

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 867**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2014.01)

C12N 15/87 (2006.01)

C12N 15/873 (2010.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2014 PCT/US2014/065698**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15073819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2014 E 14862081 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 3068216**

54 Título: **Método de producción de peces infértiles y animales acuáticos productores de huevos y de suministro de compuestos a huevos y embriones**

30 Prioridad:

15.11.2013 US 201361904652 P

21.03.2014 US 201461968458 P

16.09.2014 US 201462050815 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF MARYLAND AT BALTIMORE
COUNTY (100.0%)**

**1000 Hilltop Circle
Baltimore, MD 21250, US**

72 Inventor/es:

**ZOHAR, YONATHAN y
WONG, TEN-TSAO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 981 867 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de producción de peces infértiles y animales acuáticos productores de huevos y de suministro de compuestos a huevos y embriones

Campo técnico

La presente descripción se refiere a métodos para la producción de peces reproductivamente estériles para la acuicultura, el comercio en acuarios y el control de especies invasoras. Los métodos incluyen la interrupción del desarrollo gonadal a través de la administración de compuestos que conducen al fracaso del desarrollo gonadal fértil, como se describe en las reivindicaciones. Tales compuestos pueden administrarse a los huevos de los peces antes o después de la fertilización (o activación con agua) al poner en contacto los huevos no fertilizados o fertilizados con tales compuestos.

Antecedentes de la técnica

La acuicultura es cada vez más importante para resolver las deficiencias mundiales actuales y previstas en la disponibilidad de alimentos de origen acuático y mariscos. A medida que continúa el cambio en la dependencia de las cosechas de las pesquerías a las especies acuáticas reproducidas artificialmente, la optimización de los métodos de acuicultura es cada vez más necesaria para maximizar la producción de alimentos y minimizar el impacto ecológico, logrando así la sostenibilidad ambiental a largo plazo de los suministros de mariscos.

La esterilización (infertilidad inducida) de peces de piscifactoría y otros animales acuáticos productores de huevos mejora su tasa de crecimiento al aumentar la conversión de energía de los alimentos en crecimiento muscular, en lugar del desarrollo gonadal. Además, si se escapa de las operaciones de acuicultura al medio ambiente, los peces de piscifactoría reproductivamente estériles y otros animales acuáticos productores de huevos, incluidas las especies domesticadas, no nativas o modificadas genéticamente, no podrán reproducirse o cruzarse con la población silvestre. Esto ayudará a la contención biológica y evitará la contaminación genética de las poblaciones silvestres y/o el establecimiento en la naturaleza de peces domésticos, no nativos o genéticamente modificados y otros animales acuáticos productores de huevos.

Además, la esterilización reproductiva de peces y otros animales acuáticos productores de huevos impide la cría y venta no autorizadas de peces y otros animales acuáticos productores de huevos genéticamente seleccionados o modificados, patentados o protegidos de otro modo. A. Skugor et al. (Knockdown of the germ cell factor *Dead end* induces multiple transcriptional changes in Atlantic cod (*Gadus morhua*) hatchlings, 31 December 2013, ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE, 144: 129-137) describen la inyección de embriones de pez con un oligonucleótido antisentido dirigido al gen *dead end* (callejón sin salida).

La descripción se refiere a métodos para producir poblaciones de peces estériles como se reivindica en las reivindicaciones, en donde los métodos de esterilización incluyen la interrupción de la migración y/o el desarrollo de células germinales primordiales en cada individuo tratado sin afectar negativamente otras características de un animal normal.

La descripción se refiere a un método para producir peces reproductivamente estériles, dicho método comprende la inmersión de huevos de pez no fertilizados o huevos de pez fertilizados antes de la activación con agua o huevos de pez fertilizados en un medio de inmersión acuoso con oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen del *dead end* (callejón sin salida) en dicho pez, y en donde dicho oligómero de morfolino antisentido se conjuga con 2-[(4-nitrofenil) oxycarbonilhexametilen-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina.

Otros aspectos, características y ventajas de la invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es un diagrama de flujo de un método de inmersión de acuerdo con realizaciones de la descripción.

