

P-12634

Nuevo capítulo reivindicatorio

Diciembre 21, 2018

REIVINDICACIONES

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

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

en donde

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

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

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

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

2. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer factor de transcripción de activación es el producto génico del primer gen letal dominante y/o el segundo factor de transcripción de activación es el producto génico del segundo gen letal dominante, de manera que dicho factor de transcripción también proporciona el efecto letal conferido por dicho gen letal dominante.

3. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que una o ambas de la primera y la segunda secuencia de control de empalme media la expresión específica de la hembra por el respectivo gen letal dominante, junto con un espliceosoma mediando el empalme de un transcrito de ARN del gen letal dominante respectivo para producir un mRNA que codifica una proteína funcional y al menos un mRNA que codifica una proteína no funcional, en donde el mRNA que codifica una proteína funcional se produce en una hembra.
4. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada uno de los promotores primero y segundo es sustancialmente inactivo en ausencia del factor de transcripción de activación capaz de activar dicho promotor.
5. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal es, independientemente, tTA (activador de la transcripción reprimible con tetraciclina) o una tTAV (variante del gen tTA).
6. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal dominantes es, independientemente, uno de tTAV (SEQ ID NO: 26), tTAV2 (SEQ ID NO: 27) y tTAV3 (SEQ. ID NO: 28).
7. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un intrón *tra*, un gen *dsx* o un gen *Actina-4*.
8. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un intrón *tra*.
9. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de un Tephritid.
10. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de uno de los géneros *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* y *Rhagoletis*.

11. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de *Ceratitidis capitata*.
12. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que una de la primera y segunda secuencias de control de empalme se deriva de *Ceratitidis capitata* y la otra secuencia de control de empalme se deriva de una especie diferente.
13. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primer y segundo sistemas de expresión génica además comprende un potenciador asociado con el promotor respectivo, y al menos uno de los factores de transcripción de activación actúa en el potenciador respectivo.
14. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el potenciador, o uno o ambos de los potenciadores, es un elemento *tetO* (operador de tetraciclina) que comprende una o más repeticiones de *tetO*.
15. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 14, en la que cada potenciador es, independientemente, *tetOx7*, *tetOx14* o *tetOx21*.
16. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo promotores es un promotor embrionario.
17. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos de los promotores primero y segundo es un promotor mínimo.
18. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 16, en la que cada uno de los promotores primero y segundo es, independientemente, *Hsp70* (proteína de choque térmico 70) o *srya* (proteína del locus de serendipia alfa).
19. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en la que uno de los promotores primero y segundo es *Hsp70* y el otro de los promotores primero y segundo es *srya*.
20. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno del primero y segundo sistemas de expresión génica comprende un tercer gen dominante letal y un tercer promotor operativamente unido al tercer gen letal

dominante, en el que el factor de transcripción de activación capaz de activar el promotor de dicho sistema de expresión génica también es capaz de activar el tercer promotor.

21. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 20, dependiente de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicho sistema de expresión génica comprende además un potenciador asociado con el promotor de dicho sistema de expresión génica, y el tercer promotor está también asociado con dicho potenciador.

22. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, en la que el tercer gen letal dominante es *VP16* (proteína del virus del herpes simple vmw65) y el tercer promotor es *Hsp70* o *srya*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

27. Un vector recombinante, que comprende la secuencia de polinucleótidos según se describe en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el vector recombinante comprende además al menos cuatro repeticiones invertidas, formando al menos dos pares de repeticiones invertidas opuestas.

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

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

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

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

las cuatro repeticiones invertidas del transposón son repeticiones invertidas piggyBac, el primer par consta de un extremo 3' piggyBac interno proximal de la secuencia de polinucleótidos y un extremo 5' *piggyBac* externo distal de la secuencia de polinucleótidos, y

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ii) amplificar la muestra de ADN, y

iii) detectar el ADN amplificado.

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

36. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 6 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 7; o el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 5; o el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 10 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 11.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el primer y segundo primers tienen las secuencias de nucleótidos representadas por las SEQ ID NOs: 10 y 11, respectivamente.
38. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en el que la sonda tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12.
39. Un método para controlar una población de insectos que comprende liberar un insecto que comprende el vector recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28-33.
40. El método de la reivindicación 39, en el que el insecto es *Ceratitis capitata*.

P-12634

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2016/0005027**
Solicitud de patente a nombre de **OXITEC LIMITED**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad **OXITEC LIMITED**, domiciliada en Abingdon, Reino Unido, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al Oficio No. **11410** notificado por comunicación electrónica el 25 de septiembre de 2018 y relacionado con concepto técnico de fondo, me permito manifestar:

1. Modificaciones al capítulo reivindicatorio

En primer lugar, con fundamento en la facultad que confiere el Artículo 34 de la Decisión 486/00 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, me permito presentar junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de 40 reivindicaciones y reemplaza completamente al anteriormente presentado, el cual comprende las siguientes modificaciones:

- 1.1.** La reivindicación 3 anteriormente presentada fue modificada para reemplazar el término “spliceosoma” por “espliceosoma”.
- 1.2.** La reivindicación 13 anteriormente presentada fue modificada para reemplazar “primero” por “primer”; y para eliminar un “de” sobrante.
- 1.3.** La reivindicación 27 anteriormente presentada fue modificada para especificar que el vector recombinante comprende además al menos cuatro repeticiones invertidas, formando al menos dos pares de repeticiones invertidas opuestas.
- 1.4.** La reivindicación 28 anteriormente presentada fue modificada para reemplazar el término “constructo” por “vector recombinante”; y para eliminar el término “al menos”.
- 1.5.** La reivindicación 34 anteriormente presentada fue modificada para reemplazar el término “constructo genético” por “vector recombinante”; y para eliminar las secuencias de los primers.
- 1.6.** La reivindicación 35 anteriormente presentada fue modificada para eliminar la secuencia de la sonda.

1.7. La reivindicación 36 anteriormente presentada fue modificada para hacerla dependiente de la reivindicación de método 34, incluyendo las secuencias de los primers eliminadas de esta última.

1.8. La reivindicación 37 anteriormente presentada fue modificada para hacerla dependiente de la reivindicación de método 34.

1.9. La reivindicación 38 anteriormente presentada fue modificada para hacerla dependiente de la reivindicación de método 35.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

2. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito comentar que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con el mismo número de cláusulas que el anteriormente presentado.

3. Claridad y concisión del capítulo reivindicatorio

Ahora bien, con relación a la claridad y concisión de las reivindicaciones, me permito manifestar que mediante el nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones a este respecto, ya que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención reclamada, cuentan con pleno soporte en la descripción de la solicitud en estudio, y siguen las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico. En particular, frente a cada objeción, me permito señalar lo siguiente:

3.1. *“Las reivindicaciones 1 y 27 no son claras ni concisas, toda vez que no se definen las características técnicas esenciales del “vector recombinante” reclamado en la reivindicación independiente 27, y por lo tanto, no se logra distinguir indiscutiblemente la materia reclamada en dicha reivindicación respecto de la reclamada en la reivindicación independiente 1. Se sugiere al solicitante caracterizar la estructura del vector recombinante en términos de su secuencia de nucleótidos (SEC ID NO.), o incluyendo cada una de sus características técnicas esenciales que le diferencian del constructo y/o secuencia de polinucleótidos de la reivindicación independiente 1.”*

En respuesta a lo anterior, me permito indicar que, tal y como se expuso en el numeral 1.3 del presente memorial, la reivindicación 27 anteriormente presentada fue modificada para especificar que el vector recombinante comprende además al menos cuatro

repeticiones invertidas, formando al menos dos pares de repeticiones invertidas opuestas. De esta manera, esta reivindicación limita aún más el alcance de la reivindicación 1 y es una reivindicación dependiente adecuada. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que la objeción a este respecto sea retirada.

3.2. *“La reivindicación 3 no es clara, toda vez que emplea el término “spliceosoma”, el cual pareciera ser un anglicismo pero no un término técnico aceptado en idioma Español para hacer referencia al complejo de ribonucleoproteínas de corte y empalme encargado del procesamiento del mRNA. Se sugiere al solicitante reemplazar dicho término por “esspliceosoma”.”*

A este respecto, me permito indicar que, tal y como se expuso en el numeral 1.1 del presente memorial, la reivindicación 3 anteriormente presentada fue modificada para reemplazar el término “spliceosoma” por “esspliceosoma” y así superar esta objeción.

3.3. *“La reivindicación 13 no es clara, toda vez que emplea la expresión “(...) en la que uno o ambos del primero y segundo sistemas de expresión de génica (...)”, la cual presenta errores gramaticales, tales como en el número gramatical y las preposiciones. Se sugiere al solicitante realizar los ajustes gramaticales a que haya lugar.”*

En relación con lo anterior, me permito indicar que, tal y como se expuso en el numeral 1.2 del presente memorial, la reivindicación 13 anteriormente presentada fue modificada para reemplazar “primero” por “primer” y eliminar un “de” sobrante, para así corregir la redacción de esta reivindicación. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que la objeción a este respecto sea retirada.

3.4. *“Las reivindicaciones 27 – 33 no son claras, porque emplean indistintamente los términos: “vector recombinante” y “constructo genético” para referir a elementos diferentes de la materia reclamada en dichas reivindicaciones; considere por ejemplo que, en el campo técnico de la invención, un vector recombinante corresponde a una molécula que transporta un fragmento de ADN y que incluye los elementos genéticos suficientes para transferir o replicar dicho fragmento, mientras que un constructo genético (o casete génico) corresponde al fragmento de ADN que contiene, entre otros, el(los) gen(es) y los elementos genéticos necesarios para su expresión en un organismo de interés (organismo transgénico). Se sugiere al solicitante realizar los ajustes y precisiones técnicas respecto a, i) la definición del objeto o materia a reclamar en las reivindicaciones en mención, y ii) la utilización de los términos técnicos pertinentes para referir a dicho objeto.”*

En conexión con lo anterior, me permito comentar que las reivindicaciones 28 y 34 anteriormente presentadas fueron modificadas para referirse sólo a “vector

recombinante". De esta manera, las nuevas reivindicaciones se refieren sólo a "vector recombinante" y ya no mencionan "constructo genético". Por tanto, la objeción a este respecto se ve superada.

