma de *Drosophila* (dm6) para minimizar la escisión fuera del objetivo. Debido al corte y empalme alternativo, las proteínas Sxl y Tra funcionales se producen solo en hembras de *Drosophila*, mientras que dos versiones de la proteína Dsx, (Dsx^F hembra o (Dsx^M macho), se fabrican cada una en el sexo correspondiente como se muestra en la Figura 1B. El ARNg diana para β Tub se eligió en las proximidades del alelo mutante β Tub85D^D (B2t^D) como se informa en Kempnues *et al.*, Cell 21, 445-451 (1980) (*supra*). Las secuencias de sitios diana de ARNg se presentan en la Figura 1C.

Diseño y ensamblaje de las construcciones. Se utilizó el método de ensamblaje enzimático de Gibson para construir todas las construcciones como se describe en Gibson *et al.*, Nat. Methods 6, 343-345 (2009). El plásmido descrito anteriormente que alberga la SpCas9-T2A-GFP con señales de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) que flanquean la secuencia codificante de SpCas9 y el marcador de transformación Opie2-dsRed se utilizó para

20 construir las construcciones de *Drosophila* Cas9 utilizadas en la presente. Este plásmido se utilizó para la transgénesis de *Ae. aegypti* y tenía sitios de acoplamiento piggyBac y attB (Addgene n.º 100608), como se describe en Li *et al.*, (2017) doi:10.1101/156778. El promotor de *Ae. aegypti* se eliminó del plásmido cortando en los sitios de NotI & XhoI y reemplazándolo con el promotor de Nanos (nos) o Ubiquitin-63E (Ubi) o Vasa (vas) como se muestra esquemáticamente en la Figura 1C. Los fragmentos de promotores se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de *Drosophila* mediante los siguientes cebadores: nos-F, nos-R, Ubi-F, Ubi-R, vas-F y vas-R como se enumeran en la

25 Tabla 1. Para generar construcciones con un solo ARNg, se clonó el promotor *Drosophila* U6-3 y el ARN guía con una señal diana, de andamiaje y de terminación (ARNg) en el sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés) entre el gen blanco y un sitio de acoplamiento attB dentro de un plásmido utilizado para la transformación de *D. melanogaster* como se describe en Akbari *et al.*, Curr. Biol. 23, 671-677 (2013). Para el primer plásmido de esta serie, U6-3-ARNg ^{β Tub}, el promotor *Drosophila* U6-3 se amplificó a partir de ADN genómico de *Drosophila* con cebadores U6-1F y U6-2R mientras que el ARNg completo se ensambló por PCR a partir de dos oligonucleótidos ARNg-4R y ARNg-3F ultramer® sintetizados por Integrated DNA Technology (IDT). Para mejorar la eficacia de la terminación de la transcripción de ARNg, en nuestro diseño se utilizó una señal de terminación con 11 timinas. En los plásmidos sucesivos, el promotor U6-3 y el andamiaje de ARNg se amplificaron a partir del plásmido U6-3-ARNg ^{β Tub} mediante la

30 utilización de los oligonucleótidos medios superpuestos diseñados para reemplazar 20 bases que constituyen un ARNg diana (U6-1AF, U6-2A/B/CR, ARNg-3A/B/CF, y ARNg-4AR), y se reemplazan mediante la digestión del mismo plásmido en los sitios AscI y NotI. Para ensamblar el conjunto de plásmidos con ARNg dobles (ARNcd), el promotor U6-3 y el ARNg se amplificaron como un fragmento de los plásmidos de ARNg único (ARNgs) dirigidos a genes de determinación del sexo femeninos con cebadores 2XARNg-5F y 2XARNg-6R, y se clonaron dentro del plásmido U6-3-ARNg ^{β Tub} que se linealizó en un sitio BamHI entre el gen blanco y el promotor U6-3. Cada plásmido de ARNgd tenía el mismo ARNg β Tub que se dirige a β Tub85D y un ARNg diferente que se dirige a Sxl, tra o dsxF expresado independientemente en la misma dirección que se muestra en la Figura 1C. Con referencia a la Figura 1C, los plásmidos de *Drosophila* Cas9 y los plásmidos de ARNg generados para este estudio se depositaron en Addgene.

35 Para construir la construcción de β Tub85D-GFP, se amplificó por PCR un fragmento de 481bp directamente cadena arriba de la secuencia codificante de β Tub a partir de ADN genómico de *Drosophila* con cebadores β Tub-F y β Tub-R y se clonó cadena arriba de GFP en el plásmido blanco del sitio de acoplamiento attB descrito anteriormente.

Tabla 1. Secuencias de cebadores

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')
nos-F	CTCGACGGTCACGGCGGGGCGAATGCGACCGCAAGCTTCGACCGCTTTAAACCCTCGAAATAG
nos-R	GCTCCGGTCGGTCTTATAGTCCATCTGGGGCGAAATCCGGGTCGAAAGTTACGG
ubi-F	TCCAGGTCAGGGGGGCATGTCGACCGCGCCCGCGGAGATCGCGGATGGGCGTGGGG
ubi-R	GCTCCGTCGTGCTTATAGTCCATTTAAATTCGCGGTCAAAATAGACATCTGGA
vas-F	CTCGACGGTCACGGCGGGCAATGTCGACGGCTGCAGCTGGTTGTAGGTGCAGTTGGGCTTC
vas-R	GTAGCTCCGGTGGTCTTATAGTCCATCTGGAAATGATATTTTTTTTAAATTTGGCCCTGGCCCTTC
UB-1F	ATTGGGAATTGGGCAATTTAAATGGCGGGGGCGCGGAAATCTTTTTTGTCCACTGTGA
UB-2R	CTCTAAACCACCTGATGACACACTCAGGCGACGTTAAATTCGAAATAGGTC
gRNA-3F	ATATAAGACCTAATTTCAATTTAAAGTCGCCCTGAGTGTCCATCAGCTGGGTTTAGAGCTAGAAATA GCAAGTTAAATAAGGCTAGTCC
gRNA-4R	CGTCGACACTAGTGGATCTGAGAGGTACCAAAAATAAGGACGGACTGGTGGCCACTTTTCAAG TTGATAACGGACTAGCCTAATTTAACTTCCATTTCTAGCTCTAAAC
UB-1AF	GCTAGCCGATCCGGGAATTCGGAAATGGGCAATTTAAATGGC
UB-2(A-C)R	GCTATTTCTAGCTCTAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCCAGTT
gRNA-3(A-C)F	CGTCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
gRNA-4AR	GCGGCTTCGAGACCGTGACCTACATCGTCCGAC
2XgRNA-5F	TGTATGCTATACGAAGTTATGCTAGCGGATCCGAAATCTTTTTTGGCTCACCTGTGATTGC
2XgRNA-6R	ATTTAAATATTGCCCAATTCGCAATTCGCGGTACCAAAAATAAGGACCGACTGGTGC
βTub-F	GCAATTGGGAATTGGCAATTTAAATGGGGTGGACCCATCCCATATACACCCATAT
βTub-R	GTGAACAGCTCCTCGCCCTTCTCACCATTGTGATAGTAAAGTTAGGGCCCTTTTTCAC
Dsx-RT-1F	CCCGAACATCCGCTGATCACTAGCCCGCC
DsxF-RT-2R	CGCCGGATTTACCCGAAGCATTAAAGCTAATATGTGATGCTG
DsxM-RT-3R	CGATGCTCCGGTAGGTCAGGTACATGGGC

Genética e imágenes de la mosca. Las moscas se mantuvieron en condiciones normales a 25 °C. Las inyecciones de embriones se llevaron a cabo en Rainbow Transgenic Flies, Inc. (<http://www.rainbowgene.com>). Con referencia a la Figura 1C, las construcciones Cas9 y ARNg se insertaron en PBac{y+attP-3B}KV00033 en el tercer cromosoma (Bloomington n.º 9750) y P{CaryP}attP1 en el segundo cromosoma (Bloomington n.º 9750), respectivamente; mientras que la construcción β Tub-GFP se insertó en M{3XP3-RFP.attP}ZH-86Fa en el tercer cromosoma (Bloomington n.º 24486). Las moscas transgénicas se equilibraron con w¹¹¹⁸; CyO/snaSco y w¹¹¹⁸; TM3, Sb¹/TM6B, Tb¹; y se equilibraron doblemente con w¹¹¹⁸; CyO/Sp; Dr¹/TM6C,Sb,Tb¹. β Tub-GFP (en el 3er cromosoma) se equilibró doblemente y se sujetó a introgresión con ARNg ^{β Tub, Sxl}, ARNg β Tub, Tra y ARNg ^{β Tub}, Dsx^F, cada uno en el segundo cromosoma, para generar cepas balanceadas transheterocigotas (ARNgd/CyO; β Tub-GFP/TM6C,Sb,Tb).

Para probar la eficiencia de las inactivaciones y los fenotipos correspondientes causados por ARNGs, se cruzaron siete moscas de cada sexo para generar moscas F1 transheterocigotas ARNGs/+; nos-Cas9/+ para cada combinación de ARNGs; y se examinaron su morfología externa y fertilidad. Ambos transgenes se identificaron en un estereomicroscopio fluorescente con ojos w⁺ (ARNgs, ARNgd) y dsRed (Cas9). Las líneas de ARNGs que causaron fenotipos de inactivación se ensayaron adicionalmente como cepas homocigóticas con moscas nos-Cas9 en ambas direcciones usando 10 moscas ♂ y 10 moscas ♀ para cada cruce de réplica. Las líneas de ARNgd se probaron bidireccionalmente con líneas homocigotas nos-Cas9, vas-Cas9 y Ubi-Cas9. Además, las líneas homocigóticas de ARNGs, ARNgd y Cas9 se cruzaron con moscas w-en ambas direcciones para proporcionar el control de comparación. Para probar el efecto materno dominante no mendeliano de Cas9 cargada como proteína en embriones como se describe en Lin y Potter, G3 (2016) doi:10.1534/g3.116.034884, se cruzaron moscas homocigotas de ARNgd con moscas heterocigotas Cas9; y se compararon fenotipos de progenie Sb ARNgd/+; +/TM3 con Cas9 materno o Cas9 paterno. La progenie F1 a partir de cruces con la Cas9 paterno sirvió como grupo de control para examinar el efecto materno dominante de Cas9. Para probar la fertilidad de moscas inactivadas generadas con y sin el gen Cas9, se cruzaron lotes de 10-20 machos y hembras F1, o intersexos, con 15-20 hembras vírgenes y machos, correspondientemente, de cepas wy/o Cantos S. Tres o cuatro días después del cruce, las moscas se pasaron a viales nuevos y, en una semana, se examinaron ambos viales para detectar la presencia de cualquier progenie viable. La fertilidad de un lote completo se calificó como 100 % cuando se identificaron larvas viables en un vial, o 0 % cuando ninguna progenie eclosionó en ambos viales. Los viales que contenían intersexos y machos de tipo salvaje también se examinaron para detectar la presencia de huevos puestos. Todos los cruces se repitieron como mínimo tres veces para generar medias y desviaciones estándar para las comparaciones estadísticas y así medir la veracidad y solidez de los resultados.

Las moscas se registraron, examinaron y fotografiaron en el estereomicroscopio fluorescente Leica M165FC equipado con la cámara Leica DMC2900. Para generar imágenes de moscas adultas, las imágenes de cepas recopiladas en diferentes placas focales se compilaron en imágenes individuales en Helios Focus 6 y luego se editaron en Adobe Photoshop CS6. Para estudiar las características anatómicas internas de las moscas intersexuales y los machos estériles, los órganos reproductores se diseccionaron en solución salina amortiguada con fosfato, se examinaron y se les tomaron imágenes. Para estimar la variación de los fenotipos de inactivación, se diseccionaron alrededor de 10-20 moscas para cada genotipo probado.

Etapas de desarrollo de letalidad Sxl. Para identificar la etapa de desarrollo en la que mueren las hembras con inactivación de Sxl, se cuantificaron las tasas de eclosión de huevos y muerte de larvas para las moscas transheterocigotas ARNgd ^{β Tub, Sxl/+}; nos-Cas9/+. Para cuantificar la tasa de eclosión del huevo, se establecieron tres cruces de réplicas, cada uno con 20-30 hembras vírgenes homocigotas nos-Cas9 y 10-20 machos ARNgd ^{β Tub, Sxl}, en jaulas de recolección de embriones (Genesee Scientific 59-100) con placas de agar con jugo de uva. Tres jaulas de recolección de embriones con moscas sirvieron como control de comparación. Se contaron lotes de alrededor de 200 huevos puestos de cada jaula de recolección y se les hizo un seguimiento durante más de 36 horas para contar el número de huevos sin eclosionar. Para cuantificar la tasa de muerte de las larvas, se transfirieron dos lotes de 50 larvas que emergieron de cada placa de agar para separar viales de mosca con alimento y se criaron hasta adultos, luego se registró la cantidad y el sexo de los adultos que emergieron. Para cuantificar la letalidad en una etapa de pupa, también se registró la cantidad de pupas muertas para cada vial. Los datos sobre la tasa de eclosión y la letalidad de las pupas hembra de embriones ARNgd ^{β Tub, Sxl/+}; nos-Cas9/+ se presentan en la Tabla 2 y la Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2. Tasa de eclosión de embriones ARNgd ^{β Tub, Sxl/+}; nos-Cas9/+.

Genotipo de la descendencia	Huevos puestos	Huevos eclosionados	Tasa de eclosión
wt	201	190	94,52736318
wt	203	199	98,02955665
wt	216	207	95,83333333
ARNgd ^{βTub, Sxl/+} ; nos-Cas9/+	200	173	86,5
ARNgd ^{βTub, Sxl/+} ; nos-Cas9/+	200	160	80
ARNgd ^{βTub, Sxl/+} ; nos-Cas9/+	200	138	69

Tabla 3. Letalidad de la pupa hembra en embriones ARNgd(β Tub.Sxl)/+; nos-Cas9/+.

Línea	n.º pupas sembradas	♂ emergidas	♀ emergidas	♀ %	% total de muertas	Muertes de pupas	Muertes de pupas	% de muertes de larvas
ARNgd β Tub.Sxl/+; nos-Cas9/+	50	26	0	52,00	0	24	48	0
ARNgd β Tub.Sxl/+; nos-Cas9/+	50	22	0	44,00	0	26	56	4
ARNgd β Tub.Sxl/+; nos-Cas9/+	50	21	0	42,00	0	22	58	14
ARNgd β Tub.Sxl/+; nos-Cas9/+	50	17	0	34,00	0	16	66	34
ARNgd β Tub.Sxl/+; nos-Cas9/+	50	19	0	38,00	0	18	62	26
w-	50	24	19	42,42	57,58	2	34	30
w-	50	15	22	43,54	59,46	9	26	8
w-	50	16	17	48,48	51,52	4	34	26
w-	50	24	17	59,54	41,46	1	18	16
w-	50	17	28	37,78	62,22	1	10	8

RT-PCR de transcripciones de empalme específicas de hembras y machos de Dsx. Para evaluar el efecto de la inactivación de *tra* en el empalme de *dsx*, se analizó el ARNm específico de hembras y machos de *dsx* en intersexos con inactivación de *tra*. El ARN total se extrajo de moscas adultas macho w-, hembra w- e intersexuales con inactivación de *tra* (*ARNg^{βTub, Tra/+}; nos-Cas9/+*) siguiendo el protocolo estándar del kit de aislamiento de miARN MirVana (Ambion). Para eliminar la contaminación del ADN, se trataron 2 µg con TURBO™ DNase utilizando el kit TURBO DNA-free™ (Ambion). Las variantes de empalme hembra y macho de *Dsx* se amplificaron con el kit de SuperScript® III One-Step RT-PCR (Invitrogen) siguiendo el protocolo. El mismo cebador directo, Dsx-RT-1F, y dos cebadores inversos diferentes, DsxF-RT-2R y DsxM-RT-3R (Tabla 1) se utilizaron para amplificar las transcripciones de hembras o machos, respectivamente. Se procesaron 10 µl de productos de PCR en un 1 % de gel de agarosa para probar la especificidad de PCR, y los 40 µl restantes se purificaron con un kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) o, cuando se identificaron bandas dobles en un gel, se purificaron en gel con un kit de ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research), luego se secuenciaron amplicones limpios en ambas direcciones mediante el método Sanger en Source BioScience (<https://www.sourcebioscience.com>).

Genotipado de locus dirigidos con ARNg. Para examinar los cambios moleculares que causaron la letalidad o masculinización de la hembra y la esterilidad del macho en las moscas portadoras de *Cas9* y *ARNg*, se amplificaron y secuenciaron cuatro locus genómicos que incluyen sitios diana para cuatro *ARNg* funcionales (Figura 1C). Se prepararon preparaciones de ADN genómico de mosca única homogeneizando una mosca en 30 µl de un tampón de aplastamiento recién preparado (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl, 200 µg/ml Proteínasa K), incubando a 37 °C durante 35 minutos y calentando a 95 °C durante 2 minutos. Se utilizaron 2 µl de ADN genómico como molde en una reacción de PCR de 40 µl con ADN polimerasa Taq LongAmp® (NEB). Se utilizaron los siguientes cebadores (Tabla 1) para amplificar los locus con los correspondientes objetivos de ARNg: *βTub-1AF* y *βTub-2AR* para *βTubulin 85D*; *Sxl-3BF* y *Sxl-4AR* para *Sex lethal*; *Tra-5F* y *Tra-6R* para *Transformer*; *Dsx-7F* y *Dsx-8R* para *Double sex*. Los productos de PCR se purificaron mediante un kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN) y se secuenciaron en ambas direcciones con el método Sanger en Source BioScience. Para caracterizar los cambios moleculares en los sitios diana, las moscas de secuencia AB1 se alinearon con las secuencias de referencia correspondientes en SnapGene® 4 y/o Sequencher™ 5.

Ensayo de competencia de machos estériles. Para evaluar la competitividad de los machos con inactivación de *βTub* (*ARNg^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+*), se evaluó su capacidad para asegurar el apareamiento con hembras en presencia de machos *de tipo salvaje*. Los machos w- comparten el mismo acervo genético con los machos con inactivación de *βTub* y proporcionan una comparación ideal. Dos machos *de tipo salvaje*, uno *de tipo salvaje*, uno *de tipo salvaje* más uno con inactivación de *βTub*, o dos machos con inactivación de *βTub* se colocaron en un vial de mosca con diez vírgenes w- aisladas en pasta de levadura durante dos días y se dejaron cortejar y aparearse con las hembras durante la noche (12 horas) en la oscuridad. Para aumentar el impulso de cortejo del macho, los machos *ARNg^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* recién emergidos y los *de tipo salvaje* se aislaron de las hembras y envejecieron durante cuatro días antes del ensayo de competencia. Las hembras de *Drosophila* se aparean con varios machos durante su vida; y en ausencia de esperma transferido a la espermateca después de la cópula, la abstinencia de la hembra dura un día después de la cópula, como se describe en Peng *et al.*, Curr. Biol. 15, 207-213 (2005). Por lo tanto, después de 12 horas de apareamiento, todos los machos se retiraron de los viales mientras que las hembras se transfirieron a pequeñas jaulas de recolección de embriones (Genesee Scientific 59-100) con placas de agar con jugo de uva. Se recolectaron tres lotes de huevos en 36 horas y se contaron los huevos sin eclosionar. La disminución de la fertilidad, estimada por un número de huevos sin eclosionar, indicó la capacidad de un macho *ARNg^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+* para lograr apareamientos exitosos con hembras en presencia de un macho *de tipo salvaje*; y así proporcionó una lectura de la competitividad de los machos con inactivación de *βTub*. Se utilizó un solo macho *de tipo salvaje* para probar su capacidad para inseminar a cada una de las diez hembras en 12 horas, y así distinguir entre una competencia real o un efecto de dilución de dos machos *de tipo salvaje*.

Curvas de supervivencia para estimar la longevidad de los machos pgSIT. Para comparar las diferencias en la supervivencia entre machos pgSIT (*ARNg^{βTub, Sxl/+}; nos-Cas9/+*) y machos *de tipo salvaje*, se estimaron las longevidades promedio para tres grupos experimentales de machos. Se trataron dos tipos de moscas pgSIT como grupos experimentales separados: uno portaba Cas9 paterno y el otro Cas9 materno. Se aplicaron cinco réplicas por cada uno de los tres grupos para estimar las curvas de supervivencia. Los machos de cada tipo se recolectaron diariamente y envejecieron en lotes de 20 machos por vial. Cada réplica tenía de 40 a 75 machos conservados en 2 o 4 viales, respectivamente. Se registró la cantidad de moscas muertas cada tres días durante la transferencia de las moscas a un nuevo vial con alimento fresco. Los datos del intervalo de tiempo censurado hasta el evento (p. ej., la muerte) se analizaron para los tres grupos experimentales mediante el cálculo de estimaciones de máxima verosimilitud no paramétricas (NPML, por sus siglas en inglés) de las curvas de supervivencia para cada grupo, implementadas en el paquete R "intervalo" como se describe en Fay. *et al.*, J. Stat. Softw. 36, (2010). El procedimiento de estimación toma en cuenta la incertidumbre introducida por el período de observación de tres días. Se aplicó un bootstrap con 10.000 repeticiones para cuantificar mediana de tiempo de supervivencia y la desviación estándar.

Modelo matemático. Para modelar el rendimiento esperado de pgSIT en la supresión o reducción de poblaciones de *Ae. aegypti* locales en comparación con las tecnologías de liberación o reducción autolimitadas actualmente disponibles - RIDL, fsRIDL e IIT - \ se simuló esquemas de liberación para cada uno utilizando el marco de simulación MGDriVE como se describe en Sánchez *et al.*, 2018, doi:10.1101/350488

(<https://marshalllab.github.io/MGDrivE/>). Este marco modela las etapas de la vida del huevo, la larva, la pupa y el mosquito adulto (se modelan tanto machos como hembras adultos) mediante la implementación de una etapa de tiempo diario, generaciones superpuestas y una estructura de apareamiento en la que los machos adultos se aparean durante toda su vida, mientras que las hembras adultas se aparean una vez que emergen, conservando el material genético del macho adulto con el que se aparean durante toda su vida adulta. Se supone que las tasas de mortalidad independientes de la densidad para las etapas de la vida juvenil son idénticas y se eligen para que sean coherentes con la tasa de crecimiento de la población en ausencia de una mortalidad dependiente de la densidad. La mortalidad adicional dependiente de la densidad ocurre en la etapa larvaria, cuya forma se toma de Deredec *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, E874–80 (2011). Los patrones de herencia para los sistemas pgSIT, RIDL, fsRIDL e IIT se modelan dentro del módulo de herencia del marco MGDrivE <https://paperpile.com/c/cKXxhc/fx0P6> como se describe en Sánchez *et al.*, 2018, doi:10.1101/350488, junto con sus impactos en la esperanza de vida adulta, la competitividad de apareamiento de los machos y el éxito de la pupa. La versión estocástica del marco MGDrivE se implementó para capturar los efectos aleatorios en tamaños de población bajos y el potencial de eliminación de la población. Se simuló liberaciones semanales durante un período de 6 meses en una población de mezcla aleatoria que consistía en 10.000 hembras adultas en equilibrio, con antecedentes de vida de *Ae. aegypti*, y los valores de los parámetros de intervención enumerados en la tabla de la Figura 4F.

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó en JMP 8.0.2 por el SAS Institute Inc. Se utilizaron de tres a cinco réplicas biológicas para generar medias estadísticas para las comparaciones. Se calcularon los valores de p para una prueba t de Student de dos muestras con varianza desigual. Para probar la significación de la esterilización del macho, se utilizaron las pruebas Chi-cuadrado de Pearson para tablas de contingencia para calcular los valores de P . Para probar las diferencias entre las curvas de supervivencia inferidas, se usó la generalización de Sun de la prueba de orden logarítmico como se describe en Sun, Stat. Med. 15, 1387-1395 (1996). Además, se realizaron pruebas post-hoc por pares de diferencias entre los dos grupos de pgSIT con corrección de Bonferroni moderada.

Datos depositados. Las secuencias plasmídicas completas anotadas y el ADN plasmídico están disponibles públicamente para realizar pedidos en Addgene. Las moscas transgénicas se han puesto a disposición para realizar pedidos en Bloomington *Drosophila* Stock Center.

REIVINDICACIONES

1. Huevos de insecto que comprenden hasta un 100 % de huevos de insecto macho estériles producidos como descendencia de un método que comprende:

- 5 integrar al menos una secuencia de ácido nucleico en un genoma de un primer insecto, comprendiendo la al menos una secuencia de ácido nucleico al menos un primer polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica esencial para la hembra que se requiere para la viabilidad específica de la hembra y al menos un segundo polinucleótido guía dirigido a una secuencia genómica de esterilidad masculina que se requiere para la fertilidad específica del macho,
- 10 en donde la secuencia genómica esencial para la hembra es un gen o una variante de corte y empalme de un gen, siendo el gen seleccionado del grupo que consiste en doublesex (Dsx), sex lethal (Sxl), transformer (Tra), homólogos de estos, ortólogos de estos, parálogos de estos y combinaciones de estos, y
- 15 en donde la secuencia genómica de esterilidad masculina es un gen seleccionado del grupo que consiste en β Tubulin 85D (β Tub), cebollas borrosas (Fzo), protamina A (ProtA) o detención de espermatozoides (Sa); integrar una secuencia de ácido nucleico que codifique una endonucleasa en el genoma de un segundo insecto, pudiendo el segundo insecto cruzarse genéticamente con el primer insecto, en donde la endonucleasa esté dirigida por el al menos un segundo polinucleótido guía para desactivar enzimáticamente la secuencia genómica de esterilidad masculina; y
- 20 cruzar genéticamente el primer insecto y el segundo insecto produciendo así la descendencia de huevos de insecto que comprenden la endonucleasa y la al menos una secuencia de ácido nucleico a partir de la cual los huevos de insecto macho maduran hasta la edad adulta; en donde:
- 25 (a) el insecto es un mosquito de los géneros *Stegomyia*, *Aedes*, *Anopheles* o *Culex*; opcionalmente en donde el mosquito se selecciona del grupo que consiste en *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Ochlerotatus triseriatus* (*Aedes triseriatus*), *Anopheles stephensi*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles quadrimaculatus*, *Anopheles freeborni*, especies de *Culex* y *Culiseta melanura*; o
- 30 (b) el insecto se selecciona del grupo que consiste en: una mosca de la fruta tefrítica seleccionada de la mosca mediterránea de la fruta (*Ceratitis capitata*), mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*), mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsalis*), mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), mosca del melón (*Bactrocera cucurbitae*), mosca natal de la fruta (*Ceratitis rosa*), mosca de la cereza (*Rhagoletis cerasi*), mosca de la fruta de Queensland (*Bactrocera tyroni*), mosca del durazno (*Bactrocera zonata*), mosca de la fruta del Caribe (*Anastrepha suspensa*), mosca oriental de la fruta (*Bactrocera dorsalis*), mosca de las indias occidentales (*Anastrepha obliqua*), gusano barrenador del Nuevo Mundo (*Cochliomyia hominivorax*), gusano barrenador del Viejo Mundo (*Chrysomya bezziana*), mosca de las ovejas australianas/mosca de botella verde (*Lucilia cuprina*), gusano rosado del algodón (*Pectinophora gossypiella*), polilla gitana europea (*Lymantria dispar*), gusano de ombligo naranja (*Amyelois transitella*), barrenador del tallo del durazno (*Anarsia lineatella*), barrenador del tallo de arroz (*Tryporyza incertulas*), mariposas nocturnas, *Heliothinae*, escarabajo japonés (*Papilla japonica*), escarabajo de borde blanco (*Graphognathus* spp.), gorgojo del algodón (*Anthonomus grandis*), escarabajo de la patata de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*), cochinilla harinosa de la vid (*Planococcus ficus*), psílido asiático de los cítricos (*Diaphorina citri*), mosca del vinagre de alas manchadas (*Drosophila suzukii*), francotirador verde azulado (*Graphocephala atropunctata*), chicharrita de alas cristalinas (*Homalodisca vitripennis*), polilla marrón de la manzana (*Epiphyas postvittana*), chinche pintada (*Bagrada hilaris*), chincheapestoso (*Halyomorpha halys*), polilla gitana asiática seleccionada del grupo de *Lymantria dispar* asiática, *Lymantria dispar japonica*, *Lymantria albescens*, *Lymantria umbrosa* y *Lymantria postalba*, escarabajo asiático de antenas largas (*Anoplophora glabripennis*), escarabajo rinoceronte del coco (*Oryctes rhinoceros*), barrenador esmeralda del fresno (*Agrilus planipennis*), polilla del racimo de la vid (*Lobesia botrana*), polilla gitana europea (*Lymantria dispar*), falsa polilla de la manzana (*Thaumotobia leucotreta*), hormigas coloradas seleccionadas de *Solenopsis invicta Buren*, y *S. richteri Forel*, oruga del Viejo Mundo (*Helicoverpa armigera*), mosca linterna con manchas (*Lycorma delicatula*), abejas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), barrenador de brote y fruta (*Leucinodes orbonalis*), gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica* spp.), gusano de la raíz del maíz occidental (*Diabrotica virgifera*), mosca blanca (*Bemisia tabaci*), mosca doméstica (*Musca domestica*), mosca de botella verde (*Lucilia cuprina*), gusano de seda (*Bombyx mori*), piojo rojo de California (*Aonidiella aurantia*), gusano del corazón del perro (*Dirofilaria immitis*), gorgojo del pino (*Dendroctonus frontalis*), trips del aguacate (*Thysanoptera* spp.), éstridos seleccionados de *Oestridae* spp. y *Dermatobia hominis*), mosca de caballo (*Tabanus sulcifrons*), mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*), mosca de gusano barrenador seleccionada de *Cochliomyia macellaria* (*C. macellaria*), *C. hominivorax*, *C. aldrichi*, o *C. minima*, mosca stsé-tsé (*Glossina* spp.), mosca del gorjeo seleccionada de *Hypoderma* spp. o *Hypoderma lineatum*, mosca linterna con manchas (*Lycorma delicatula*), escarabajo *Khapra* (*Trogoderma granarium*), ácaro de la abeja (*Varroa destructor*), isópteros (*Coptotermes formosanus*), pulgón de la tsuga (*Adelges tsugae*), escarabajo de la rama del nogal (*Pityophthorus juglandis*), avispa taladora de madera de pino Europea (*Sirex noctilio*), gusano rosado (*Pectinophora cutigera*), araña roja (*Tertanychus urticae*), palomilla dorso de diamante (*Plutellaxylostella*), oruga del tabaco (*Spodoptera litura*), gorgojo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*), pulgón verde del melocotonero (*Myzuspersicae*), pulgón del algodón (*Aphis gossypii*) saltamontes marrón (*Nilaparvatalugens*), gardama (*Spodoptera exigua*), trips de las flores (*Frankliniella occidentalis*), carpocapsa (*Cydia pomonella*) gorgojo del caupí (*Callosobruchus maculatus*), pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum*), polilla del tomate (*Tuta*

absoluta), trips de la cebolla (*Thrips tabaci*), gusano bellotero del algodón (*Helicoverpa armigera*).