3.5. *"Las reivindicaciones 36 y 37 no son concisas, toda vez que reclaman la misma materia, es decir, una "secuencia de nucleótidos representada por una de las SEQ ID NOs: (...) 10 u 11". Se sugiere al solicitante presentar una única reivindicación independiente que reclame el objeto o materia a proteger."*

En cuanto a lo anterior, me permito indicar que, tal y como se expuso en los numerales 1.7 y 1.8 del presente memorial, las reivindicaciones 36 y 37 anteriormente presentadas fueron modificadas para hacerlas dependientes de la reivindicación de método 34. Por tanto, me permito solicitar a ese Despacho que la objeción a este respecto sea retirada.

En consecuencia, me permito manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio adjunto al presente memorial, que incluye 40 reivindicaciones, cumple a cabalidad con las disposiciones del Artículo 30 de la Decisión 486/00.

4. Nivel inventivo

Por otro lado, el examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo de la presente solicitud en vista de las enseñanzas descritas en los documentos WO2007091099 (D1), WO2005012534 (D2), WO2005003364 (D3) y el Art. 1 titulado "Basic principles of real-time quantitative PCR." (D4).

A este respecto, me permito indicar que el Artículo 18 de la Decisión 486/00 establece que: *"Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*.

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo no es una comparación del estado del arte y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo debe demostrar la obviedad de la invención analizada, estableciendo que para una persona normalmente versada en la materia dicha invención habría sido evidente a la luz de lo divulgado por el arte previo en el momento de su desarrollo.

Considerando esta definición, me permito exponer los siguientes argumentos técnicos que demuestran el nivel inventivo de la invención definida en las nuevas reivindicaciones 1 a 40.

4.1. Reivindicaciones 1-27

El examinador reconoce la novedad de las reivindicaciones 1-27, pero afirma que las reivindicaciones no son inventivas sobre D1 (WO2007091099) en vista de D2 (WO2005012534).

La reivindicación 1 menciona, *inter alia*, un polinucleótido que comprende un primer y un segundo sistema de expresión génica para expresarse en un insecto, en donde:

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

En el polinucleótido reivindicado, el primer y segundo factores de transcripción de activación expresados (por ejemplo, tTAV) a su vez impulsan una mayor expresión génica de los sistemas de expresión génica, incluidos los propios factores de transcripción de activación. En otras palabras, debido a que cada sistema de expresión génica comprende un gen que codifica un factor de transcripción de activación, "tanto el primer como el segundo sistema de expresión génica actúan como circuitos de retroalimentación positiva". Descripción de la presente solicitud en la página 37, líneas 27-29, y en la página 38, líneas 4-7. Por lo tanto, debido a la presencia de **un gen que codifica un segundo factor de transcripción de activación**, el polinucleótido actualmente reivindicado comprende **dos bucles de retroalimentación positiva**.

El examinador reconoce que D1 no enseña un segundo sistema de expresión génica que comprende un gen que codifica un segundo factor de transcripción de activación. Sin embargo, el examinador afirma que D2 enseña que un constructo puede comprender dos o más cistrones o sistemas genéticos que son letales dominantes, controlables y específicos para cada género, utilizando genes letales como *tTA*.

No obstante, incluso suponiendo que las supuestas enseñanzas de D1 y D2 fueran ciertas, todavía no hay razón para que el experto en la materia combine D1 y D2 de la manera propuesta por el examinador. Además, no existe una expectativa razonable de éxito de que el experto en la materia llegue al polinucleótido reivindicado que comprende bucles de retroalimentación positiva doble, como una solución al problema técnico a resolver.

A. No hay razón para combinar D1 y D2 porque D1 requiere específicamente una proteína funcional distinta de tTAV en sus constructos, incluido el pLA3376 citado por el examinador.

El examinador cita el pLA3376 de D1 (SEQ ID NO: 55) como presuntamente un constructo que tiene dos sistemas de expresión génica. Sin embargo, pLA3376 contiene *Bztra*-intron-*tTAV3* y *Bztra* intron-*reaper^{KR}*, donde ***el segundo casete de expresión génica (Bztra intron-*reaper^{KR}*) no contiene ningún gen que codifique un segundo factor de transcripción de activación, como tTAV o una variante del mismo.*** El producto génico letal *Reaper^{KR}* no proporciona ningún mecanismo de retroalimentación positiva. Por lo tanto, pLA3376 no comprende bucles de retroalimentación positiva doble como la presente reivindicación 1. Al igual que pLA3376, otras construcciones en D1, como pLA3166 y pLA3014, también contienen solo *reaper^{KR}* pero no *tTAV* o una variante en el segundo casete de expresión génica. En el mejor de los casos, estos constructos en D1 contienen **un solo bucle de retroalimentación positiva.**

De hecho, D1 como un todo enseña inequívocamente que estos constructos se hicieron por una razón específica, a saber, para mostrar que una proteína funcional **distinta de tTAV** funcionaría para su propósito previsto. Por ejemplo, D1 enseña:

También hemos creado recientemente, y hemos obtenido productos transgénicos con, ***constructos basados en Ccra 'solo intrón' con el intrón en un gen diferente (todos los ejemplos anteriores están en tTAV o una de sus variantes, es decir, tTAV2 o tTAV3).*** Estos constructos funcionan según lo previsto. Este es un resultado importante, ya que muestra que no hay secuencias exónicas esenciales en *Ccra* que simplemente hayamos duplicado (en función, si no necesariamente en secuencia) por casualidad, en *tTAV*. También tenemos ***constructos de ubi-rpr^{KR} de este tipo (LA3014 y LA3166),*** que también valida el método de fusión de ubiquitina descrito anteriormente.

D1 en la página 35, segundo párrafo completo (énfasis añadido).

En vista de lo anterior, el experto en la materia leyendo D1 como un todo no tendría razón ni motivación para desviarse de su enseñanza inequívoca, reemplazando el gen letal *reaper^{KR}* en pLA3376, pLA3166 o pLA3014 con *tTAV* o una variante del mismo, o agregando otro gen *tTAV* en cualquiera de estos constructos. Después de todo, el gen letal *reaper^{KR}* se eligió para ser incluido en los constructos precisamente porque era diferente de *tTAV* o una variante del mismo. La modificación propuesta por el examinador de D1 anularía completamente el propósito de estos constructos, ya que hubiera sido imposible probar si una proteína funcional distinta de *tTAV* o una variante

de la misma funcionaría cuando ambos casetes en el constructo expresan solo tTAV o una variante de la misma y ninguna otra proteína letal funcional.

Por al menos las razones anteriores, no hay razón para modificar los constructos de bucle de retroalimentación positiva única de D1 para que incluyan bucles de retroalimentación positiva doble.

B. No hay razón para combinar D1 y D2 porque la modificación propuesta por el examinador haría que el sistema letal de retroalimentación positiva femenino específico de D1 no sea satisfactorio para su propósito previsto.

El examinador enmarca el problema a resolver como la provisión de un constructo que permita mejorar la eficiencia en el control de insectos. El examinador afirma además que “el efecto que se logra por el hecho de incluir dos sistemas de expresión genéticos dominantes, controlables y letales específicos de género, es que se pueden aumentar los niveles de expresión (en el caso donde los sistemas consideren el mismo transgén) o se pueden tener varios productos funcionales (en el caso donde los sistemas consideran distintos transgenes) que mejoran la letalidad o respuesta en los organismos de interés”.

Como se discutió anteriormente, los constructos de D1 contienen un solo bucle de retroalimentación positiva. D1, sin embargo, no se trata simplemente de un sistema de retroalimentación positiva. De hecho, D1 tiene como objetivo lograr la letalidad específica por sexo mediante la combinación del mecanismo de retroalimentación positiva y el empalme alternativo específico al sexo. D1 en la página 25, segundo párrafo completo y reivindicaciones 1 y 8. Por ejemplo, el bucle de retroalimentación positiva único está diseñado para producir desde el casete de expresión de *tTAV* grandes cantidades de tTAV, lo que impulsa la transcripción tanto del casete de expresión de *tTAV* como del casete de expresión de *reaper*^{KR} para generar pre-ARNm. Estos pre-ARNm deben empalmarse correctamente o alternativamente para producir productos genéticos letales en las hembras, pero no en los machos. Véase, por ejemplo, Fu *et al.*, “Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing,” *Nature Biotechnology* (2007) 25(3):353-357, en la página 355, columna derecha, líneas 11-14 (en donde se enseña que se requieren niveles altos de empalme tipo F1 (tipo hembra) para que el sistema de retroalimentación positiva femenino específico sea letal). Una copia de Fu *et al.* se adjunta al presente memorial.

En vista de lo anterior, la persona normalmente versada en la materia leyendo D1 no incluiría otro gen activador de la transcripción en sus en sus constructos de bucle de retroalimentación positiva único simplemente como una opción de diseño. Él o ella tendría que considerar primero el efecto de la modificación en el empalme alternativo

específico del sexo. Si la modificación hace que el empalme alternativo específico del sexo en los constructos de D1 no sea satisfactorio para el efecto letal deseado, entonces no hay razón para modificar D1.

En el momento de la presentación, se sabía que los factores que regulan el empalme alternativo son relativamente escasos, y que la vía de empalme alternativa puede saturarse si se produce demasiado pre-ARNm. Véase, por ejemplo, Fu *et al.* en la página 355, columna derecha, líneas 7-11. Por lo tanto, el experto en la materia no tendría razón para proporcionar un segundo bucle de retroalimentación positiva en los constructos de D1 y, en realidad, podría haber sido disuadido de hacerlo. Por ejemplo, los dos bucles de retroalimentación positiva pueden producir demasiado pre-ARNm, lo que conduce a la saturación de la vía de empalme alternativa y, en consecuencia, una capacidad reducida para producir altos niveles de empalme de tipo femenino. *Id.* Por lo tanto, el constructo modificado probablemente no sería letal, y la modificación probablemente tornaría insatisfactorio el sistema de retroalimentación positiva femenino específico de D1 para su propósito previsto o incluso completamente inoperable. *Id.*

Dadas las revelaciones de D1 y el conocimiento en la técnica tal como se enseña en Fu *et al.*, el experto en la materia no tendría motivos para modificar D1 proporcionando un segundo bucle de retroalimentación positiva. El examinador no ha identificado ninguna enseñanza o sugerencia de un segundo bucle de retroalimentación positiva en D2, y la supuesta enseñanza de D2 de los sistemas de expresión multicistronicos ciertamente no remedia las deficiencias de D1. De hecho, el experto en la materia que considera la técnica anterior como un todo habría sido disuadido de proporcionar un segundo bucle de retroalimentación positiva en D1 para evitar la saturación de la vía de empalme alternativa.