2. Los huevos de insecto de la reivindicación 1, en donde:

- 5 (a) la integración de al menos una secuencia de ácido nucleico en el genoma del primer insecto comprende la integración homocigótica en todas las copias cromosómicas del genoma;
 (b) la integración de la al menos una secuencia de ácido nucleico comprende la introducción de la al menos una secuencia de ácido nucleico en el primer insecto durante una etapa embrionaria;
 10 (c) el al menos un primer polinucleótido guía y el al menos un segundo polinucleótido guía comprenden cada uno al menos un ácido ribonucleico guía (ARNg);
 (d) el al menos un primer polinucleótido guía comprende más de un primer polinucleótido guía, cada uno de los cuales se dirige a una región diferente de la misma secuencia genómica esencial de la hembra que se requiere para la viabilidad específica de la hembra; o
 15 (e) el al menos un primer polinucleótido guía comprende más de un primer polinucleótido guía, cada uno de los cuales se dirige a una secuencia genómica esencial de la hembra diferente que se requiere para la viabilidad específica de la hembra.

3. Los huevos de insecto de la reivindicación 1, en donde el al menos un primer polinucleótido guía comprende más de un primer polinucleótido guía, cada uno de los cuales se dirige a un gen diferente seleccionado del grupo que consiste en Dsx, Sxl, Tra, homólogos de estos, ortólogos de estos y parálogos de estos.

4. Los huevos de insecto de la reivindicación 3, en donde:

- 25 (a) el más de un primer polinucleótido guía comprende dos primeros polinucleótidos guía, cada uno de los cuales se dirige a un gen diferente seleccionado del grupo que consiste en Dsx, Sxl, Tra, homólogos de estos, ortólogos de estos y parálogos de estos; o
 (b) el más de un primer polinucleótido guía comprende dos primeros polinucleótidos guía, cada uno de los cuales se dirige a un gen diferente seleccionado del grupo que consiste en Dsx, Sxl, homólogos de estos, ortólogos de estos o parálogos de estos.

5. Los huevos de insecto de la reivindicación 1, en donde: cuando el segundo insecto es un macho, la integración de la secuencia de ácido nucleico que codifica la endonucleasa en el genoma del segundo insecto comprende la integración homocigótica de un gen que codifica la endonucleasa, y cuando el segundo insecto es una hembra, la integración de la secuencia de ácido nucleico que codifica la endonucleasa en el genoma del segundo insecto comprende la integración homocigótica o heterocigótica de un gen que codifica la endonucleasa.

6. Los huevos de insecto de la reivindicación 1, en donde la integración de la secuencia de ácido nucleico que codifica la endonucleasa en el genoma del segundo insecto comprende la integración de la secuencia de ácido nucleico que codifica la endonucleasa en el genoma del segundo insecto durante una fase embrionaria.

40

7. Los huevos de insecto de la reivindicación 1, en donde:

- 45 (a) la endonucleasa comprende una endonucleasa de secuencia 9 (Cas9) asociada a CRISPR o una variante de esta, una endonucleasa de secuencia 13 (Cas13) asociada a CRISPR o una variante de esta, una endonucleasa de secuencia 6 (Cas6) asociada a CRISPR o una variante de esta, una endonucleasa CRISPR de *Prevotella* y *Francisella* 1 (Cpf1) o una variante de esta, o una endonucleasa CRISPR de *Microgenomates* y *Smithella* 1 (Cms1) o una variante de esta;
 (b) la endonucleasa comprende una Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), una Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), una Cas9 de *Francisella novicida* (FnCas9) o una variante de estas; opcionalmente en donde la variante de estas comprende un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) SpCas9 (xCas9), SpCas9 de alta fidelidad (SpCas9-HF1), una SaCas9 de alta fidelidad o una FnCas9 de alta fidelidad;
 (c) la endonucleasa comprende una nucleasa de fusión Cas que comprende una proteína Cas9 o una variante de esta fusionada con una nucleasa FokI o una variante de esta; opcionalmente en donde la variante de esta comprende una Cas9 catalíticamente inactiva (Cas9 muerta); o
 55 (d) la endonucleasa es una proteína Cas9, Cas13, Cas6, Cpf1, CMS1, o cualquier variante de estas derivada de *Methanococcus maripaludis* C7, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium efficiens* YS-314, *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Corynebacterium glutamicum* R, *Corynebacterium kroppenstedtii* (DSM 44385), *Mycobacterium abscessus* (ATCC 19977), *Nocardia farcinica* IFM10152, *Rhodococcus erythropolis* PR4, *Rhodococcus jostii* RHA1, *Rhodococcus opacus* B4 (uid36573), *Acidothermus cellulolyticus* 11B, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6, *Kribbella flavida* (DSM 17836, uid43465), *Thermomonospora curvata* (DSM43183), *Bifidobacterium dentium* Bd1, *Bifidobacterium longum* DJO10A, *Slackia heliotrinireducens* (DSM 20476), *Persephonella marina* EX H1, *Bacteroides fragilis* NCTC 9434, *Capnocytophaga ochracea* (DSM 7271), *Flavobacterium psychrophilum* JIP02 86, *Akkermansia muciniphila* (ATCC BAA 835), *Roseiflexus castenholzii* (DSM 13941), *Roseiflexus* RS1, *Synechocystis* PCC6803, *Elusimicrobium minutum* Pei191, filotipo de bacterias de grupo 1 termita sin cultivar Rs D17, *Fibrobacter succinogenes* S85, *Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Listeria innocua*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus salivarius* UCC118, *Streptococcus agalactiae*-5-

65

A909, *Streptococcus agalactiae* NEM316, *Streptococcus agalactiae* 2603, *Streptococcus dysgalactiae equisimilis* GGS 124, *Streptococcus equi zooepidemicus* MGCS10565, *Streptococcus galloyticus* UCN34 (uid46061), *Streptococcus gordonii* Challis subcepa CH1, *Streptococcus mutans* NN2025 (uid46353), *Streptococcus mutans*,
 5 *Streptococcus pyogenes* M1 GAS, *Streptococcus pyogenes* MGAS5005, *Streptococcus pyogenes* MGAS2096, *Streptococcus pyogenes* MGAS9429, *Streptococcus pyogenes* MGAS10270, *Streptococcus pyogenes* MGAS6180, *Streptococcus pyogenes* MGAS315, *Streptococcus pyogenes* SSI-1, *Streptococcus pyogenes* MGAS10750, *Streptococcus pyogenes* NZ131, *Streptococcus thermophiles* CNRZ1066, *Streptococcus thermophiles* LMD-9, *Streptococcus thermophiles* LMG 18311, *Clostridium botulinum* A3 Loch Maree, *Clostridium botulinum* B Eklund 17B, *Clostridium botulinum* Ba4 657, *Clostridium botulinum* F Langeland, *Clostridium cellulolyticum* H10, *Finegoldia magna* (ATCC 29328), *Eubacterium rectale* (ATCC 33656), *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma mobile* 163K, *Mycoplasma penetrans*, *Mycoplasma synoviae* 53, *Streptobacillus moniliformis* (DSM 12112), *Bradyrhizobium* BTAi1, *Nitrobacter hamburgensis* X14, *Rhodopseudomonas palustris* BisB18, *Rhodopseudomonas palustris* BisB5, *Parvibaculum lavamentivorans* DS-1, *Dinoroseobacter shibae*. DFL 12, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 FAPERJ, *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5 JGI, *Azospirillum* B510 (uid46085), *Rhodospirillum rubrum* (ATCC 11170), *Diaphorobacter* TPSY (uid29975), *Verminephrobacter eiseniae* EF01-2, *Neisseria meningitidis* 053442, *Neisseria meningitidis* alpha14, *Neisseria meningitidis* Z2491, *Desulfovibrio salexigens* DSM 2638, *Campylobacter jejuni doylei* 269 97, *Campylobacter jejuni* 81116, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* RM2100, *Helicobacter hepaticus*, *Wolinella succinogenes*, *Tolomonas auensis* DSM 9187, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c, *Shewanella pealeana* (ATCC 700345), *Legionella pneumophila* Paris, *Actinobacillus succinogenes* 130Z, *Pasteurella multocida*, *Francisella tularensis novicida* U112, *Francisella tularensis holarctica*, *Francisella tularensis* FSC 198, *Francisella tularensis tularensis*, *Francisella tularensis* WY96-3418 o *Treponema denticola* (ATCC 35405).

8. Los huevos de insecto de la reivindicación 1, en donde el primer insecto y el segundo insecto son el mismo insecto o dos insectos diferentes capaces de aparearse y están en un orden seleccionado del grupo que consiste en *Diptera*, *Lepidoptera* o *Coleoptera*.

9. Un insecto macho estéril modificado genéticamente producido por los huevos del insecto según lo definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el insecto macho estéril modificado genéticamente es capaz de aumentar la tasa de huevos no eclosionados apareándose con insectos hembra de tipo salvaje, y en el que el insecto macho estéril modificado genéticamente tiene una esperanza de vida igual o superior a la de su correspondiente insecto macho de tipo salvaje.

10. Un método para reducir una población de insectos de tipo salvaje que comprende introducir un macho estéril modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 9 en la población de insectos de tipo salvaje.

FIG. 1A

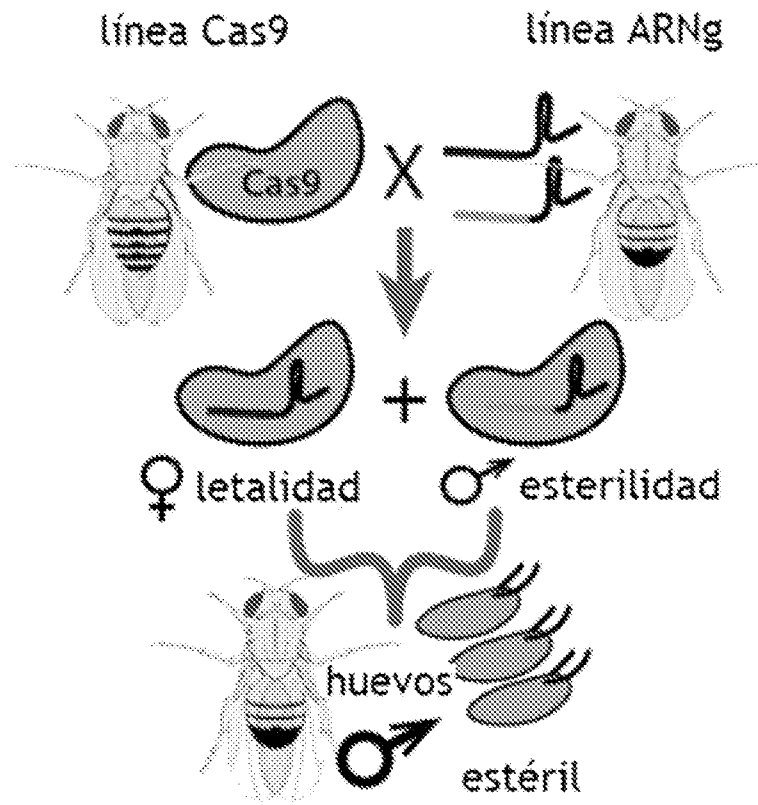


FIG. 1B

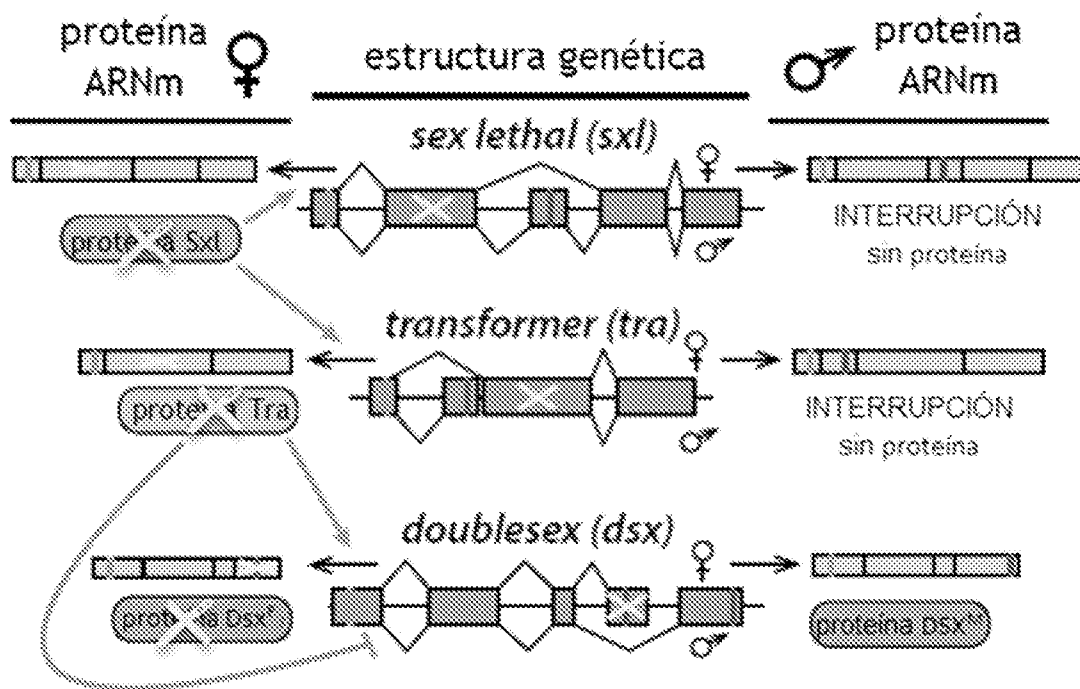


FIG. 1D

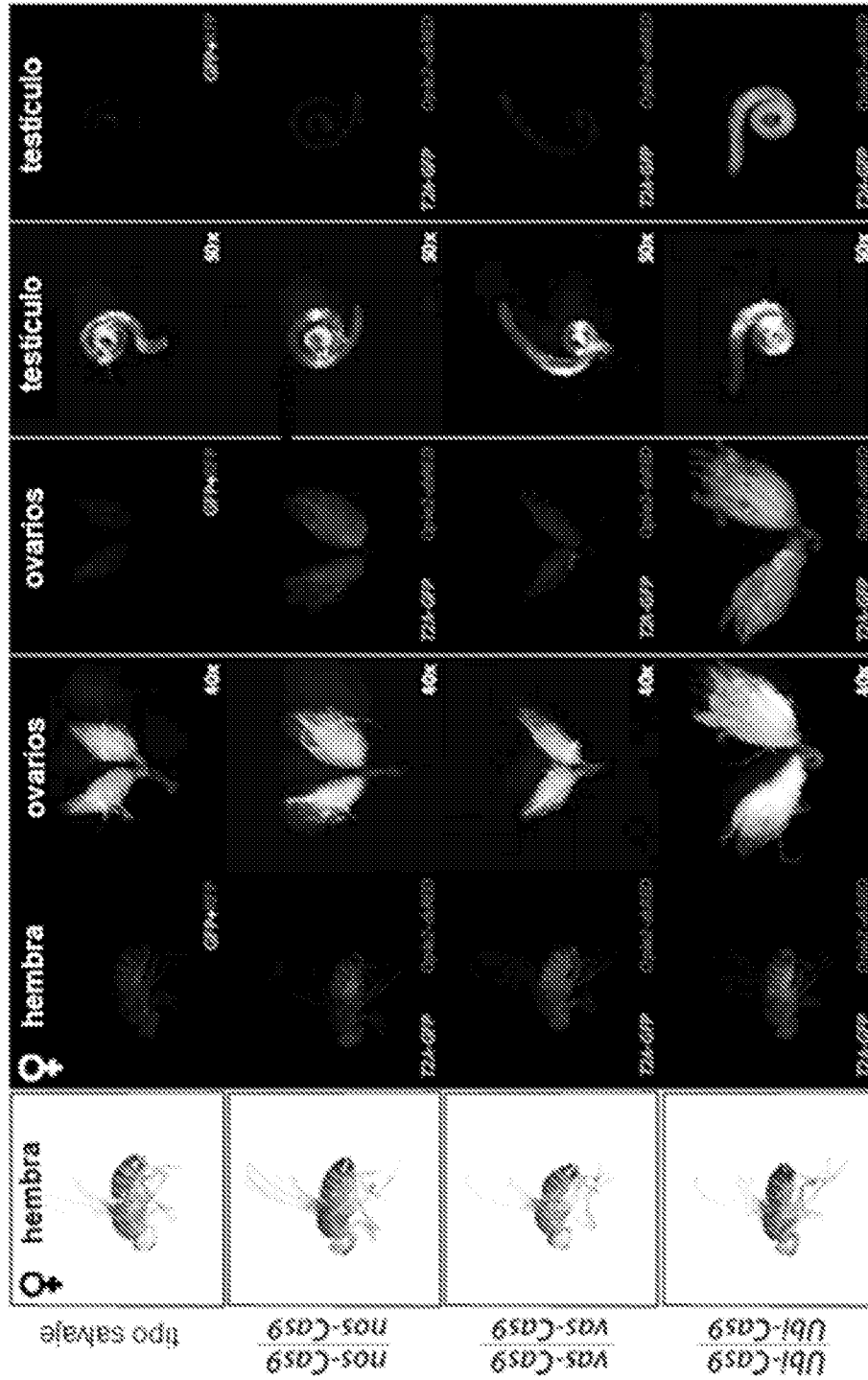


FIG. 1E

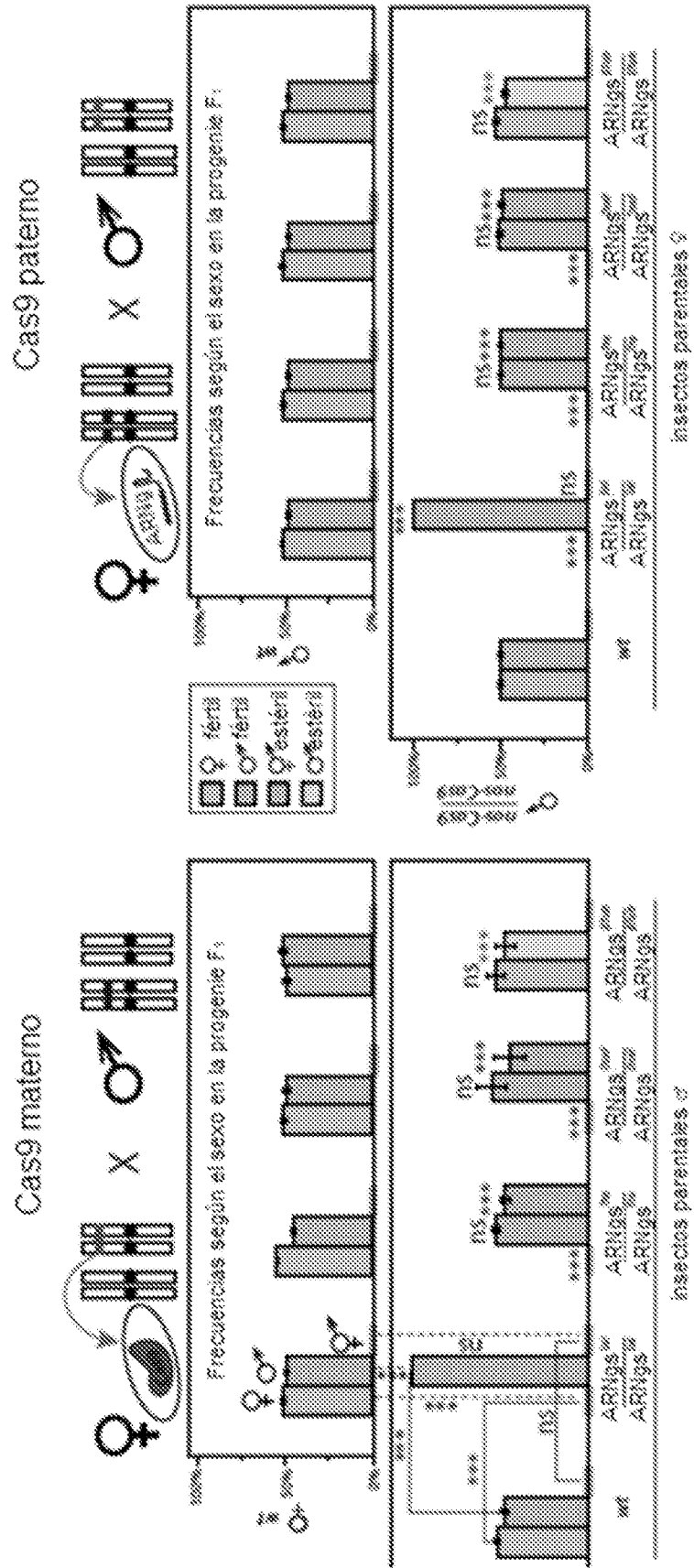


FIG. 1F

La progenie F1 a partir de los cruces entre AP(Nig simple homogéptico (AR(Ngs/AR(Ngs) y nos-Cas9 homogéptico (nos-Cas9/nos-Cas9)

		♀ Cas9 materno											
♀	♂	♀ tipo salvaje (w-)		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
♀ tipo salvaje (w-)	-	-	-	113	113	0	0	0	0	0	0	0	0
♀ tipo salvaje (w-)	-	-	-	57	56	0	0	0	0	0	0	0	0
♀ tipo salvaje (w-)	-	-	-	06	79	0	0	72	61	0	72	75	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	04	01	0	0	0	0	0	0	56	53	0	04	01
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	70	72	0	0	0	0	0	0	0	94	0	56	53
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	82	89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	113	113
		♂ Cas9 paterno											
♀	♂	♀ tipo salvaje (w-)		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk		AR(Ngs)Sk/AR(Ngs)Sk	
		♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
♀ tipo salvaje (w-)	-	-	-	03	06	0	0	63	67	0	05	17	0
♀ tipo salvaje (w-)	-	-	-	22	07	0	0	77	72	0	63	60	0
♀ tipo salvaje (w-)	-	-	-	76	09	0	0	81	80	0	73	70	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	74	70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	70	67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
♀ nos-Cas9/nos-Cas9	87	74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Notas: si menos 10 hembras y 10 machos se establecieron para apareamiento en cada cruce de réplica, y la progenie F1 se clasificó y examinó.

*100 % esterilidad

♀ en algunos casos esto es una infraestimación debido a la dificultad para distinguir entre ♀ y ♂

♀ cada cruce repitió de 7 a 10 ♂ originario, como mínimo

FIG. 1G continuación

#	prueba	línea de la mosca	genotipo de la mosca	edad del mosquito	ARNg diana	Ceefi equivalente	RTub diana	Sel diana	Tru diana	Esuf diana
63	experimento	Ceef & ARNg	ARNg ₁ @Tub.SelF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Sel	2	indes	indes	--	--
64	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.SelF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & Sel	2	indes	indes	--	--
65	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.SelF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & Sel	2	indes	indes	--	--
66	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.SelF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & Sel	2	indes	indes	--	--
67	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Sel	2	wt	wt	--	--
68	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Sel	2	wt	wt	--	--
69	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Sel	2	wt	wt	--	--
70	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Sel	2	wt	wt	--	--
71	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
72	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
73	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
74	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
75	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
76	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
77	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
78	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
79	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
80	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
81	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
82	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.TraF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & Tra	2	indes	--	indes	--
83	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	wt	--	wt	--
84	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	wt	--	wt	--
85	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	wt	--	wt	--
86	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & Tra	2	wt	--	wt	--
87	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
88	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
89	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
90	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
91	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
92	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
93	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
94	experimento	Ceef & ARNg ₁	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
95	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
96	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
97	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
98	experimento	ARNg ₁ @Ceef cargada	ARNg ₁ @Tub.DseF ₁ : TMS Sel ⁺	2	RTub & DseF	2	indes	--	--	indes
99	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	wt	--	--	wt
100	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	wt	--	--	wt
101	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	wt	--	--	wt
102	experimento	Ceef & ARNg ₁	Ceef ⁺ : nos-Ceef ⁺	2	RTub & DseF	2	wt	--	--	wt

FIG. 2A

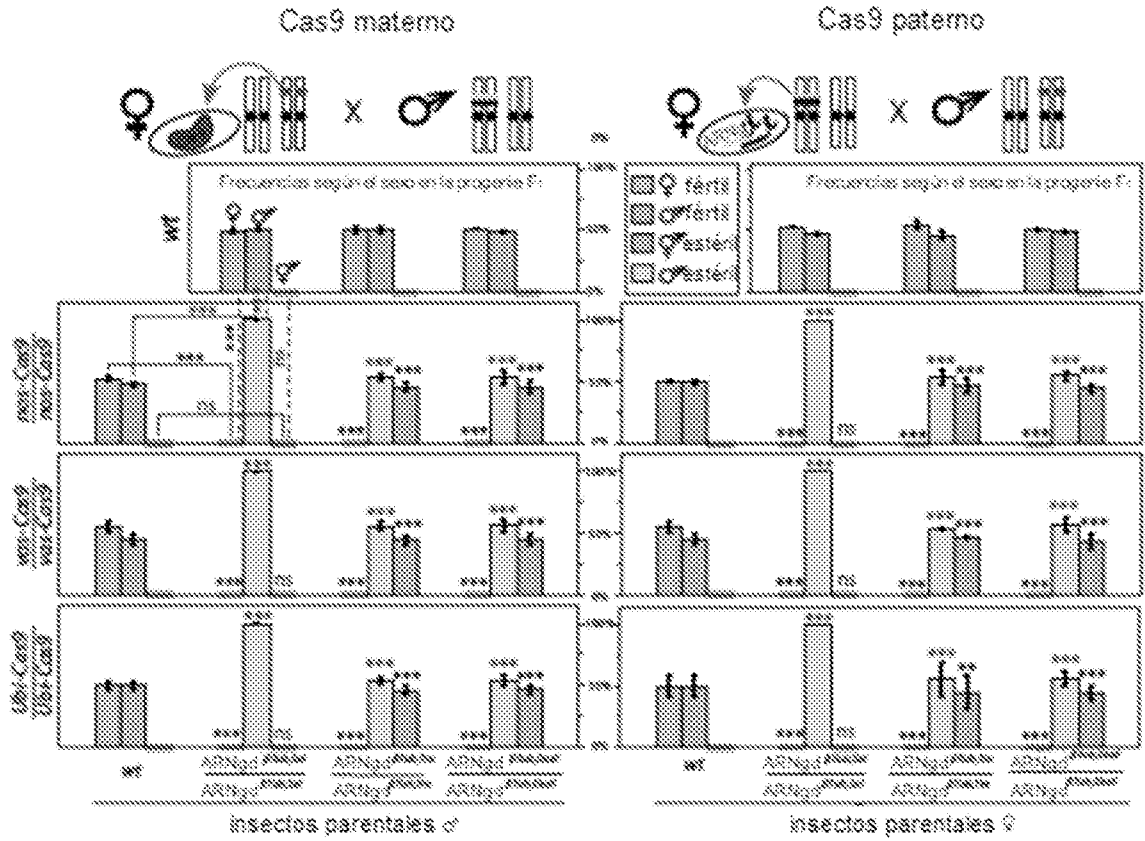


FIG. 2B

La progenie F1 a partir de los cruces entre ARNg doble homocigótico (ARNgs/ARNgd) y líneas Cas9 homocigóticas (Cas9/Cas9)

	Cas9 maternal															
	♀ tipo salvaje (N=1)				♀ ARNg 811a (ARNgs/ARNgd)				♀ ARNg 811a (ARNgs/ARNgd)				♀ ARNg 811a (ARNgs/ARNgd)			
	♀	♂	d	e	♀	♂	d	e	♀	♂	d	e	♀	♂	d	e
♀ tipo salvaje (N=)	-	-	-	-	155	155	0	0	175	168	0	0	99	95	0	0
♀ tipo salvaje (N=)	-	-	-	-	207	112	0	0	70	80	0	0	146	100	0	0
♀ tipo salvaje (N=)	-	-	-	-	156	156	0	0	82	75	0	0	100	101	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	89	82	0	0	0	0	156	0	0	0	85	85	0	0	74	58
♀ ARNg 811a (N=)	70	72	0	0	0	0	81	0	0	0	21	20	0	0	72	68
♀ ARNg 811a (N=)	52	48	0	0	0	0	121	0	0	0	112	100	0	0	6	21
♀ ARNg 811a (N=)	-	-	-	-	0	0	142	0	0	0	50	73	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	84	80	0	0	0	0	80	0	0	0	84	82	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	83	77	0	0	0	0	77	0	0	0	54	48	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	86	82	0	0	0	0	112	0	0	0	58	57	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	-	-	-	-	0	0	140	0	0	0	84	81	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	84	82	0	0	0	0	138	0	0	0	100	99	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	82	84	0	0	0	0	75	0	0	0	10	12	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	80	75	0	0	0	0	86	0	0	0	81	84	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	-	-	-	-	0	0	122	0	0	0	86	72	0	0	0	0

	Cas9 paternal															
	♀ tipo salvaje (N=1)				♀ ARNg 811a (ARNgs/ARNgd)				♀ ARNg 811a (ARNgs/ARNgd)				♀ ARNg 811a (ARNgs/ARNgd)			
	♀	♂	d	e	♀	♂	d	e	♀	♂	d	e	♀	♂	d	e
♀ tipo salvaje (N=)	-	-	-	-	155	155	0	0	82	82	0	0	25	22	0	0
♀ tipo salvaje (N=)	-	-	-	-	207	112	0	0	80	82	0	0	81	76	0	0
♀ tipo salvaje (N=)	-	-	-	-	152	152	0	0	82	81	0	0	89	88	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	74	76	0	0	0	0	85	0	0	0	85	82	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	70	67	0	0	0	0	112	0	0	0	126	126	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	87	74	0	0	0	0	86	0	0	0	102	82	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	-	-	-	-	0	0	132	0	0	0	83	84	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	82	80	0	0	0	0	82	0	0	0	82	80	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	84	71	0	0	0	0	82	0	0	0	86	82	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	86	80	0	0	0	0	89	0	0	0	86	72	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	-	-	-	-	0	0	122	0	0	0	78	79	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	82	84	0	0	0	0	140	0	0	0	126	120	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	72	71	0	0	0	0	84	0	0	0	72	100	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	80	80	0	0	0	0	88	0	0	0	82	82	0	0	0	0
♀ ARNg 811a (N=)	-	-	-	-	0	0	120	0	0	0	102	100	0	0	0	0

Nota: al menos 10 hembras y 10 machos se establecieron para apareamiento en cada cruce de réplica, y su progenie F1 se definió y extendió.
 * 100% esterilidad
 - en algunos casos esto es una infraestimación debido a la dificultad para distinguir entre d y e.