C. Los polinucleótidos actualmente reivindicados logran la letalidad específica femenina que se produce durante una etapa inesperadamente temprana del desarrollo en comparación con los constructos de bucle de retroalimentación positiva único.

A pesar de las enseñanzas de D1 y Fu *et al.*, los presentes inventores probaron constructos con un circuito de retroalimentación positiva doble entre otras ideas que tuvieron, sin saber si estos constructos proporcionarían una mejor letalidad femenina específica. Sorprendentemente, los inventores demostraron que el polinucleótido actualmente reivindicado logró la letalidad femenina específica en una etapa de desarrollo sorprendente e inesperadamente temprana, lo que proporciona el beneficio de asegurar que las hembras morirán antes de cualquier posibilidad de eclosión. Véase, por ejemplo, la descripción de la presente solicitud en la página 4, líneas 8-25.

Específicamente, las líneas LA3097 descritas en D1 contenían solo un bucle de retroalimentación positiva único y dieron como resultado la letalidad femenina específica en Medflies que ocurrió durante **la etapa pupal** de desarrollo. Véase, por ejemplo, Fu *et al.* en la Figura 3 y la página 354, columna derecha, líneas 21-24; D1 en la página 34, primer párrafo completo, y la Figura 35; D1 en la página 35, tercer párrafo completo, y Figura 38.

En contraste, las Medflies hembras transgénicas positivas para constructos que contienen dos bucles de retroalimentación positiva como se reclama actualmente murieron durante las **primeras etapas larvales**. Por ejemplo, la descripción de la presente solicitud revela:

En algunas implementaciones, una *Ceratitis capitata* transformada que comprende la secuencia representada por la SEQ ID NO: 2 (i.e., OX3864A) es particularmente preferida por las siguientes razones:

- i) La penetración del transgen es un 100% con una copia; i.e., como se ve en los Ejemplos, **incluso en un estado heterocigótico todas las hembras murieron en ausencia de tetraciclina a partir del medio larvario**;
- ii) La relación macho-hembra en presencia de tetraciclina incorporada en la dieta larvaria es de 50:50 indicando una buena reprimibilidad de la expresión transgénica en las hembras (esto es importante para una propagación costo-efectiva de la cepa en una instalación de cría);
- iii) OX3864A mostró **letalidad en hembras pre-pupales completa** en ausencia de tetraciclina;

...

Descripción de la presente solicitud en la página 49, líneas 16-31 (énfasis añadido).

La Figura 8 de la presente solicitud muestra los resultados de un experimento de retorno pupal dinámico que dependía de la producción de huevos y la supervivencia pupal, y los resultados reflejaron que "el número de huevos puestos y la acción de RIDL [Liberación de Insectos portadores de Letales Dominantes, por sus siglas en inglés] en la **supervivencia larval de las hembras**". Descripción de la presente solicitud en el Ejemplo 3 (énfasis añadido).

Además, había una falta de larvas muertas de los transgénicos de bucle de retroalimentación positiva doble, lo que indica que las hembras se estaban muriendo en una etapa muy temprana, incluso antes de que crecieran lo suficiente para ser detectadas. En otras palabras, las hembras muertas eran demasiado pequeñas para encontrarlas - las larvas Medfly excavan en el medio de alimentación y solo emergen

del medio de alimentación como las larvas L3, por lo que cavar para encontrar pequeños embriones y larvas tempranas es muy difícil.

En vista de lo anterior, los constructos de bucle de retroalimentación positiva doble mostraron letalidad femenina específica **en una etapa larvaria muy temprana**, mucho antes que los constructos de bucle de retroalimentación único de D1 que mostraron letalidad **en la etapa pupal**.

Estos resultados de los presentes inventores no se habrían esperado con base en las enseñanzas de D1. Por ejemplo, en el momento de la presentación, un experto en la técnica esperaría que dos bucles de retroalimentación positiva produzcan demasiados pre-ARNm y saturen la vía de empalme alternativa. Véase, por ejemplo, Fu *et al.*, en la página 355, columna derecha, líneas 7-11. La consecuente disminución de la capacidad para producir altos niveles de empalme de tipo femenino probablemente haría que el constructo de D1 modificado no sea letal, por lo que se anula el propósito de D1 de proporcionar un sistema de expresión letal para el control biológico.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-27 son inventivas sobre D1 y D2.

4.2. Reivindicaciones 28-33

El examinador reconoce la novedad de las reivindicaciones 28-33, pero afirma que las reivindicaciones no son inventivas sobre D1 en vista de D3 (WO2005003364).

No obstante, las reivindicaciones 28 a 33 dependen indirectamente de la reivindicación independiente 1 (a través de la reivindicación 27). Como se discutió anteriormente, la reivindicación 1 es inventiva sobre D1 y D2, por lo tanto, también son inventivas sobre D1 solo. D3 supuestamente enseña un constructo que comprende un elemento transponible con al menos cuatro repeticiones invertidas que es eficaz para integrar el ADN en el genoma de un huésped. Sin embargo, D3 no proporciona ninguna enseñanza o sugerencia que motive a la persona experta a generar un vector recombinante que comprenda una secuencia de polinucleótidos que comprenda dos bucles de retroalimentación positiva. Además, D3 no proporciona ninguna enseñanza o sugerencia de que un vector de este tipo que contiene dos bucles de retroalimentación positiva tenga una eficacia sorprendente o inesperada para la letalidad específica de las hembras.

Por al menos estas razones, D1 y D3 no destruyen el nivel inventivo de dichas reivindicaciones.

4.3. Reivindicaciones 34 y 35

El examinador reconoce la novedad de las reivindicaciones 34 y 35, pero afirma que las reivindicaciones no son inventivas sobre D3 en vista de D1.

No obstante, las reivindicaciones 34 y 35 dependen indirectamente de la reivindicación independiente 1 (a través de las reivindicaciones 27 a 33). Como se discutió anteriormente, la reivindicación 1 es inventiva sobre D1 y D3. Por lo tanto, las reivindicaciones 34 y 35 son inventivas sobre D1 y D3 por al menos las mismas razones.

4.4. Reivindicaciones 36 y 37

El examinador reconoce la novedad de las reivindicaciones 36 y 37, pero afirma que las reivindicaciones no son inventivas sobre D3 en vista de D1.

No obstante, las reivindicaciones 36 y 37 dependen indirectamente de la reivindicación independiente 1 (a través de la reivindicación 34 y las reivindicaciones 27-33). Como se discutió anteriormente, la reivindicación 1 es inventiva sobre D1 y D3. Por lo tanto, las reivindicaciones 36 y 37 son inventivas sobre D1 y D3 por al menos las mismas razones.

4.5. Reivindicación 38

El examinador reconoce la novedad de la reivindicación 38, pero afirma que la reivindicación no es inventiva sobre D2 en vista de D4.

Sin embargo, la reivindicación 38 depende indirectamente de la reivindicación independiente 1 (a través de las reivindicaciones 34 y 35 y las reclamaciones 27-33). Como se discutió anteriormente, la reivindicación 1 es inventiva sobre D1 y D2 y por lo tanto es inventiva sobre D2 solo. D4 supuestamente enseña a diseñar sondas de hibridación en general. Sin embargo, D4 no proporciona ninguna enseñanza o sugerencia que motive a la persona experta a generar un vector recombinante que comprenda una secuencia de polinucleótidos que comprenda dos bucles de retroalimentación positiva. Además, D4 no proporciona ninguna enseñanza o sugerencia de que un vector de este tipo que contiene dos bucles de retroalimentación positiva tenga una eficacia sorprendente o inesperada para la letalidad específica de las hembras. Como tal, la reivindicación 1 es inventiva sobre D2 y D4. La reivindicación 38 es, por lo tanto, también inventiva sobre D2 y D4.

4.6. Reivindicaciones 39 y 40

El examinador reconoce la novedad de las reivindicaciones 39 y 40, pero afirma que las reivindicaciones no son inventivas sobre D1 en vista de D2.

Las reivindicaciones 39 y 40 dependen indirectamente de la reivindicación independiente 1 (a través de la reivindicación 27 y las reivindicaciones 28-33). Como se discutió anteriormente, la reivindicación 1 es inventiva sobre D1 y D2. Por lo tanto, las reivindicaciones 39 y 40 son inventivas sobre D1 y D2 por al menos las mismas razones.

En consecuencia, me permito señalar que los documentos D1 a D4 no afectan el nivel inventivo de la presente solicitud y la objeción a este respecto se ve superada, toda vez que no existe motivación alguna para que una persona del oficio normalmente versada en la materia derive de manera obvia la presente invención a partir de dichas anterioridades, demostrándose así que las reivindicaciones 1 a 40 del nuevo capítulo reivindicatorio cumplen con el requisito de nivel inventivo según los lineamientos del Artículo 18 de la Decisión 486/00.

5. Concesión de solicitudes equivalentes en otras jurisdicciones

Por otra parte, amablemente me permito resaltar el hecho de que la Oficina Europea de Patentes (EPO, por sus siglas en inglés) ha notificado su intención de otorgar una patente a una reivindicación independiente 1 similar en vista de estado de la técnica similar (Solicitud de patente europea correspondiente EP 15750085.1). La siguiente tabla resume el arte citado por la EPO en relación con el arte citado en la presente solicitud colombiana. Se adjunta una copia de la Comunicación de la Norma 71(3) EPC (Aviso de intención de otorgar una patente) y una lista de las reclamaciones permitidas para su inmediata referencia.

Estado del arte citado en NC2016/0005027	Estado del arte citado en EP 15750085.1
D1: WO2007/091099 A1	D1: GB2443186A
D2: WO2005/012534 A1	D2: WO2005/012534 A1
D3: WO2005/003364	D4: WO2005/003364

A este respecto, me permito explicar que el arte previo más cercano D1 en el caso de la EPO (Publicación No. GB2443186A, Solicitud No. GB 0621234.4) es una solicitud de prioridad del D1 (WO2007091099, Solicitud No. PCT/GB2007/000488) citado en la presente solicitud colombiana. D2 en el caso de la EPO es igual que D2 en la presente solicitud, y D4 en el caso de la EPO es igual que D3 en la presente solicitud.