FIG. 2C

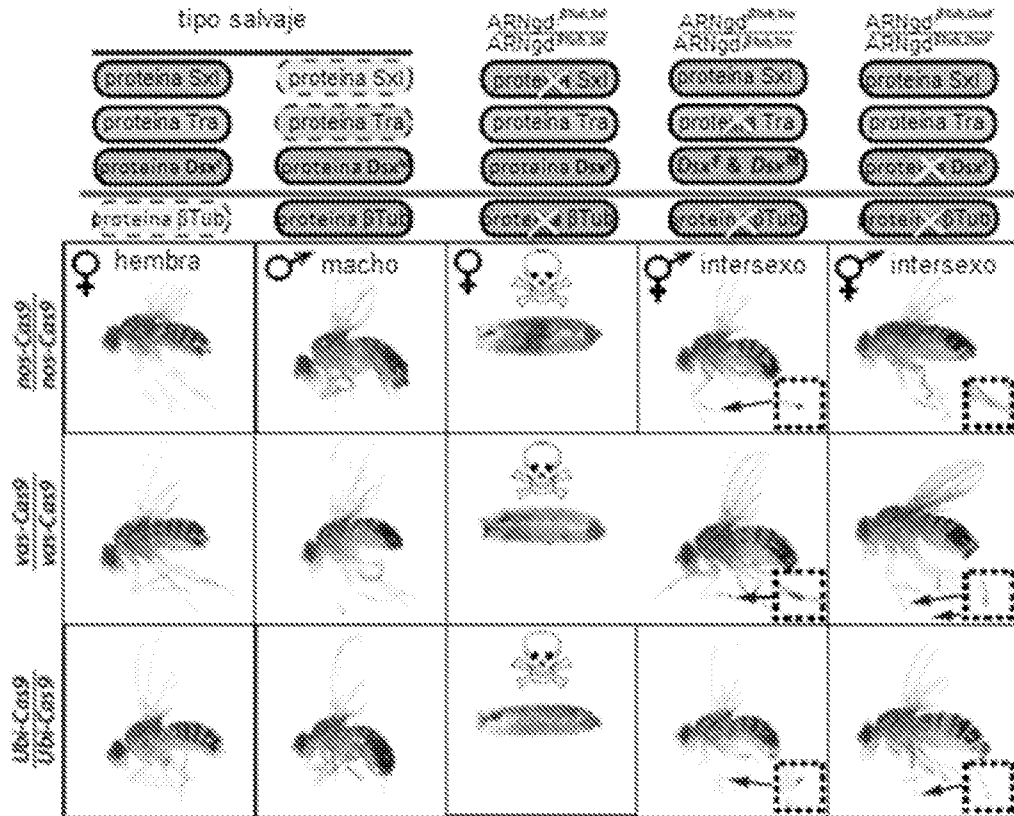


FIG. 2D

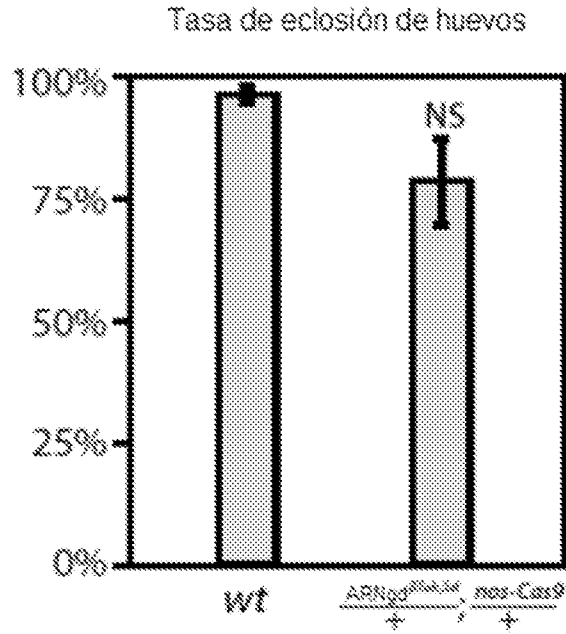


FIG. 2E

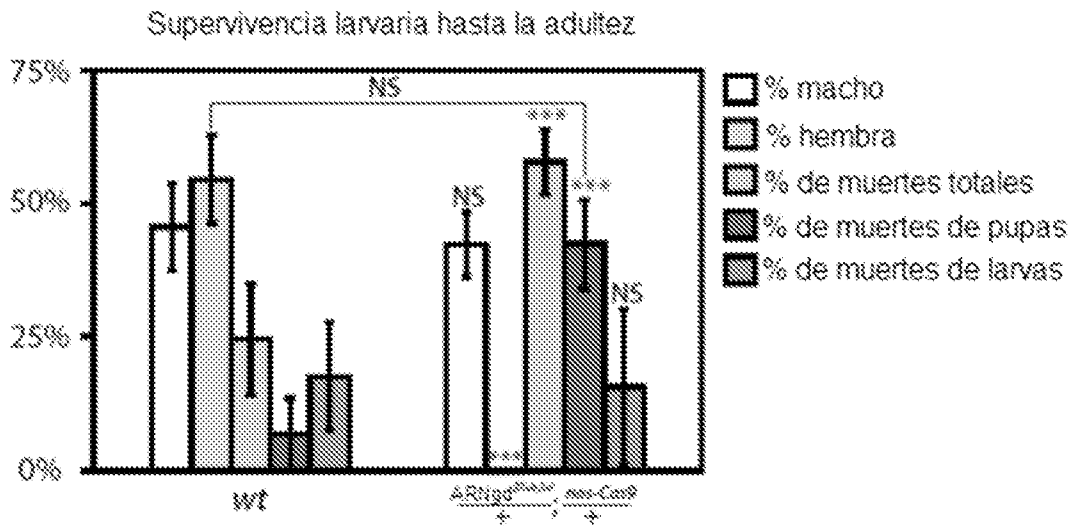


FIG. 2F

Características fenotípicas de moscas transheterocigotas que portan Cas9 y ARNg dobles (ARNcd)

Fenotipo	ARNgd ^{prom, 509/+; Cas9/+}	ARNgd ^{prom, 736/+; Cas9/+}	ARNgd ^{prom, 608/+; Cas9/+}	ARNgd ^{prom, 608/+; Cas9/+}
Viabilidad	viabile	viabile	viabile	viabile
Morfología externa	macho normal	macho normal	intersexo	macho normal
Fertilidad	100 % estéril	100 % estéril	100 % estéril	100 % estéril
Ovarios	Ausente	Ausente	rudimentario, variable	Ausente
Huevos producidos	N/A	N/A	escaso, raro	N/A
Huevos puestos	N/A	N/A	Nunca	N/A
Testículos	Desarrollado	Desarrollado	ausente	Desarrollado
Glandulas masculinas accesorias	Desarrollado	Desarrollado	Desarrollado	Desarrollado
Peines sexuales	Desarrollado	Desarrollado	Desarrollado, variable	Desarrollado
				Ausente

Nota: las características fenotípicas distintas a la letalidad y esterilidad muestran una manifestación variable independientemente de que línea Cas9 (nos-Cas9, Ubi-Cas9 y vas-Cas9) se utilizó o como se heredó Cas9 (Cas9 materno y paterno).

FIG. 2G

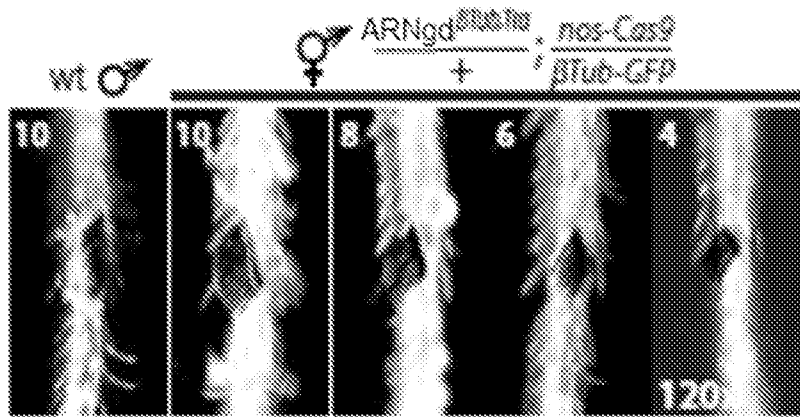


FIG. 2H

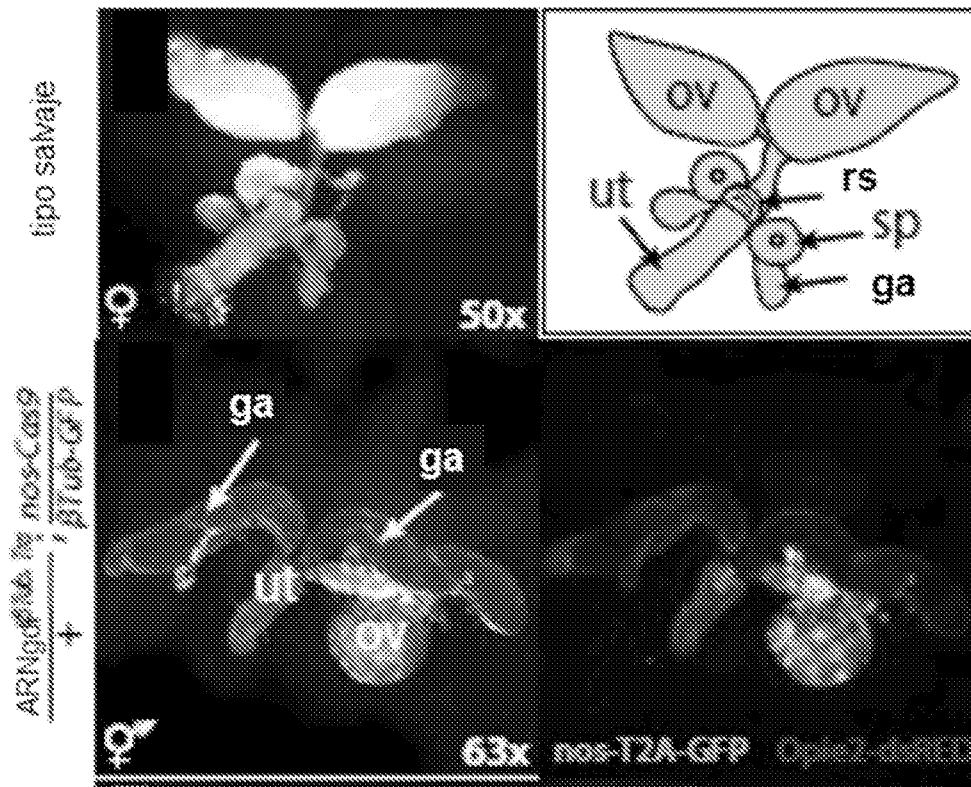


FIG. 2I

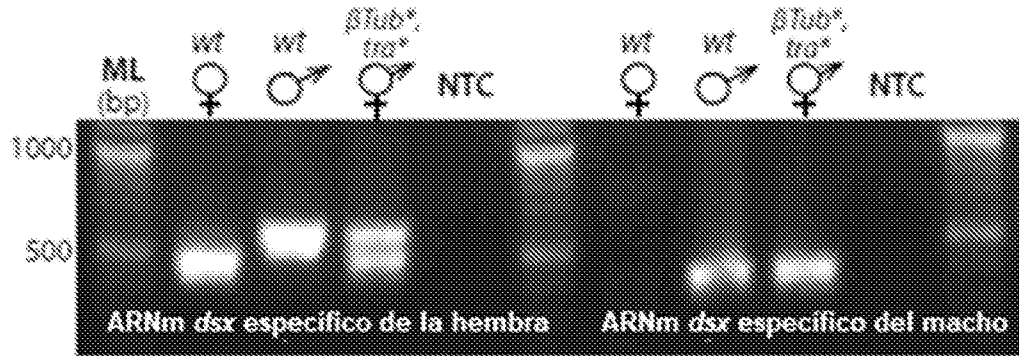


FIG. 2J

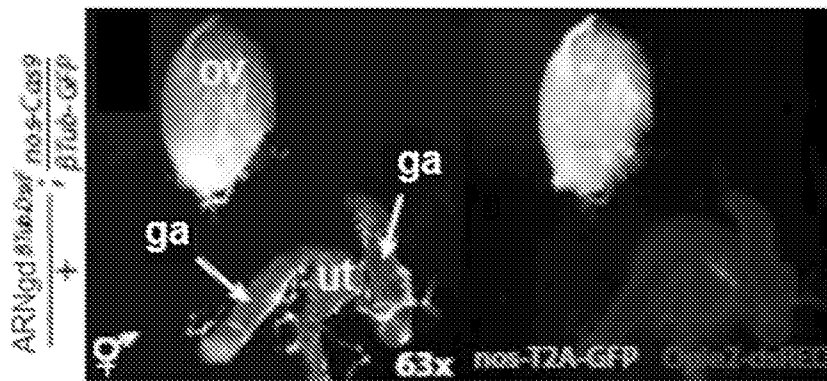


FIG. 2K

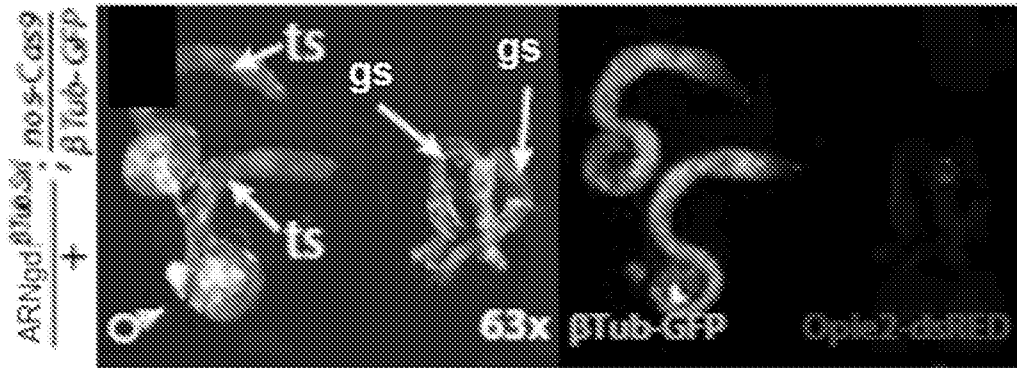


FIG. 2L

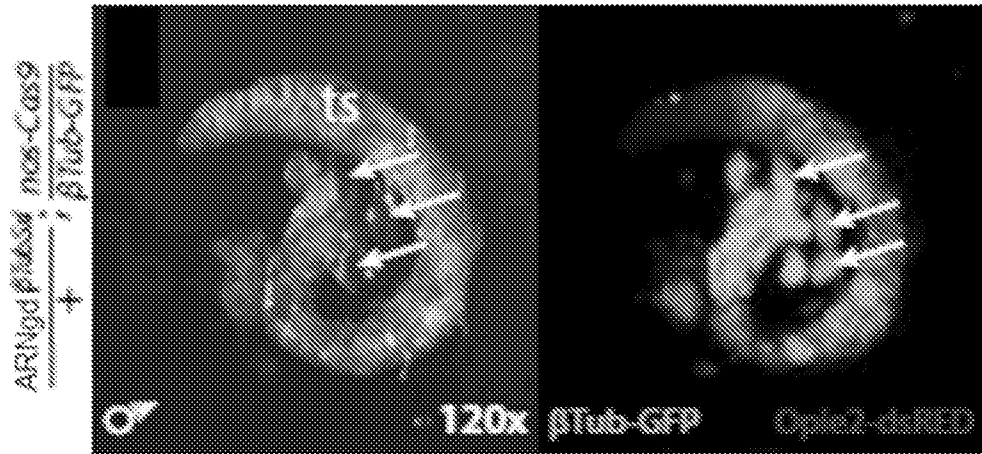


FIG. 2M

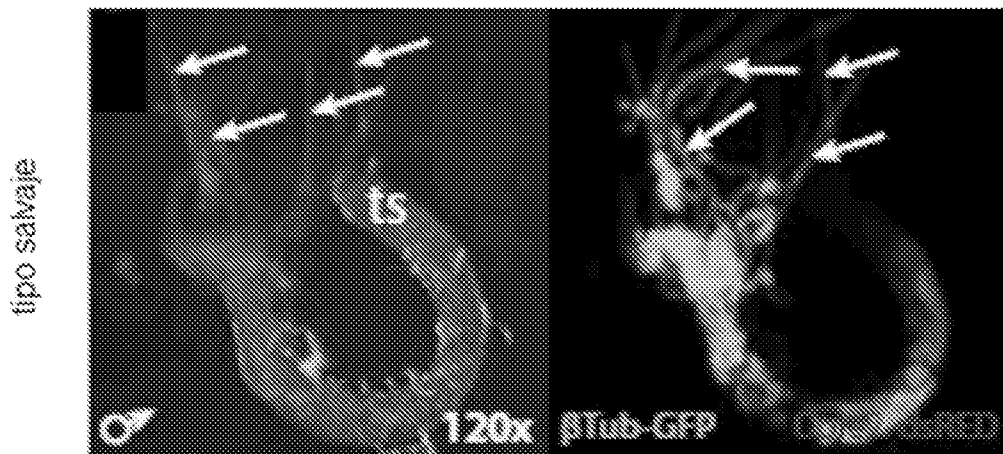


FIG. 2N

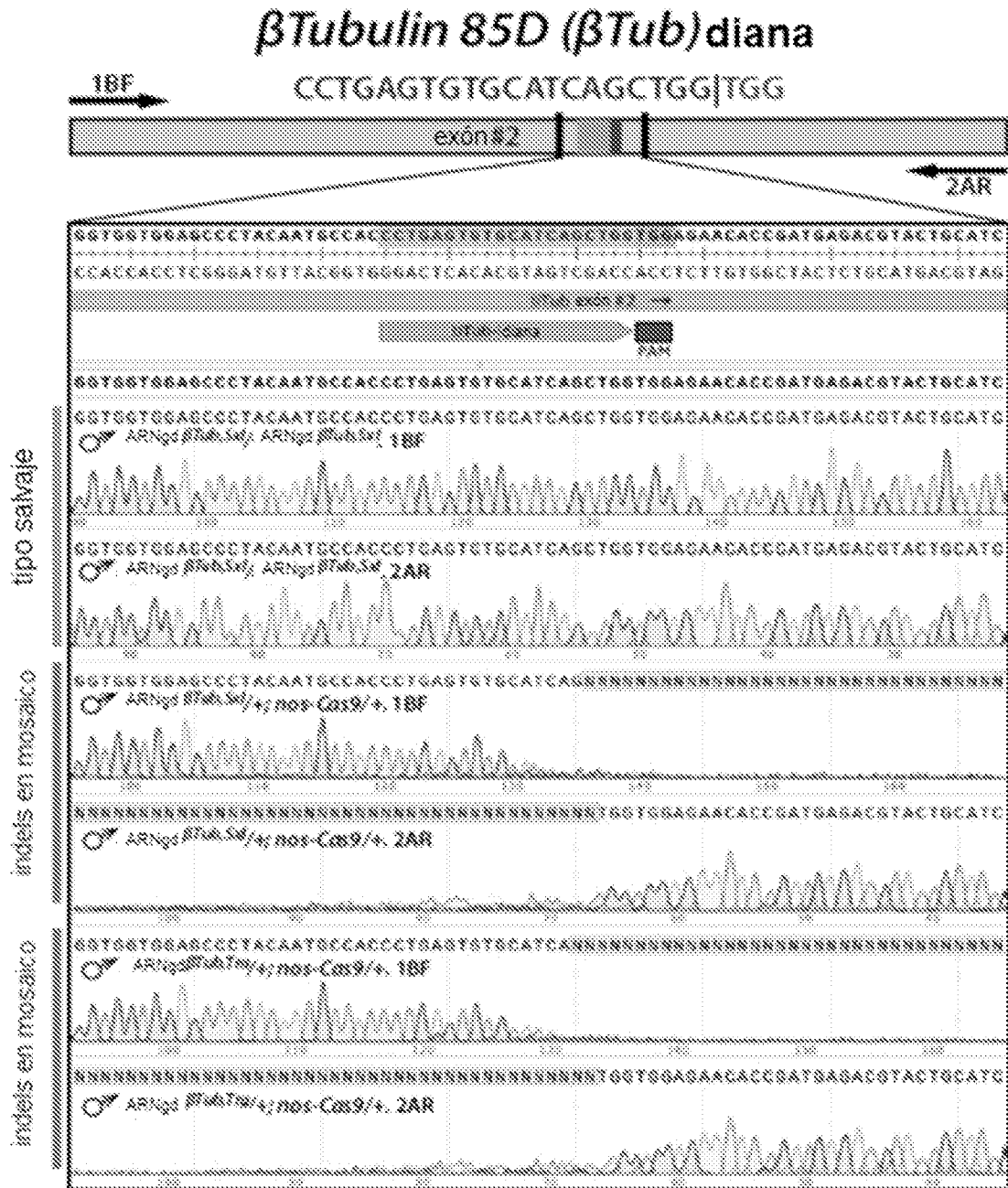


FIG. 2P

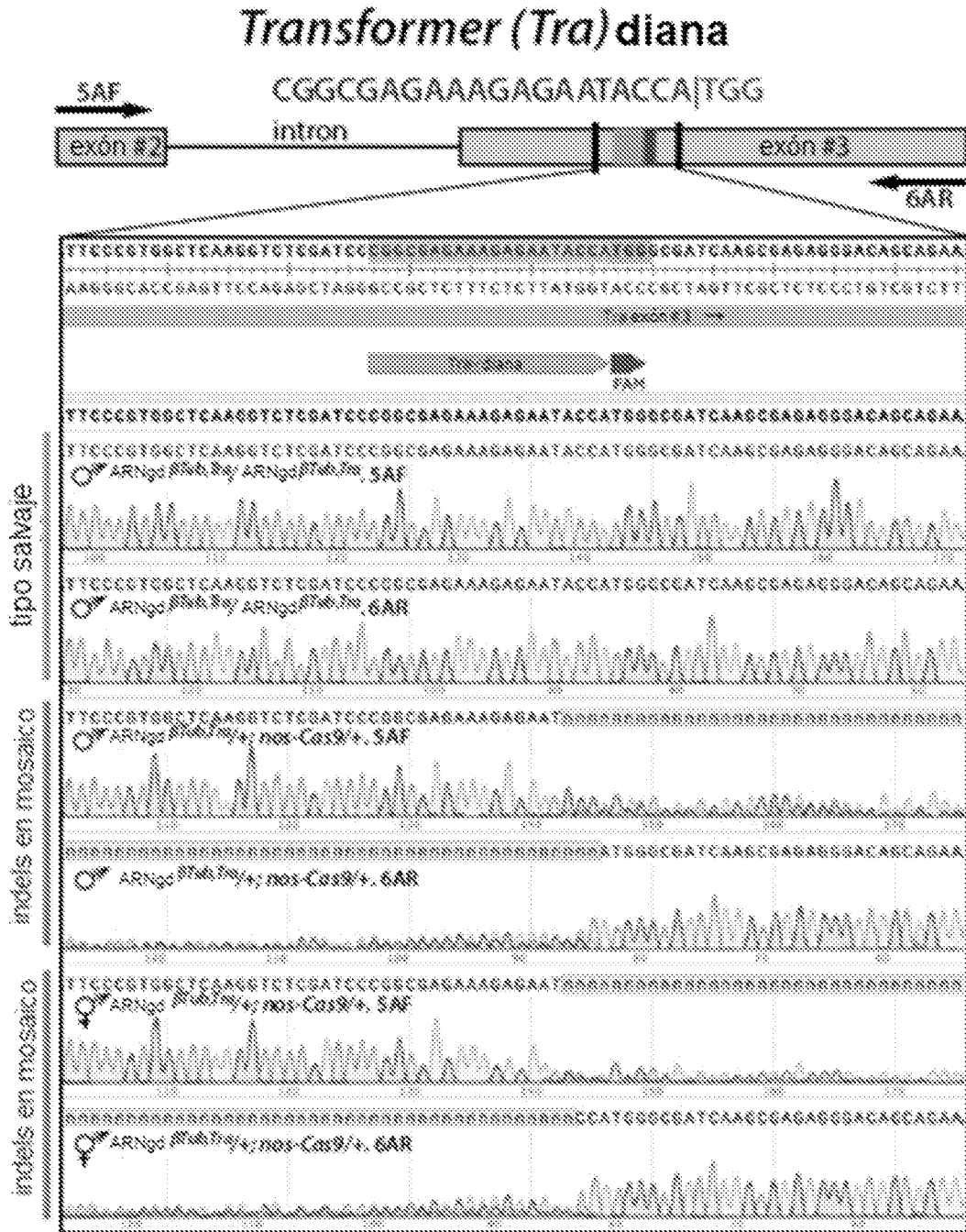


FIG. 3A

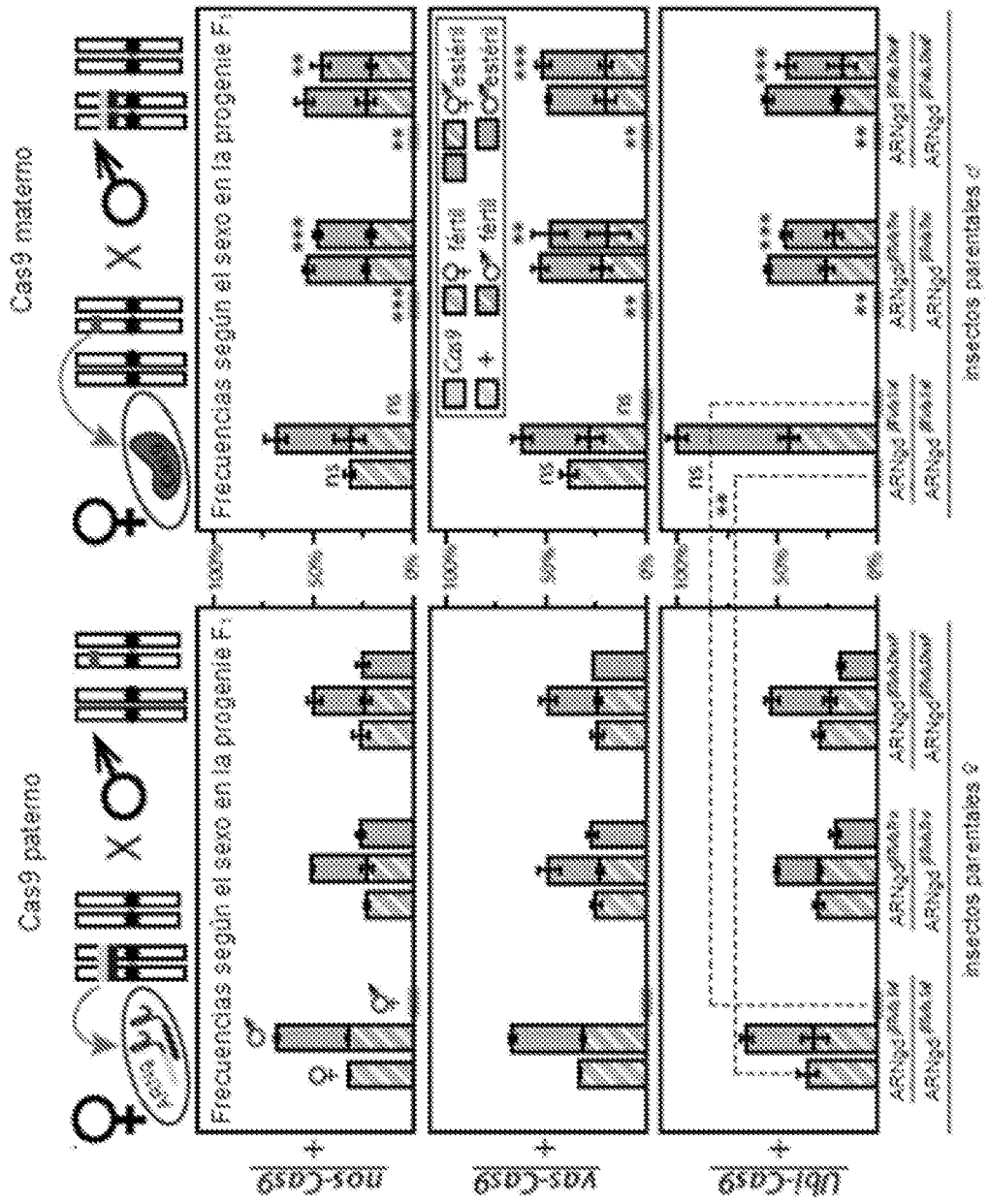


FIG. 3B

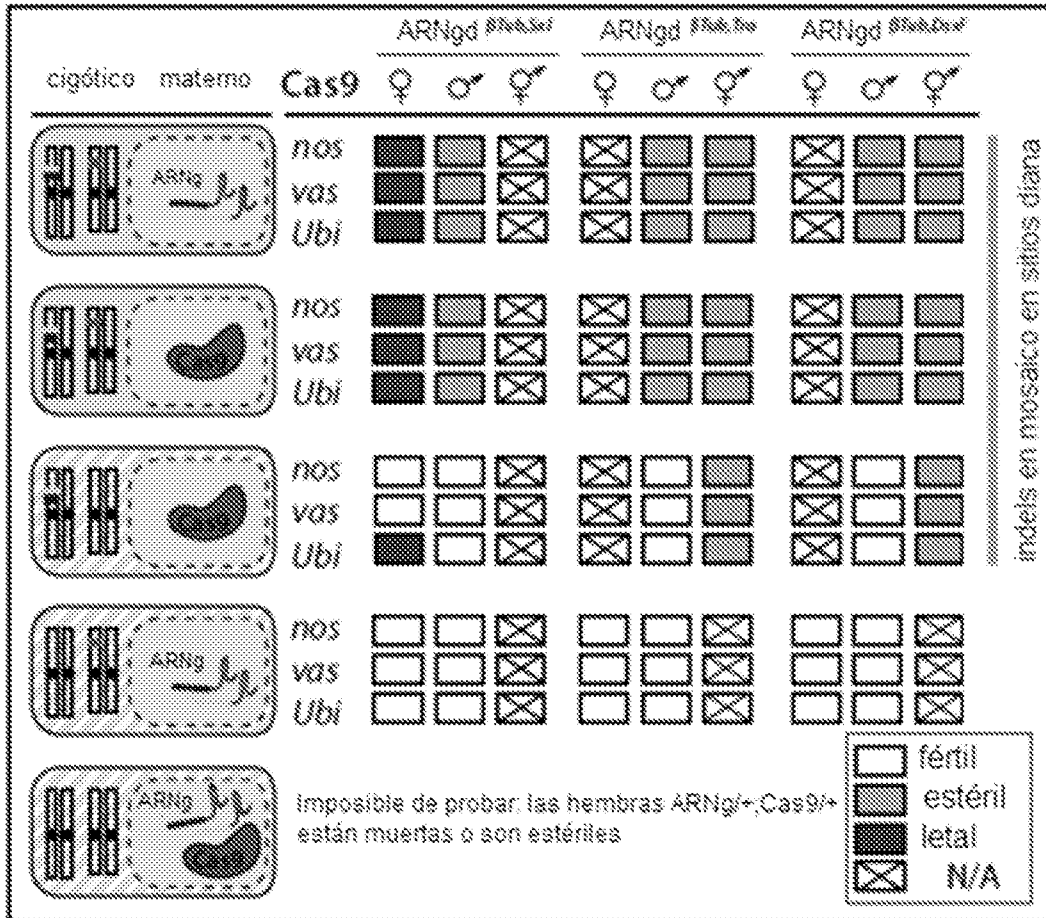


FIG. 3C

La progenie F1 a partir de los cruces entre ARNgd doble/ARNgd homocigoto y Cas9 heterocigoto (Cas9/TM3, Sb)

	♂ Cas9 paterno																
	♀ ARNgd(Tub, Sb)/ARNgd(Tub, Sb)				♀ ARNgd(Tub, Traj)/ARNgd(Tub, Traj)				♀ ARNgd(Tub, Cas9)/ARNgd(Tub, Cas9)								
	♀ TM3	♀*	♀TM3	♀*	♀ TM3	♀*	♀TM3	♀*	♀ TM3	♀*	♀TM3	♀*					
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	48	52	48	0	0	48	56	34	51	0	0	40	44	39	44	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	53	63	54	0	0	47	57	48	54	0	0	46	56	42	54	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	57	63	59	0	0	52	57	45	60	0	0	60	42	53	42	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	46	50	37	0	0	46	56	72	61	0	0	47	56	40	24	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	46	51	42	0	0	40	59	59	37	0	0	42	73	59	48	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	56	47	59	0	0	58	58	56	58	0	0	45	51	37	53	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	47	51	44	0	0	37	48	35	42	0	0	41	37	45	52	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	45	46	43	0	0	40	46	42	44	0	0	45	45	42	48	0
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	44	49	41	0	0	55	37	46	58	0	0	57	44	54	54	0

	♀ Cas9 materno															
	♂ ARNgd(Tub, Sb)/ARNgd(Tub, Sb)				♂ ARNgd(Tub, Traj)/ARNgd(Tub, Traj)				♂ ARNgd(Tub, Cas9)/ARNgd(Tub, Cas9)							
	♂ TM3	♂*	♂TM3	♂*	♂ TM3	♂*	♂TM3	♂*	♂ TM3	♂*	♂TM3	♂*				
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	43	55	56	0	0	46	41	42	59	0	0	49	42	46	41
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	41	46	52	0	0	36	34	51	51	0	0	37	51	53	59
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	43	43	65	0	0	36	30	51	54	0	0	38	38	40	59