De esta forma, aunque el solicitante reconoce el principio de independencia de cada Oficina de Patentes, resulta pertinente destacar a ese Despacho que otras Oficinas ya han reconocido el nivel inventivo de la invención reclamada y, en general, el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad por parte de la solicitud en estudio.

6. Conclusiones

Finalmente, a la luz de las modificaciones al capítulo reivindicatorio y los argumentos presentados, es posible concluir lo siguiente:

6.1. La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada por la descripción, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486/00.

6.2. La presente solicitud es patentable sobre los documentos D1 a D4, de acuerdo con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486/00.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486/00.

7. Anexos

7.1. Nuevo capítulo reivindicatorio que comprende 40 reivindicaciones.

7.2. Copia del artículo científico: Fu *et al.*, "Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing," *Nature Biotechnology* (2007) 25(3):353-357.

7.3. Copia de la Comunicación de la Norma 71(3) EPC de la solicitud europea correspondiente.

Señor Director,


CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

P-12634

Nuevo capítulo reivindicatorio

Diciembre 21, 2018

REIVINDICACIONES

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

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

en donde

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

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

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

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

2. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el primer factor de transcripción de activación es el producto génico del primer gen letal dominante y/o el segundo factor de transcripción de activación es el producto génico del segundo gen letal dominante, de manera que dicho factor de transcripción también proporciona el efecto letal conferido por dicho gen letal dominante.

3. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que una o ambas de la primera y la segunda secuencia de control de empalme media la expresión específica de la hembra por el respectivo gen letal dominante, junto con un

espliceosoma mediando el empalme de un transcripto de ARN del gen letal dominante respectivo para producir un mRNA que codifica una proteína funcional y al menos un mRNA que codifica una proteína no funcional, en donde el mRNA que codifica una proteína funcional se produce en una hembra.

4. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada uno de los promotores primero y segundo es sustancialmente inactivo en ausencia del factor de transcripción de activación capaz de activar dicho promotor.

5. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal es, independientemente, tTA (activador de la transcripción reprimible con tetraciclina) o una tTAV (variante del gen tTA).

6. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 5, en la que uno o ambos del primero y segundo gen letal dominantes es, independientemente, uno de tTAV (SEQ ID NO: 26), tTAV2 (SEQ ID NO: 27) y tTAV3 (SEQ. ID NO: 28).

7. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un intrón *tra*, un gen *dsx* o un gen *Actina*-4.

8. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan, independientemente, de un intrón *tra*.

9. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de un Tephritid.

10. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de uno de los géneros *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* y *Rhagoletis*.

11. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que una o ambas de la primera y segunda secuencia de control de empalme se derivan de *Ceratitis capitata*.

-
12. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en la que una de la primera y segunda secuencias de control de empalme se deriva de *Ceratitis capitata* y la otra secuencia de control de empalme se deriva de una especie diferente.
13. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primer y segundo sistemas de expresión génica además comprende un potenciador asociado con el promotor respectivo, y al menos uno de los factores de transcripción de activación actúa en el potenciador respectivo.
14. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el potenciador, o uno o ambos de los potenciadores, es un elemento *tetO* (operador de tetraciclina) que comprende una o más repeticiones de *tetO*.
15. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 14, en la que cada potenciador es, independientemente, *tetOx7*, *tetOx14* o *tetOx21*.
16. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos del primero y segundo promotores es un promotor embrionario.
17. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno o ambos de los promotores primero y segundo es un promotor mínimo.
18. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 16, en la que cada uno de los promotores primero y segundo es, independientemente, *Hsp70* (proteína de choque térmico 70) o *srya* (proteína del locus de serendipia alfa).
19. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en la que uno de los promotores primero y segundo es *Hsp70* y el otro de los promotores primero y segundo es *srya*.
20. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que uno del primero y segundo sistemas de expresión génica comprende un tercer gen dominante letal y un tercer promotor operativamente unido al tercer gen letal dominante, en el que el factor de transcripción de activación capaz de activar el promotor de dicho sistema de expresión génica también es capaz de activar el tercer promotor.
21. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 20, dependiente de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicho sistema de expresión

génica comprende además un potenciador asociado con el promotor de dicho sistema de expresión génica, y el tercer promotor está también asociado con dicho potenciador.

22. La secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, en la que el tercer gen letal dominante es *VP16* (proteína del virus del herpes simple vmw65) y el tercer promotor es *Hsp70* o *srya*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

recombinante comprende además al menos cuatro repeticiones invertidas, formando al menos dos pares de repeticiones invertidas opuestas.

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

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

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

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

las cuatro repeticiones invertidas del transposón son repeticiones invertidas piggyBac,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ii) amplificar la muestra de ADN, y

iii) detectar el ADN amplificado.

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

36. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 6 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 7; o el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 4 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 5; o el primer primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 10 y el segundo primer tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 11.

37. El método de acuerdo con la reivindicación 34, en el que el primer y segundo primers tienen las secuencias de nucleótidos representadas por las SEQ ID NOs: 10 y 11, respectivamente.

38. El método de acuerdo con la reivindicación 35, en el que la sonda tiene la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 12.

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

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

Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing

Guoliang Fu^{1,3}, Kirsty C Condon¹⁻³, Matthew J Epton², Peng Gong², Li Jin¹, George C Condon¹, Neil I Morrison^{1,2}, Tarig H Dafa'alla¹ & Luke Alphey^{1,2}

The Sterile Insect Technique is a species-specific and environmentally friendly method of pest control involving mass release of sterilized insects that reduce the wild population through infertile matings¹⁻⁵. Insects carrying a female-specific autocidal genetic system offer an attractive alternative to conventional sterilization methods^{6,7} while also eliminating females from the release population⁷⁻¹⁰. We exploited sex-specific alternative splicing in insects to engineer female-specific autocidal genetic systems in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. These rely on the insertion of cassette exons from the *C. capitata transformer* gene into a heterologous tetracycline-repressible transactivator such that the transactivator transcript is disrupted in male splice variants but not in the female-specific one. As the key components of these systems function across a broad phylogenetic range, this strategy addresses the paucity of sex-specific expression systems (e.g., early-acting, female-specific promoters) in insects other than *Drosophila melanogaster*. The approach may have wide applicability for regulating gene expression in other organisms, particularly for combinatorial control with appropriate promoters.

The Mediterranean fruit fly, or medfly, is one of the most economically important agricultural pest insects in the world. It is a true fruit fly (family Tephritidae); this group also contains many other important pest species. The Sterile Insect Technique (SIT) has been used extensively for the control of medflies, and also on a smaller scale against other tephritids. Although early SIT programs released both males and females, it is now considered highly desirable to release only males^{9,10}. For some species, sterile females are potentially damaging, either to agriculture (e.g., medflies) or public health (e.g., mosquitoes). Co-release of sterile females may also cause the sterile males to court these co-released females instead of seeking out wild females. In some species, sufficient sexual dimorphism exists for efficient sex separation by physical methods. Alternatively, a suitable sexual dimorphism can be induced by genetics; such strains are known as genetic-sexing strains. Sexing strains established using classical genetics have a recessive, selectable marker on an autosome and a covering translocation to the Y chromosome¹¹. Various selectable markers have

been used, including insecticide resistance and pupal color, but perhaps the most sophisticated is the medfly temperature-sensitive-lethal (tsl) system^{10,11}. The mutations and chromosome rearrangements required to construct these strains inevitably impose various fitness penalties; for the tsl strains these are clearly outweighed by the benefits, but are still undesirable. Although these systems are triumphs of classical genetics, their development is lengthy and uncertain. Furthermore, none of the special chromosomes created can be transferred to another species.

Recombinant DNA methods have the potential to produce alternative genetic sexing systems, with proof of principle provided in the model insect *D. melanogaster*^{7,8}. One attractive feature of such systems is the prospect that they might be translated from one species to another much more readily than translocation-based systems. Furthermore, a specific strategy termed 'release of insects carrying a dominant lethal' (RIDL) could provide both genetic sexing and 'sterilization' from the same construct^{6,7,12}, which strains developed by classical genetics cannot readily accomplish. Such a scheme would involve mass-rearing a strain homozygous for a repressible female-specific dominant lethal under permissive conditions. The release generation would be reared under restrictive conditions (without the repressor), killing the females and providing a male-only population for release. These released males would mate with wild females, and their female progeny, lacking the repressor chemical, would die. This would reduce the reproductive capacity of the population, thereby potentially controlling it^{6,7,13,14}.

A severe limitation in the development of this approach in insects besides *D. melanogaster* has been the general lack of characterized gene expression systems capable of conferring female-specific expression at early developmental stages. We developed a system for the control of gene expression to overcome this problem, and used it to construct pest strains with the necessary properties for this approach.

The proof-of-principle experiments in *D. melanogaster* used the tetracycline-repressible transcription factor (tTA)¹⁵ system to control the expression of an effector molecule by a tetracycline response element (tRE), and yolk protein promoters to confer female specificity^{7,8}. These promoters are not ideal, as they may not conserve their female specificity between species¹⁶ and also act later in development than is desirable. Furthermore, these promoters contain strong

¹Oxitec Limited, 71 Milton Park, Oxford OX14 4RX, UK. ²Department of Zoology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3PS, UK. ³These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to L.A. (luke.alphey@zoo.ox.ac.uk).

Received 12 June 2006; accepted 14 September 2006; published online 18 February 2007; doi:10.1038/nbt1283

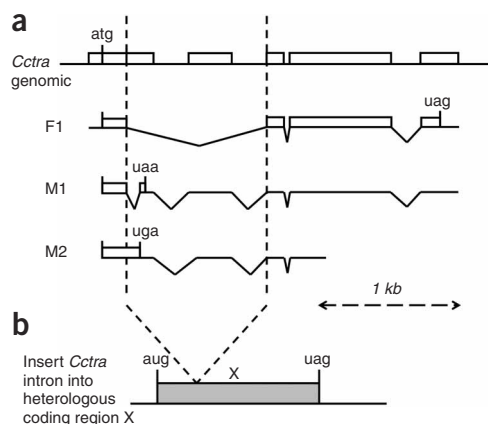


Figure 1 Sex-specific expression by alternative splicing of *Cctra*. (a) Sex-specific alternative splicing of medfly *transformer* (*Cctra*). *Cctra* is spliced in females to produce three transcripts: F1, M1 and M2. F1 encodes functional Tra protein, but M1 and M2 do not because they include additional exons with in-frame stop codons (redrawn from ref. 19). Males produce only transcripts M1 and M2 and therefore do not produce functional Tra protein. (b) Use of *Cctra* intron to regulate gene expression. If this alternatively spliced intron were to retain its function in a heterologous coding region, females, but not males, would produce functional protein X.

transcriptional enhancers, making it difficult to combine the two components of the expression system (promoter-tTA and tRE-effector) in a single construct. We therefore attempted a different approach, using alternative splicing. Along with promoter specificity, alternative splicing plays a key role in regulating gene expression in many developmental processes, including sex determination^{17–20}, but has not been widely used in genetic engineering.

Two key sex-determination genes of insects, *transformer* (*tra*) and *doublesex* (*dsx*), are both regulated by sex-specific alternative splicing^{17,20}. The *tra* coding region is interrupted by additional exons in males; only females produce a splice variant encoding functional Tra protein. We have exploited this female-specific excision of a cassette exon to prevent expression of an engineered protein in males, thereby making its expression female-specific (Fig. 1).

As the sequence elements necessary for the sex-specific alternative splicing of medfly *transformer* (*Cctra*) are unclear¹⁹, we analyzed transgenic medflies containing constructs with varying amounts of *Cctra*-derived exonic sequence flanking the *Cctra* intron. These experiments suggested that it might be possible to use the intron with no *Cctra*-derived exonic sequence. This would give greater flexibility in the use of the strategy illustrated in Figure 1, which could otherwise only produce fusion proteins including all or part of *Cctra*. Further preliminary transgenic experiments suggested that the dinucleotides TG...GT immediately adjacent to the intron might be important for correct splicing. We inserted the *Cctra* female-specific intron into

the tTAV-coding region (between TG and GT nucleotides) in a positive-feedback configuration previously shown to give repressible dominant lethality in medflies²¹ to make constructs LA3077 and LA3097 (Fig. 2). tTAV is a variant of tTA optimized for expression in *D. melanogaster*. Transgenic medflies carrying LA3077 or LA3097 processed the *Cctra* intron correctly. The F1 variant appeared only in females and sequence analysis showed that all splice variants and junctions corresponded to the predicted forms (Figs. 1 and 2).

Constructs equivalent to LA3077 and LA3097, but without the *Cctra* intron, give tetracycline-repressible, dominant lethality in transgenic medflies²¹. We found that LA3077 and LA3097 correspondingly gave repressible female-specific lethality, predominantly as pupae (Fig. 3 and Supplementary Tables 1 and 2 online). Genetic sexing systems made by classical genetics using visible markers such as pupal color also allow sex separation as pupae, though requiring individual examination and sorting. Embryonic female-specific lethality, as seen in the medfly *tsl* strains, would be preferable as this eliminates diet consumption by unwanted females. Engineered early-acting, tetracycline-repressible lethality may be achievable by use of suitable embryonic promoters²².

The LA3097 lines show highly penetrant, dominant female-specific lethality (LA3097A, 98%; LA3097B and LA3097C, both 100%, Fig. 3) and in this regard are suitable for genetic sexing and/or a female-specific RIDL strategy as outlined above. On a tetracycline-containing diet, two lines (LA3077A and LA3097B) showed a small but significant ($P < 0.002$ and $P < 0.0001$, respectively) loss of females. This may indicate incomplete suppression by this concentration of tetracycline (100 µg/ml), or a tetracycline-independent effect. Similar effects, varying from one insertion line to another, were observed previously²¹. Survival of transgenic female progeny did not seem to be affected by maternal tetracycline (mothers raised on 0 or 100 µg/ml tetracycline). We have also shown previously that constructs of similar

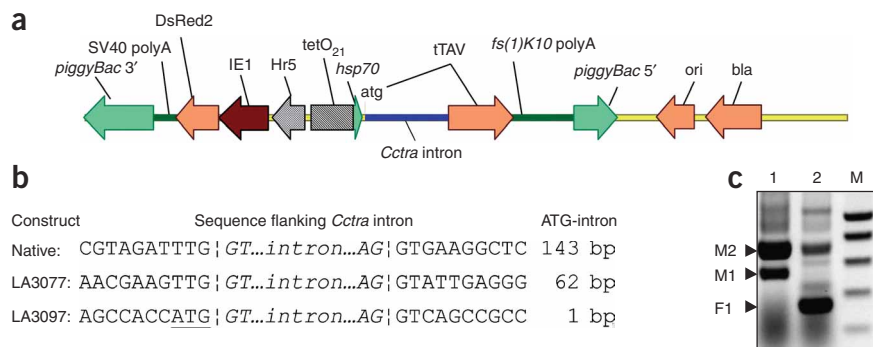


Figure 2 Sex-specific lethal constructs. (a) Diagrammatic representation of plasmid pLA3097, linearized at the 3' end of the *piggyBac* transposon. Within the ends of the transposon are two functional segments: the marker (*hr5-IE1-DsRed2-SV40 3'*)²¹ to allow detection of transgenic individuals by fluorescence and the tTAV expression cassette (*tetO₂₁-Dm^{hsp70} minimal promoter - Cctra:tTAV - fs(1)K10 3'*). The tTAV expression cassette acts by a positive feedback mechanism to induce lethality²¹, but here its expression and therefore lethality is limited to females by a *Cctra*-derived alternative splicing system. The principal difference between pLA3077 and pLA3097 is the location of the *Cctra* intron. (b) Intron-exon boundary sequences of native *Cctra* and *Cctra*-based constructs. The sequence immediately flanking the first intron of *Cctra* F1 is shown in its native context and as inserted in tTAV coding sequence in constructs LA3077 and LA3097. Actual splice junctions, as determined by RT-PCR and sequencing, are marked (|). The start codon of tTAV is underlined. The distances between the start codon (ATG) and the *Cctra* intron are also shown. (c) *Cctra* intron splices correctly in a heterologous context. Gel photo of RT-PCR from male (lane 1) and female (lane 2) LA3097C transgenic Medflies. Lane M, DNA size standards: 200–1,000 bp in 200-bp increments (Eurogentec SmartLadder). Band corresponding to splicing in the F1 pattern (reconstituting the tTAV open reading frame) is seen only in females.

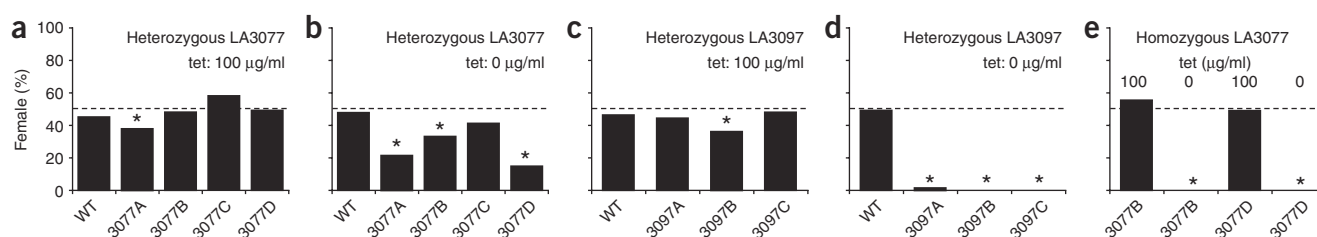


Figure 3 Repressible female-specific lethality in transgenic Medflies. (a–d) Seven independent, autosomal insertion lines of LA3077 and LA3097 were generated in Medflies (LA3077A–D and LA3097A–C). All lines were determined to be single insertions based on segregation analysis and sequencing each insertion site. Males heterozygous for LA3077 (a,b) or for LA3097 (c,d) were crossed to wild-type (WT) females. The progeny were raised on a diet supplemented with tetracycline to 100 µg/ml (a,c) or on a normal diet (b,d). Adult progeny were scored for fluorescence, that is, presence of the construct, and for sex. Graphs show the proportion of females of each class; the dotted line at 50% across each graph represents the expected sex ratio in the absence of female-specific effects. The sex ratio of the nonfluorescent (WT) sibling controls did not differ significantly between lines ($\chi^2 = 16.221$, $P > 0.05$, d.f. = 13, see **Supplementary Table 1** online); these are shown aggregated in the first column of a–d. Other columns are labeled with the construct name and a letter to represent the insertion line (e.g., LA3077A, LA3077B). (e) Effect of increased copy number of LA3077 on the penetrance of the female-specific lethality. Homozygous lines of two insertions of LA3077 were constructed (LA3077B and LA3077D). Homozygous males and females were held and mated on a tetracycline-supplemented or normal diet and their progeny were reared on the same diet as the parents; the numbers of males and females surviving to adulthood were scored (see also **Supplementary Table 2** online). Crosses where significant female-specific lethality was observed (chi-squared test, $P < 0.01$) are marked with an asterisk. Data are the sum of at least three independent experiments.

design, but lethal to both males and females rather than females only, need not have significant deleterious effects on adult male longevity or mating competitiveness²¹. LA3077 is less effective than LA3097 (Fig. 3). There are several slight differences between these constructs that might cause this; one possibility is that the M1 and M2 splice variants of LA3077 might express small fragments of tTAV that interfere with the normal dimerization and function of tTAV. Although the LA3077 lines gave female-specific dominant lethality in the absence of tetracycline (20–80% fewer heterozygous LA3077 females than wild-type females or heterozygous LA3077 males), this is not sufficiently penetrant for ‘genetic sterilization’^{6,7}. However, for genetic sexing, the female-specific lethality would operate on the mass-reared insects themselves, rather than on their progeny after mating to wild type, and therefore on homozygotes rather than heterozygotes. We therefore examined LA3077 homozygotes. LA3077B and LA3077D homozygotes both gave 100% female lethality (Fig. 3e). Therefore, efficient genetic sexing is readily provided by this construct design.