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	60	56	70	0	0	47	45	43	40	0	0	50	39	56	55
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	0	35	31	0	0	37	30	54	53	0	0	47	33	31	37
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	0	46	41	0	0	48	32	41	45	0	0	58	56	46	38
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	0	40	29	0	0	39	39	39	37	0	0	47	24	45	36
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	0	45	42	0	0	46	41	34	36	0	0	54	33	37	39
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	28	31	46	0	0	49	25	53	59	0	0	64	35	74	56
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	26	24	51	0	0	53	59	49	46	0	0	39	39	41	57
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	110	77	107	0	0	93	58	100	7	0	0	76	57	79	53
♀ Cas-Cas9/TM3, Sb	0	25	29	39	0	0	48	36	31	42	0	0	55	30	46	31

Nota: el número * muestra la selección para acortamiento en cada cruce de repeticiones y su progenie F1 sea control y mutante.

* 100 % eficiencia

* en algunos casos esto es una infraestimación debido a la dificultad para distinguir entre el y el

FIG. 3D

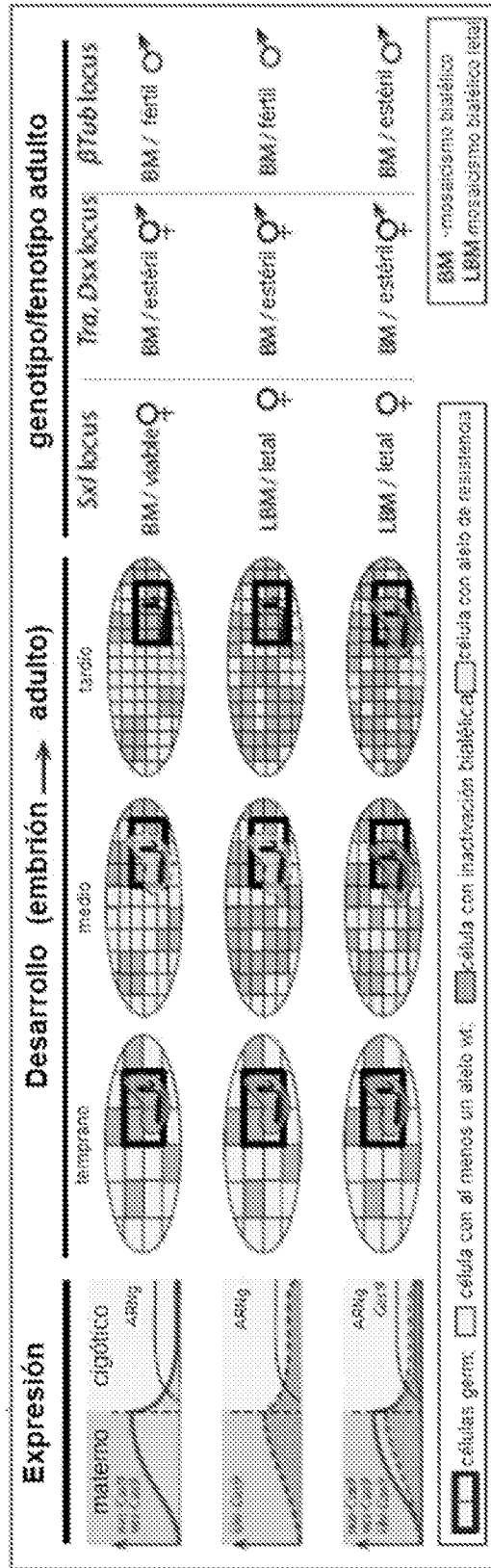


FIG. 4A

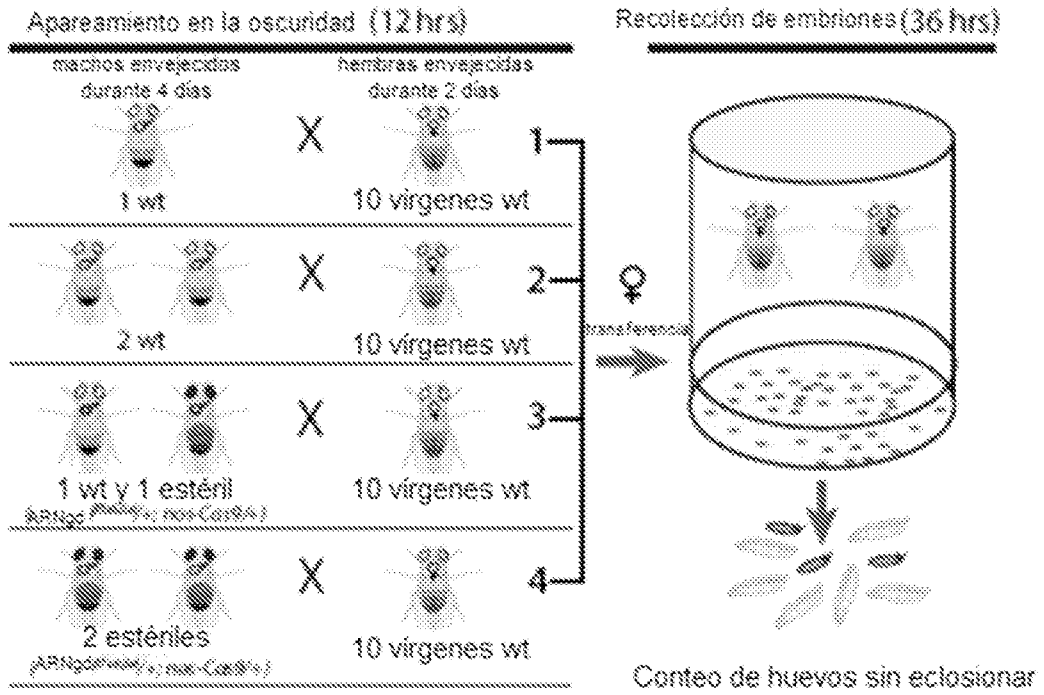


FIG. 4B

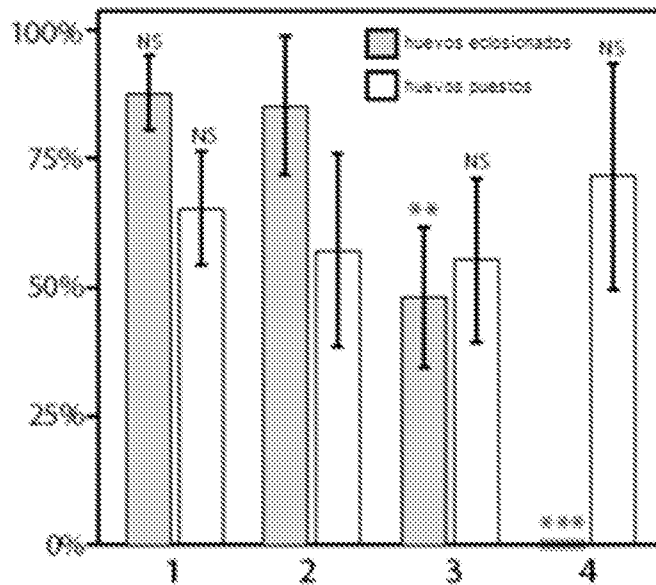


FIG. 4C

Competitividad de machos ARNgdbTub,Sxl/+; nos-Cas9/+

# clase en Fig. 4B	♂ genotipo	Nuevos puestas	Nuevos sin eclosionar	Nuevas eclosionadas	% Nuevos puestas	% eclosion
2	3 wt ♂	133	6	125	65.83	95.43
2	3 wt ♂	60	18	42	30.15	70.00
2	2 wt ♂	143	10	131	70.65	92.91
2	2 wt ♂	146	5	141	73.37	96.58
3	2 wt ♂	99	26	69	44.72	70.79
3	1 wt ♂	134	6	118	63.31	95.16
3	1 wt ♂	139	24	105	64.82	91.40
3	1 wt ♂	127	18	109	63.82	85.83
3	1 wt ♂	104	5	99	52.26	95.19
3	1 wt ♂	165	32	133	62.91	60.61
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, Sxl* ♂	144	30	94	72.36	65.28
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, Sxl* ♂	108	71	37	54.27	34.26
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, Sxl* ♂	65	56	29	42.71	34.12
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, Sxl* ♂	72	31	41	36.18	56.94
3	1 wt ♂ & 1 bTub*, Sxl* ♂	139	73	66	69.85	48.92
4	2 bTub*, Sxl* ♂	145	145	0	72.86	0.00
4	2 bTub*, Sxl* ♂	169	169	0	84.92	0.00
4	2 bTub*, Sxl* ♂	97	97	0	48.74	0.00
4	2 bTub*, Sxl* ♂	199	199	0	100.00	0.00
4	2 bTub*, Sxl* ♂	103	101	0	50.75	0.00