Alternative splicing is potentially an extremely powerful tool for genetic engineering, but may have been avoided until now because there are several potential difficulties. Selection between different potential splice variants is generally thought to depend on exonic

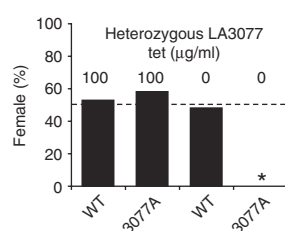


Figure 4 Conservation of function of a *Cctra*-based construct. *D. melanogaster* was transformed with LA3077. Heterozygous males were crossed to wild-type (WT) females and adult progeny analyzed for fluorescence, that is, presence of the LA3077 construct, and for sex. The sex ratio of both nonfluorescent (WT) progeny and transgenic (3077A) progeny was normal on tetracycline-supplemented diet (see **Supplementary Table 3** online); however, no transgenic female progeny were recovered from normal diet (leftmost two columns: tetracycline-supplemented diet, rightmost two columns: normal diet).

splice enhancers and silencers^{17,23}; performance of an intronic fragment may therefore depend on the context in which it is placed. Earlier attempts using alternative splice acceptors from *D. melanogaster tra* (*Dmtra*) had variable success—an *Act5C-Dmtra*- β -galactosidase fusion showed sex-specific splicing, whereas a similar *Dmtra*-*InaZ* fusion did not, even though both had substantial amounts of 3' exonic material from *Dmtra*²⁴. Another potential difficulty concerns saturation of the response capacity. The factors regulating alternative splicing are thought to be in relatively short supply, so that the alternative splicing pathway may be saturated if too much pre-mRNA is provided^{25–27}. In order for the female-specific, positive-feedback system to be lethal, large amounts of tTAV must be produced²¹, and therefore high levels of F1-type splicing are required in females. The demonstration that this occurs implies that the Tra/Tra2-dependent sex-specific splicing system is not easily saturated. For the *Cctra* system, a third problem is inefficiency: a substantial proportion of the pre-mRNA (primary transcript) in females is processed in the M1 and M2 forms (Fig. 1); these do not produce functional protein and therefore tend to attenuate the lethality of LA3077 and LA3097 relative to previous non-sex-specific constructs²¹. However, although this effect occurs, the lethality of both constructs shows the system functions as desired.

A major potential benefit of genetic engineering is the possibility of rapidly translating success from one species to another, which is essentially impossible for classical genetics. Genetic sexing strains would be highly desirable for many species of tephritid fruit fly. To determine whether our *Cctra*-based system would splice correctly in other species, we used the vinegar fly *D. melanogaster*, which diverged from the Tephritidae ~120–150 million years ago²⁸. Two independent lines of transgenic *D. melanogaster*, each carrying LA3077, gave dominant, tetracycline-repressible, female-specific lethality (Fig. 4, data not shown and **Supplementary Table 3** online). As these were 100% penetrant, we did not transform *D. melanogaster* with LA3097, which was created later. On close examination, we found subtle differences in the splicing of the *Cctra* intron between medfly and *D. melanogaster* (**Supplementary Fig. 1** online); nonetheless, the crucial F1 splice variant is identical and completely female-specific in both species. In *D. melanogaster*, *tra* is regulated by *Sex-lethal* (*Sxl*) rather than being autoregulated. However, our data indicate that the system regulating *Cctra* is functionally conserved in *D. melanogaster*.

In other words, DmTra/DmTra-2 can recognize and process *CcTra*-derived transcripts correctly, possibly through the putative Tra/Tra-2 binding sites previously observed in the *CcTra* intron¹⁹. CcTra protein can promote the female-specific splicing of known *tra* targets in *D. melanogaster*²⁹. Together, these observations suggest that the Tra/Tra-2 splicing system is functionally conserved between these species despite the low overall sequence identity between CcTra and DmTra. This further emphasizes the likely wide applicability of the alternative splicing system described here. We therefore expect that constructs of this type will function in most or all higher Diptera, including economically important Tephritidae such as Natal fruit fly (*Ceratitis rosa*), Melon fruit fly (*Bactrocera cucurbitae*), Queensland fruit fly (*Bactrocera tryoni*) and South American fruit fly (*Anastrepha fraterculus*).

Our results demonstrate the potential of controlling gene expression through alternative splicing. We used alternative splicing to confer female specificity on a conditional promoter, but many other combinations are possible. For example, expression specifically in female embryos only would be extremely difficult by conventional methods—promoters with this specificity are unknown, even in *D. melanogaster*. However, one could combine an embryo-specific promoter, for example from *serendipity* α (*sryx*)²², with a suitable splicing system. Such combinatorial control can provide patterns and precision that would be difficult to obtain by any other method. Furthermore, as alternative splicing systems of varying tissue and sex specificity are known from a wide range of eukaryotes, such combinatorial control for precise regulation of gene expression may be of wide applicability.

METHODS

Plasmid construction. In essence, the orientation of the marker in pLA928 (ref. 21) was reversed and the copy number of tetO increased to 21 to give pLA1124. The *CcTra* intron¹⁹ was then inserted into tTAV to generate pLA3077 and pLA3097. While cloning fragments of *CcTra*, we found an additional small intron 3' to the alternatively spliced intron; this is included in **Figure 1**. The key features of, and differences between, pLA3077 and pLA3097 are shown in **Figure 2**. Note that the *hsp70* promoter used is the proximal promoter fragment only, including the transcription start and a short leader sequence; this is not predicted to respond to heat shock. tTAV is a variant of tTA optimized for expression in *D. melanogaster* by eliminating potential cryptic splice sites and rare codons in the *trfR* region²¹. The *fs(1)K10* sequence provides a 3' UTR and polyadenylation signal; it has no sex-specific function²¹. The complete predicted sequences of plasmids pLA3077 and pLA3097 are provided in **Supplementary Figures 2 and 3** online.

Fruit fly rearing and genetics. Medfly transformation and rearing was performed as previously described²¹. Toliman wild-type strain was used both for breeding experiments and as the background strain for transformation. The recipient strain for *D. melanogaster* transformation was *w*¹¹¹⁸; SamI236 (ref. 30).

Molecular analysis. Transcripts were analyzed by reverse-transcriptase PCR (RT-PCR), using SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, and the following oligonucleotides: HSP: 5'-CAAGCAAAGTGAACACGTCGCTAAGCGAAAGCTA-3' TETRR1: 5'-GCGGAACGACTTGGCGTTATTGCG-3' TETRR2: 5'-CCAGTGTCTCGTATTGCTTTTCGGTC-3' HSPAC: 5'-GCTAAACAATCTGCAGGTACCCTGGCG-3' VP16: 5'-GCCCTCGATGGTAGACCCGTAATTG-3'

All major RT-PCR products were sequenced, using the above oligonucleotides and BigDye v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Reaction products were run on Applied Biosystems automated sequencers in the central sequencing facility, Department of Zoology, Oxford University. Electropherogram and sequence data were analyzed using Vector NTi (Invitrogen).

Requests for materials. luke.alphey@zoo.ox.ac.uk.

Note: Supplementary information is available on the Nature Biotechnology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pedro Rendón (USDA-APHIS-PPQ-CPHST) for the Toliman wild-type strain, and Trudi Mackay for the SamI236 strains; Sinead O'Connell and Veronica Rodrigues for help with *D. melanogaster*; Karen Clifton and Lynn Richardson for technical assistance and Sinead O'Connell and Deric Nimmo for critical review of the manuscript. This work was funded in part by the UK Biotechnology and Biological Sciences Research Council.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.F. and K.C.C. contributed equally to this work. G.F. and L.J. made the DNA constructs and assisted with the molecular analysis of transgenics. K.C.C. and G.C.C. created the transgenic medfly lines described and conducted most of the phenotypic and molecular analysis. M.J.E. and P.G. performed preliminary experiments in medflies. N.I.M. performed the *D. melanogaster* experiments. T.H.D. provided advice. L.A. conceived and supervised the project and wrote the paper. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare competing financial interests (see the *Nature Biotechnology* website for details).

Published online at <http://www.nature.com/naturebiotechnology/>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>

- Keng-Hong, T. (ed.) *Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests* (Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, 2000).
- Knipling, E. Possibilities of insect control or eradication through use of sexually sterile males. *J. Econ. Entomol.* **48**, 459–462 (1955).
- Koyama, J., Kakinohana, H. & Miyatake, T. Eradication of the melon fly *Bactrocera cucurbitae* in Japan: importance of behaviour, ecology, genetics and evolution. *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 331–349 (2004).
- Lindquist, D.A., Abusowa, M. & Hall, M.J. The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med. Vet. Entomol.* **6**, 2–8 (1992).
- Dyck, V., Hendrichs, J. & Robinson, A. (eds.) *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (Springer, Dordrecht, 2005).
- Alphey, L. Re-engineering the Sterile Insect Technique. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1243–1247 (2002).
- Thomas, D.D., Donnelly, C.A., Wood, R.J. & Alphey, L.S. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* **287**, 2474–2476 (2000).
- Heinrich, J.C. & Scott, M. A repressible female-specific lethal genetic system for making transgenic insect strains suitable for a sterile-release program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8229–8232 (2000).
- Marec, F. et al. Development of genetic sexing strains in Lepidoptera: from traditional to transgenic approaches. *J. Econ. Entomol.* **98**, 248–259 (2005).
- Rendón, P., McInnis, D., Lance, D. & Stewart, J. Medfly (Diptera:Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *J. Econ. Entomol.* **97**, 1547–1553 (2004).
- Franz, G. Genetic sexing strains in mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. In *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management* (eds. Dyck, V.A., Hendrichs, J. & Robinson, A.S.) 427–451, (Springer, The Netherlands; 2005).
- Wimmer, E.A. Eco-friendly insect management. *Nat. Biotechnol.* **23**, 432–433 (2005).
- Gould, F. & Schliekelman, P. Population genetics of autocidal control and strain replacement. *Annu. Rev. Entomol.* **49**, 193–217 (2004).
- Schliekelman, P. & Gould, F. Pest control by the release of insects carrying a female-killing allele on multiple loci. *J. Econ. Entomol.* **93**, 1566–1579 (2000).
- Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547–5551 (1992).
- Tortiglione, C. & Bownes, M. Conservation and divergence in the control of yolk protein genes in dipteran insects. *Dev. Genes Evol.* **207**, 264–281 (1997).
- Black, D.L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 291–336 (2003).
- Park, J.W., Parisky, K., Celotto, A., Reenan, R. & Graveley, B. Identification of alternative splicing regulators by RNA interference in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15974–15979 (2004).
- Pane, A., Salvemini, M., Delli Bovi, P., Polito, C. & Saccone, G. The *transformer* gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. *Development* **129**, 3715–3725 (2002).
- Saccone, G., Pane, A. & Polito, C. Sex determination in flies, fruitflies and butterflies. *Genetica* **116**, 15–23 (2002).

21. Gong, P. *et al.* A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nat. Biotechnol.* **23**, 453–456 (2005).
22. Horn, C. & Wimmer, E. A transgene-based, embryo-specific lethality system for insect pest management. *Nat. Biotechnol.* **21**, 64–70 (2003).
23. Cartegni, L., Chew, S. & Krainer, A. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 285–298 (2002).
24. Saccone, G. *et al.* in *Area Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Species*. (ed. Tan, K.) 491–496, (Penerbit Universiti Sains Malaysia, Penang, Malaysia; 2000).
25. Stoss, O., Stoilov, P., Hartmann, A.M., Nayler, O. & Stamm, S. The *in vivo* minigene approach to analyze tissue-specific splicing. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **4**, 383–394 (1999).
26. Stoss, O. *et al.* The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites. *J. Biol. Chem.* **276**, 8665–8673 (2001).
27. Chiu, Y. & Pin Ouyang, A. Loss of Pnn expression attenuates expression levels of SR family splicing factors and modulates alternative pre-mRNA splicing *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 663–671 (2006).
28. Gaunt, M.W. & Miles, M. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 748–761 (2002).
29. Pane, A., De Simone, A., Saccone, G. & Polito, C. Evolutionary conservation of *Ceratitis capitata* transformer gene function. *Genetics* **171**, 615–624 (2005).
30. Lyman, R.F., Lawrence, F., Nuzhdin, S.V. & Mackay, T.F. Effects of single *P*-element insertions on bristle number and viability in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **143**, 277–292 (1996).



Arends, William Gerrit
Marks & Clerk LLP
90 Long Acre
London WC2E 9RA
ROYAUME-UNI

Formalities Officer
Name: Reis Passinhas, Dora
Tel: +49 89 2399 - 8792
or call
+31 (0)70 340 45 00

Application No. 15 750 085.1 - 1120	Ref. PN814129EP	Date 14.09.2018
Applicant Oxitec Limited		

Communication under Rule 71(3) EPC

1. Intention to grant

You are informed that the examining division intends to grant a European patent on the basis of the above application, with the text and drawings and the related bibliographic data as indicated below.

A copy of the relevant documents is enclosed.

1.1 In the text for the Contracting States:

AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT
RO RS SE SI SK SM TR

Description, Pages

1-83 filed in electronic form on 23-07-2018

Sequence listings, SEQ ID NO

1-32 as published

Claims, Numbers

1-22 filed in electronic form on 23-07-2018

Drawings, Sheets

1/10-10/10 as published

With the following amendments to the above-mentioned documents proposed by the division

Claims, Numbers 11

Comments**CLAIMS**

Page 3, Claim 11: Error(s) in spelling, grammar, typography corrected

1.2 Bibliographic data

The title of the invention in the three official languages of the European Patent Office, the international patent classification, the designated contracting states, the registered name(s) of the applicant(s) and the other bibliographic data are shown on **EPO Form 2056** (enclosed).

2. Invitation

You are invited, **within a non-extendable period of four months** of notification of this communication,

2.1 to EITHER approve the text communicated above and verify the bibliographic data (Rule 71(5) EPC)

(1) by filing a translation of the claim(s) in the other two official languages of the EPO

	Fee code	EUR
--	-----------------	------------

(2a) by paying the fee for grant including the fee for publication: minus any amount already paid (Rule 71a(5) EPC):	007	925.00 0.00
---	------------	----------------

Total amount:	925.00
---------------	--------

(3) by paying additional claims fees under Rule 71(4) EPC; number of claims fees payable: 0 minus any amount already paid (Rule 71a(5) EPC):	016	0.00 0.00
--	------------	--------------

Total amount:	0.00
---------------	------

Important: If the translations of the claims and fees have already been filed and paid respectively in reply to a previous communication under Rule 71(3) EPC, e.g. in the case of resumption of examination after approval (see Guidelines C-V, 6), **agreement as to the text to be granted** (Rule 71a(1) EPC) must be expressed within the same time limit (e.g. by approving the text and verifying the bibliographic data, by confirming that grant proceedings can go ahead with the documents on file and/or by stating which translations of the claims already on file are to be used).

Note 1: See "Notes concerning fee payments" below.

Note 2: Any overpaid "minus" amounts will be refunded when the decision to grant (EPO Form 2006A) has been issued.

Note 3: For the calculation of the grant fee under Article 2(2), No. 7, RFees (old fee structure), the number of pages is determined on the basis of a clean copy of the application documents, in which text deleted as a result of any amendments by the examining division is not shown. Such clean copy is made available via on-line file inspection only.

2.2 OR, in the case of disapproval, to request reasoned amendments or corrections to the text communicated above or keep to the latest text submitted by you (Rule 71(6) EPC).

In this case the translations of the claims and fee payments mentioned under point 2.1 above are NOT due.

The terms "amendment(s)" and "correction(s)" refer only to amendments or corrections of the application documents and not of other documents (e.g. bibliographic data, the designation of the inventor, etc.).

If filing amendments, you must identify them and indicate the basis for them in the application as filed. Failure to meet either requirement may lead to a communication from the examining division requesting that you correct this deficiency (Rule 137(4) EPC).

2.3 Bibliographic data

Where you request a change or correction of bibliographic data in response to the Rule 71(3) communication, this will **not** cause the sending of a further communication under Rule 71(3) EPC. You will still have to pay the fees and file translations in reply to the Rule 71(3) communication in the case of 2.1 above, unless you also file a reasoned request for amendments or corrections in response to the Rule 71(3) communication (see case 2.2 above).

3. Loss of rights

If neither of the two possible actions above (see points 2.1 or 2.2) is performed in due time, the European patent application will be deemed to be withdrawn (Rule 71(7) EPC).

4. Further procedure

4.1 In the case of point 2.1 above

- 4.1.1 The decision to grant the European patent will be issued, and the **mention of the grant** of the patent will be published in the European Patent Bulletin, if the requirements concerning the translation of the claims and the payment of all fees are fulfilled and there is agreement as to the text to be granted (Rule 71a(1) EPC).

Note on payment of the renewal fee:

If a renewal fee becomes due before the next possible date for publication of the mention of the grant of the European patent, publication will be effected only after the renewal fee and any additional fee have been paid (Rule 71a(4) EPC).

Under Article 86(2) EPC, the obligation to pay renewal fees to the European Patent Office terminates with the payment of the renewal fee due in respect of the year in which the mention of the grant of the European patent is published.

Note on payment of the designation fee(s):

If the designation fee(s) become(s) due after the communication under Rule 71(3) EPC, the mention of the grant of the European patent will not be published until these fees have been paid (Rule 71a(3) EPC).

- 4.1.2 After publication, the **European patent specification** can be downloaded free of charge from the EPO publication server <https://data.epo.org/publication-server>.

4.1.3 Filing of translations in the contracting states

As regards translation requirements prescribed by the contracting states under Article 65(1) EPC, please consult the website of the European Patent Office

www.epo.org → Law & practice → Legal texts, National law relating to the EPC

www.epo.org → Law & practice → All Legal texts → London Agreement

In the case of a valid extension or validation

As regards translation requirements prescribed by the extension or validation states, please consult the website of the European Patent Office

www.epo.org → Law & practice → Legal texts, National law relating to the EPC

Failure to supply a prescribed translation in a contracting state, or in an extension or validation state may result in the patent being deemed to be void *ab initio* in the state concerned (Art. 65(3) EPC).

4.2 In the case of 2.2 above

If the present communication under Rule 71(3) EPC is based on an auxiliary request and, within the time limit, you maintain the main request or a higher ranking request which is not allowable, the application will be refused (Art. 97(2) EPC).

If the examining division gives its consent to the requested amendments or corrections, it will issue a new communication under Rule 71(3) EPC; otherwise, it shall resume the examination proceedings (Rule 71(6) EPC).

5. Filing of a divisional application

Any divisional application relating to this European patent application must be filed directly with the European Patent Office in Munich, The Hague or Berlin and will be in the language of the proceedings for the present application, or if the latter was not in an official language of the EPO, the divisional application may be filed in the language of the present application as filed (see Article 76(1) and Rule 36(2) EPC). Any such divisional application must be filed while the present application is still pending (Rule 36(1) EPC; Guidelines A-IV, 1.1.1).

6. Notes concerning fee payments

6.1 Making payments

For payments made via deposit account, please note that as from 1 December 2017 debit orders will only be carried out if filed in an electronically processable format (xml), using an accepted means of filing as laid down in the Arrangements for deposit accounts (ADA), published in the Supplementary publication in the Official Journal.

All relevant information related to the modes of payment of fees to the EPO can be retrieved from the EPO website at "**Making Payments**".

6.2 Information concerning fee amounts

Procedural fees are usually adjusted every two years, on even years, with effect from 1 April. Therefore, before making a payment, parties should verify the amounts actually due on the date of payment using the applicable version of the Schedule of fees and expenses, published as a Supplement to the Official Journal of the EPO, available on the EPO website (www.epo.org) at www.epo.org/schedule-of-fees. The "Schedule of fees" table allows the viewing, downloading and searching of individual fee amounts, both current and previous.

6.3 Note to users of the automatic debiting procedure

The fee for grant, including the fee for publication, and any additional claims fees due under Rule 71(4) EPC will be debited automatically on the date of filing of the translations of the claims, or on the last day of the period of this communication. However, if the designation fee(s) become(s) due as set out in Rule 71a(3) EPC and/or a renewal fee becomes due as set out in Rule 71a(4) EPC, these should be paid separately by another permitted way of payment in order not to delay the publication of the mention of the grant. The same applies in these circumstances to the payment of extension and validation fees. The same applies in these circumstances to the payment of extension and validation fees.