FIG. 4D

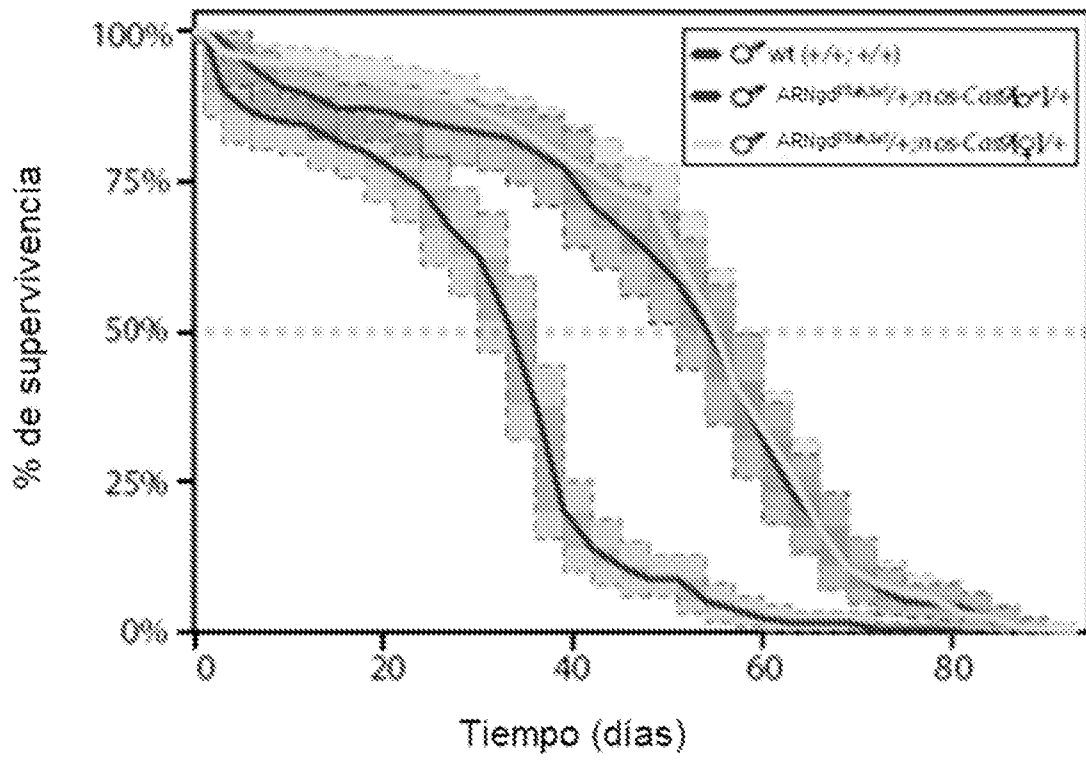


FIG. 4E

# réplica	Descripción de σ \ día #	1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42
1	$\hat{\sigma}$, control w-	50	47	45	45	45	44	44	39	34	26	25	18	12	5	1
2	$\hat{\sigma}$, control w-	50	43	39	38	38	37	32	32	30	25	24	16	13	7	1
3	$\hat{\sigma}$, control w-	50	49	45	45	45	45	45	44	44	42	35	25	13	3	1
4	$\hat{\sigma}$, control w-	75	62	62	60	58	58	58	57	55	54	51	49	42	23	19
5	$\hat{\sigma}$, control w-	50	47	47	46	46	41	41	40	40	38	37	35	24	17	16
1	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	50	50	43	43	43	42	42	42	41	40	39	38	38	37	33
2	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	50	50	48	43	42	41	41	40	40	40	40	39	39	37	33
3	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	40	39	39	38	37	37	37	37	36	36	36	36	36	35	33
4	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	40	38	38	37	37	35	35	34	33	33	33	33	31	29	27
5	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	40	40	39	39	38	37	37	37	37	36	35	35	32	32	30
1	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	50	45	43	42	42	42	42	41	41	41	41	40	38	38	38
2	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	50	50	50	50	50	48	47	46	46	46	46	46	43	42	41
3	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	50	49	49	48	48	47	47	47	46	45	41	38	38	37	36
4	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	75	73	72	72	72	71	70	69	68	68	66	65	64	59	56
5	$\hat{\sigma}$, ARNgd [bTub, Sxll]/+mos-cas9($\hat{\sigma}$)/+	50	49	49	49	48	48	48	46	46	45	45	45	43	42	39

FIG. 4F

Estrategia	Parámetro	Valor	Referencia
General	Producción de huevos por hembra (día ⁻¹)	20	Otero et al., Bull. Math. Biol. 68, 1945--1974 (2006).
	Duración de la etapa del huevo (días)	5	Christophers, <i>Aedes aegypti</i> (L.) the Yellow Fever Mosquito: its Life History, Bionomics and Structure Cambridge University Press; 1a edición (18 de junio de 2009).
	Duración de la etapa larvaria (días)	6	Christophers, 2009(<i>supra</i>).
	Duración de la etapa de pupa (días)	4	Christophers, 2009(<i>supra</i>).
	Tasa de crecimiento diaria de la población (día ⁻¹)	1.175	Simoy et al., <i>Ecol. Modell.</i> , 314:100-110 (2015).
	Riesgo de mortalidad diario en la etapa adulta (día ⁻¹)	0.090	Focks et al., <i>J. Med. Entomol.</i> , 30:1018-1028, (1993); Focks et al., <i>J. Med. Entomol.</i> , 30:1003-1017, (1993); Horstfall, <i>J. Econ. Entomol.</i> , 65:891-892, (1972); y <i>Fay, Mosq. News</i> , 24, 300-308 (1964).
	Tamaño de la población de hembras adultas	10,000	Carvalho et al., <i>PLoS Negl. Trop. Dis.</i> 9, e0003864 (2015).
IIT	Reducción en la esperanza de vida del macho adulto	0.50	Yamada et al., <i>J. Med. Entomol.</i> 51, 811--816 (2014); Zhang et al., <i>PLoS One</i> 10, e0121126 (2015) ¹ ; y Zhang et al., <i>PLoS One</i> 10, e0135194 (2015) ² .
	Competitividad de apareamiento del macho	1.00	Bellini et al., <i>J. Med. Entomol.</i> , 50:94-102, (2013); y Atyame et al., <i>PLoS One</i> , e0146834, doi:10.1371/journal.pone.0146834, (2016).
RIDU/ fsRIDL	Reducción en la esperanza de vida del macho adulto	0.18	Massonnet-Brunsel et al., <i>PLoS One</i> , e62711, (2013).
	Competitividad de apareamiento del macho	0.05	Carvalho et al., <i>PLoS Negl. Trop. Dis.</i> 9, e0003864 (2015); Harris et al., <i>Nat. Biotechnol.</i> 29, 1034--1037 (2011).
pgSIT	Reducción en la esperanza de vida del macho adulto	0.18	Massonnet-Brunsel et al., (2013) (<i>supra</i>).
	Competitividad de apareamiento del macho	0.78	FIG. 4B

FIG. 4G

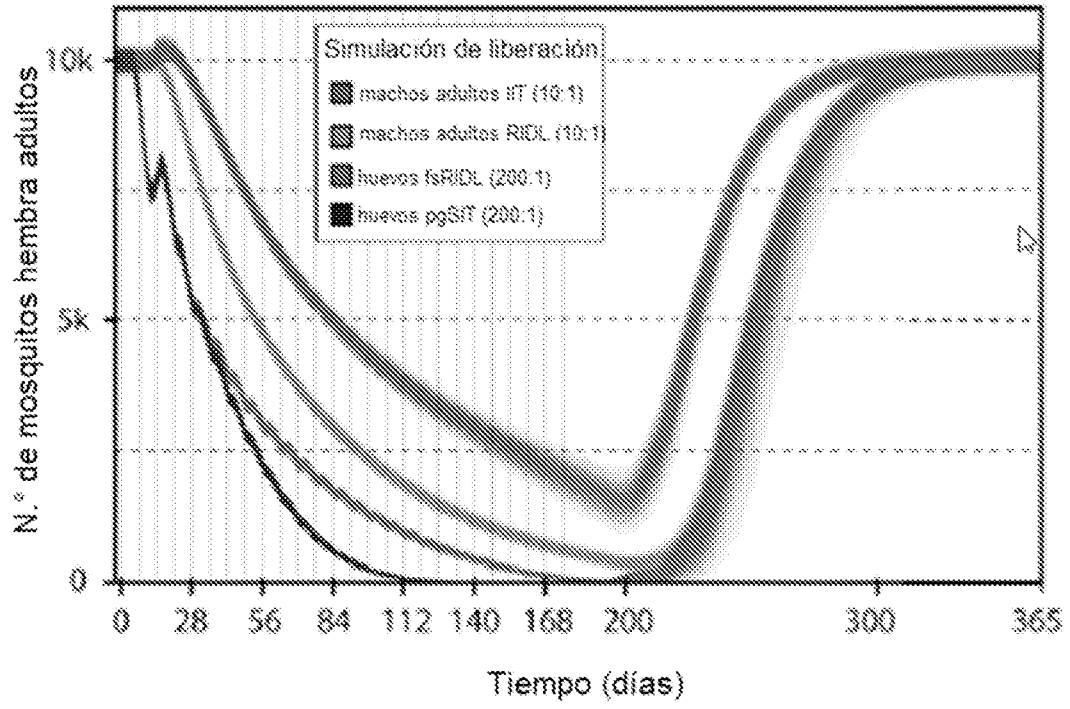


FIG. 4H

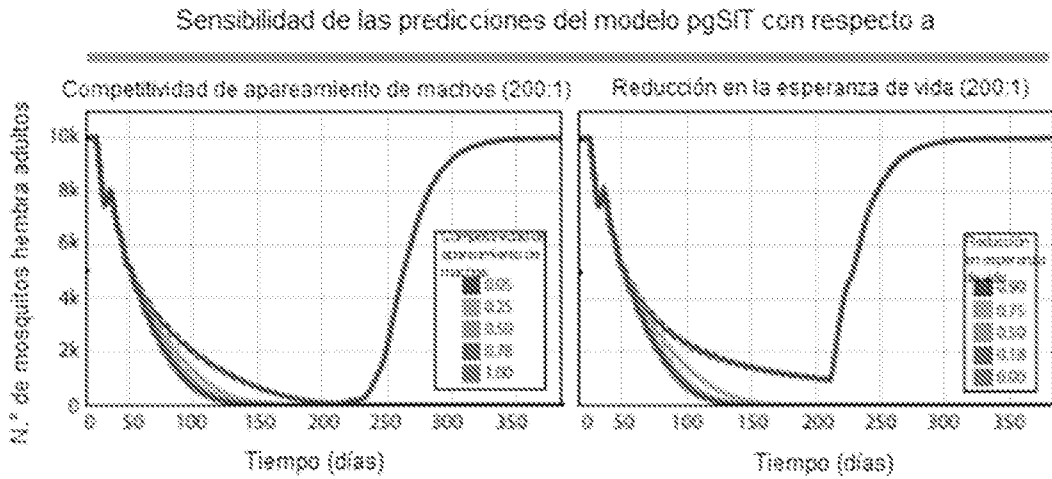


FIG. 4I

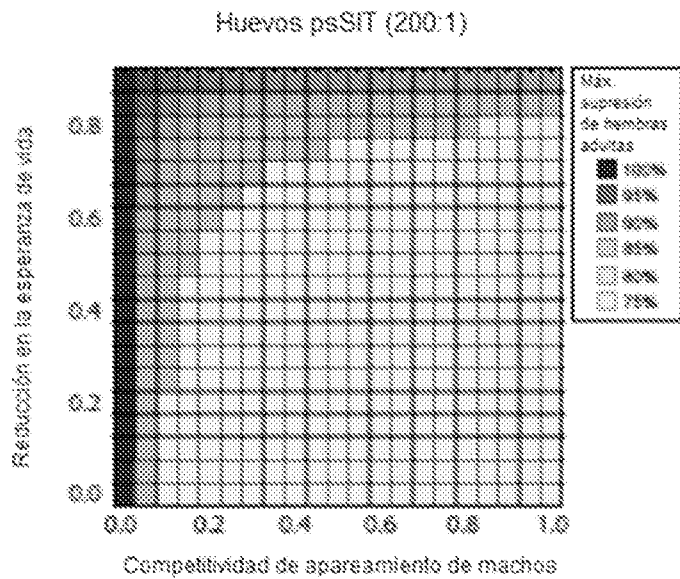


FIG. 4J

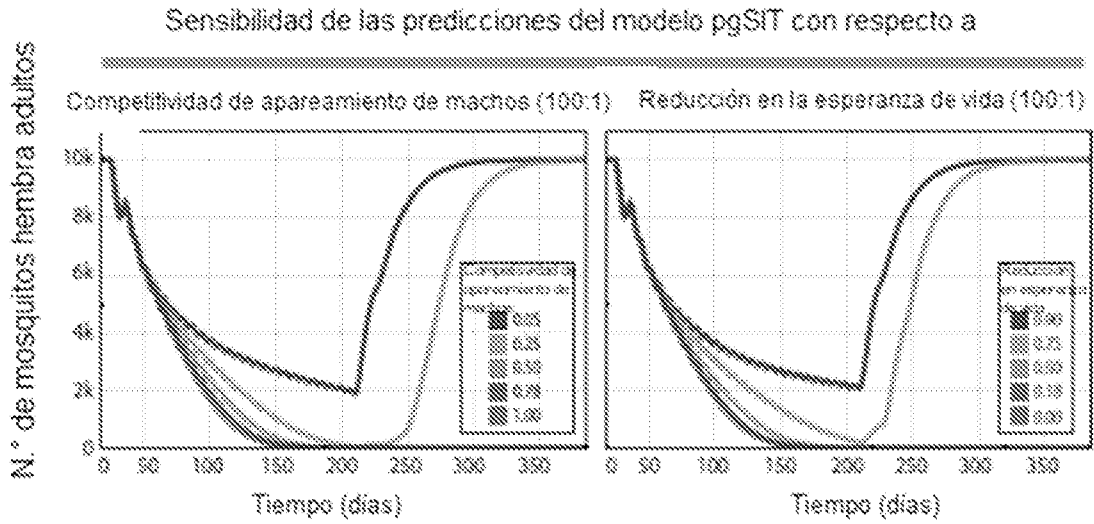


FIG. 4K

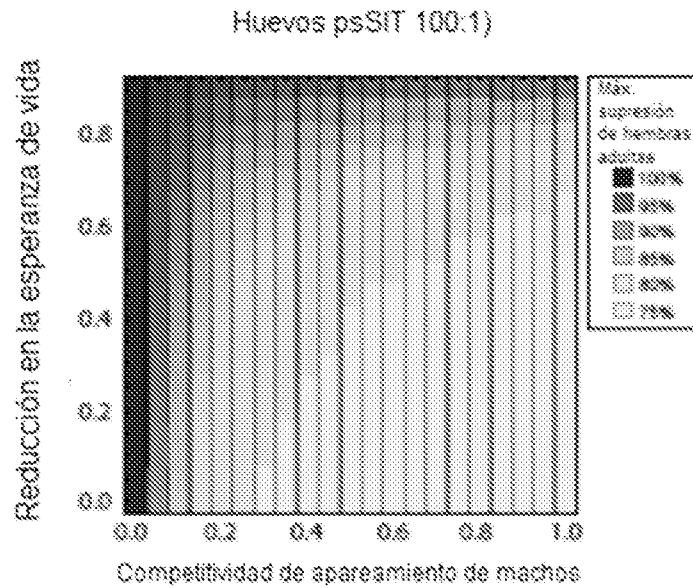


FIG. 5