Note: If a waiver is expressed in response to a Rule 71(3) communication (see OJ EPO 2015, A52), the fee for grant, including the fee for publication/printing, and any additional claims fees will not be debited automatically. These fees must be paid separately by another means of payment allowed under the Rules relating to Fees.

Examining Division:

Chairman:	Roscoe, Richard
2nd Examiner:	Kania, Thomas
1st Examiner:	van Heusden, Miranda



Reis Passinhas, Dora
For the Examining Division
Tel. No.: +49 89 2399 - 8792

Enclosures: Text intended for grant

 EPO Form 2056

Annex to EPO Form 2004, Communication pursuant to Rule 71(3) EPC

Bibliographical data of European patent application No. 15 750 085.1

For the intended grant of the European patent, the bibliographical data are set out below, for information:

Title of invention:

- GENEXPRESSIONSSYSTEM
- GENE EXPRESSION SYSTEM
- SYSTÈME D'EXPRESSION GÉNIQUE

Classification:

INV. C12N15/85 A01K67/033 C12Q1/6888

Date of filing:

04.06.2015

Priority claimed:

GB / 05.06.2014 / GBA201410023

Contracting States*

for which fees have
been paid:

AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU
LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR

Extension States*

for which fees have
been paid:

Validation States*

for which fees have
been paid:

Applicant(s):**

Oxitec Limited
71 Innovation Drive
Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RX
GB

Inventor(s):

KOUKIDOU, Martha
Oxitec Limited
71 Innovation Drive
Milton Park
Abingdon
Oxfordshire OX14 4RX
GB

ALPHEY, Luke
Oxitec Limited
71 Innovation Drive
Milton Park
Abingdon
Oxfordshire OX14 4RX
GB

WARNER, Simon
Oxitec Limited
71 Innovation Drive
Milton Park
Abingdon
Oxfordshire OX14 4RX
GB

- | |
|---|
| <p>*) If the time limit for the payment of designation fees according to Rule 39(1) EPC has not yet expired and the applicant has not withdrawn any designation, all Contracting States/Extension States/Validation States are currently still deemed to be designated. See also Rule 71a(3) EPC and, if applicable, the above Note to users of the automatic debiting procedure.</p> <p>**) If two or more applicants have designated different Contracting States, this is indicated here.</p> |
|---|

CLAIMS

1. A polynucleotide comprising a first and a second gene expression system, wherein:

i) the first gene expression system comprises the following components: a first dominant lethal gene operably linked to a first promoter, a gene encoding a first activating transcription factor, and a first splice control sequence, and

ii) the second gene expression system comprises the following components: a second dominant lethal gene operably linked to a second promoter, a gene encoding a second activating transcription factor, and a second splice control sequence,

wherein:

each of said activating transcription factors is capable of activating at least one of said promoters, provided that both of said promoters are activated when both of said transcription factors are expressed,

each of the first and second splice control sequences mediates female-specific expression of the first and second dominant lethal genes, respectively, by alternative splicing,

the transactivation activity of each of the first and second activating transcription factors is repressible by a first and a second exogenous control factor, respectively, wherein said first exogenous control factor is the same as or different from said second exogenous control factor, and

each of said components of said first gene expression system are the same as or different from said components of said second gene expression system.

2. The polynucleotide according to claim 1, wherein the first activating transcription factor is the gene product of the first dominant lethal gene and/or the second activating transcription factor is the gene product of the second dominant lethal gene, such that said transcription factor also provides the lethal effect conferred by said dominant lethal gene.

3. The polynucleotide according to claim 1 or 2, wherein one or both of the first and second splice control sequences mediates female-specific expression of the respective dominant lethal gene by, together with a spliceosome, mediating splicing of a RNA transcript of the respective dominant

lethal gene to produce a mRNA coding for a functional protein and at least one mRNA coding for a non-functional protein, wherein the mRNA coding for a functional protein is produced in a female.

4. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein each of the first and second promoters is substantially inactive in the absence of the activating transcription factor capable of activating said promoter.

5. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein one or both of the first and second lethal genes is, independently, *tTA* or a *tTAV* gene variant, preferably *tTAV* (SEQ ID NO: 26), *tTAV2* (SEQ ID NO: 27), or *tTAV3* (SEQ ID NO: 28)

6. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein one or both of the first and second splice control sequences is, independently, derived from a *tra* intron, *dsx* gene, or *Actin-4* gene, preferably a *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha*, or *Rhagoletis tra* intron, more preferably a *Ceratitis capitata tra* intron.

7. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein one or both of the first and second gene expression systems further comprises an enhancer, preferably one or more repeats of *tetO*, associated with the respective promoter, and at least one of the activating transcription factors acts at the respective enhancer.

8. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein one or both of the first and second promoters is expressed during at least embryonic development, and is preferably a minimal promoter, more preferably wherein both are *Hsp70* or both are *syra*, or wherein one is *Hsp70* and the other is *syra*.

9. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein one of the first and second gene expression systems comprises:

(a) a third dominant lethal gene, preferably *VP16*;

(b) a third promoter, preferably *Hsp70* or *syra*, wherein the third promoter is operably linked to the third dominant lethal gene, wherein the activating transcription factor capable of activating the promoter of said gene expression system is also capable of activating the third promoter; and

(c) optionally, an enhancer associated with the promoter of said gene expression system, wherein the third promoter is also associated with said enhancer, preferably wherein the promoter of said gene expression system is associated with one end of said enhancer and the third promoter is associated with the other end of said enhancer.

10. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein the polynucleotide further comprises a genetic marker, preferably wherein the genetic marker is a fluorescent marker, more preferably wherein the genetic marker is *DsRed2*.

11. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein:
the first dominant lethal gene is *tTAV* (SEQ ID NO: 26), the first activating transcription factor is the tTAV gene product, the first promoter is *Hsp70*, the first splice control sequence is *Cctra*,
the second dominant lethal gene is *tTAV3* (SEQ ID NO: 28), the second activating transcription factor is the tTAV3 gene product, the second promoter is *sryα* and the second splice control sequence is *Bztra*,

the first gene expression system further comprises a first enhancer associated with the first promoter, wherein the first enhancer is *tetOx7*,

the second gene expression system further comprises a second enhancer associated with the second promoter, wherein the second enhancer is *tetOx14*,

the polynucleotide further comprises a third dominant lethal gene operably linked to a third promoter, the third promoter being associated with the second enhancer,

the second enhancer, wherein the third dominant lethal gene is *VP16* and the third promoter is *Hsp70*, wherein the second promoter is associated with one end of the second enhancer and the third promoter is associated with the other end of the second enhancer,

the polynucleotide further comprises a first genetic marker, which is *DsRed2*.

12. The polynucleotide according to any one of the preceding claims, wherein the polynucleotide comprises the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 1.

13. A genetic construct for transforming an insect, comprising the polynucleotide as described in any one of the preceding claims.

14. The genetic construct according to claim 13, wherein the construct further comprises at least four transposon inverted repeats, preferably four transposon inverted repeats, forming at least two pairs of opposing transposon inverted repeats, wherein said polynucleotide is located between two pairs of opposing transposon inverted repeats such that excision by a transposase or transposases of said pairs, *in situ*, is effective to be able to leave said polynucleotide integrated in the host genome, without flanking transposon inverted repeats in the host genome.

15. The genetic construct according to claim 14, wherein each of the transposon inverted repeats bounding said polynucleotide is a minimal terminal inverted repeat, preferably wherein the transposon inverted repeats are from Class II transposable elements, more preferably *piggyBac*.

16. The genetic construct according to claim 14, wherein four of the at least four transposon inverted repeats form a first and a second pair of opposing inverted repeats, wherein:

the four transposon inverted repeats are *piggyBac* inverted repeats,

the first pair consists of an internal 3' *piggyBac* end proximal the polynucleotide and an external 5' *piggyBac* end distal the polynucleotide, and

the second pair consists of an internal 5' *piggyBac* end proximal the polynucleotide and an external 3' *piggyBac* end distal the polynucleotide, preferably wherein:

the internal 3' *piggyBac* end has a nucleic acid sequence consisting of SEQ ID NO: 32;

the external 5' *piggyBac* end has a nucleic acid sequence consisting of SEQ ID NO:30;

the internal 5' *piggyBac* end has a nucleic acid sequence consisting of SEQ ID NO: 30; and

the external 3' *piggyBac* end has a nucleic acid sequence consisting of SEQ ID NO: 31.

17. The genetic construct according to any one of claims 13 to 16, further comprising at least one genetic marker between the transposon inverted repeats of at least one pair of opposing transposon inverted repeats, preferably comprising at least one genetic marker between the inverted repeats of each of the at least two pairs of opposing repeats.

18. An insect, preferably a *Tephritidae*, *Drosophilidae*, *Lonchaeidae*, *Pallopteridae*, *Platystomatidae*, *Pyrgotidae*, *Richardiidae*, or *Ulidiidae*, preferably a *Tephritidae*, more preferably

Ceratitis capitata comprising the polynucleotide as described in any one of claims 1 to 12 or the genetic construct as described in any one of claims 13 to 17.

19. The insect according to claim 18, wherein the insect comprises the polynucleotide represented by SEQ ID NO: 2 or 3, preferably SEQ ID NO: 2.

20. A method for detecting an insect as described in claim 18 or 19, comprising the steps of:

i) contacting a sample of DNA isolated from an insect with a primer pair specific for the transformed insect, wherein the first primer in the pair is specific for the polynucleotide sequence of the insect genetic construct and the second primer in the pair is specific for a genomic nucleotide sequence flanking the polynucleotide sequence, optionally contacting the sample of DNA with a probe, preferably having the nucleic acid sequence of SEQ ID NO:12, wherein said probe is specific to the PCR amplification product produced in step ii), for detection of the PCR amplification product, preferably wherein the probe is a dual labelled probe comprising a reporter molecule and a quencher molecule, and wherein the reporter molecule is released from the probe by Taq polymerase during PCR amplification, when said probe is annealed to said PCR amplification product;

ii) amplifying the sample of DNA, and

iii) detecting the amplified DNA.

21. The method according to claim 20 as dependent on claim 19, wherein the first primer has the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 4, 6, or 10, and the second primer has the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 5, 7, or 11, respectively.

22. A method of controlling an insect population comprising release of the insect as described in claim 18 or 19, preferably wherein the insect is *Ceratitis capitata*.