La FIG. 2 es un diagrama de flujo de la producción de peces reproductivamente estériles.

La FIG. 3 es una microfotografía que muestra los resultados de la inmersión de embriones de pez cebra en un baño de inmersión del transportador molecular Vivo conjugado con *dnd-MO*. En la FIG. 3A, se encontraron agregados no caracterizados en embriones de peces después de 3 horas de inmersión con 20 μ M de *zfdnd-MO-Vivo*. En la FIG. 3B, aparecieron más agregados después de 5 horas de inmersión. En la FIG. 3C y la FIG. 3D, no se encontraron agregados en los embriones sumergidos con 20 μ M de *zfdnd-MO* durante (3C) 3 horas y (3D) 5 horas (sin Vivo).

La FIG. 4 es una microfotografía de fluorescencia que muestra los efectos de la administración a embriones de peces de un transportador molecular conjugado con un oligómero de morfolino antisentido

(MO) que bloquea eficazmente la traducción de la proteína Dead end (callejón sin salida) (Dnd). La FIG. 4A muestra que en los peces de control, las células germinales migraron a la región gonadal y mantuvieron su morfología. La FIG. 4B muestra que el tratamiento de *zfdnd-MO-Vivo* causó una migración errónea de las células germinales y finalmente se diferenció en otros tipos de células.

La FIG. 5 es una fotografía y representación gráfica que muestra embriones tratados con *dnd-MO-Vivo* de pez cebra desarrollados en adultos tipo machos infértiles. La FIG. 5A no muestra ninguna diferencia en la apariencia o el tamaño general observado entre los peces adultos tratados y los machos de tipo silvestre. La FIG. 5B no muestra diferencias significativas en el peso corporal de los peces de 3 meses de edad ($n = 12$ mediante muestreo aleatorio) entre los peces tratados con *zfdnd-MO-Vivo* y los machos de tipo silvestre no tratados.

La FIG. 6 es una microfotografía que muestra la esterilidad inducida por *zfdnd-MO-Vivo* en pez cebra. El examen del tejido gonadal muestra (FIG. 6A) testículos bien desarrollados de peces machos no tratados; (FIG. 6B) ovarios bien desarrollados de peces hembra no tratadas; (FIG. 6C) las gónadas de los peces tratados con *zfdnd-MO-Vivo* se desarrollaron en un tejido delgado similar a un filamento. Las microfotografías (6D-6F) muestran (FIG. 6D) espermatogénesis activa de los testículos de peces machos no tratados; (FIG. 6E) un ovario bien desarrollado de un pez hembra no tratada con ovocitos en diferentes etapas de desarrollo; (FIG. 6F) las gónadas de los peces tratados parecen estar subdesarrolladas y rodeadas de una gran cantidad de adipocitos sin estructura gonadal avanzada o células germinales.

La FIG. 7 es una representación gráfica de embriones tratados con *dnd-MO-Vivo* de pez cebra desarrollados en adultos infértiles. Tanto en la FIG. 7A, a las 24 horas y la FIG. 7B, en inmersiones de 5 a 6 horas, todos los embriones que se sumergieron inicialmente con 60 o 40 μM de *zfdnd-MO-Vivo* se convirtieron en peces infértiles.

La FIG. 8 es una representación gráfica de embriones tratados con *dnd-MO-Vivo* de pez cebra desarrollados en adultos infértiles. En varias condiciones optimizadas, cuando la inmersión se inició inmediatamente después de la fertilización y duró tanto 24 horas (o etapa prim-5) como 5 a 6 horas (o etapa 50% epibólica), todos los embriones que se sumergieron inicialmente con 60 o 40 μM de *zfdnd-MO-Vivo* se convirtieron en peces infértiles.

La FIG. 9 es una microfotografía que muestra que los huevos son más permeables antes de la activación con agua. En una inmersión de 5 horas con 40 μM de *zfdnd-MO-Flu*, que se muestra en la FIG. 9A, los huevos no fertilizados captan más *zfdnd-MO-Flu* (fluorescencia verde más fuerte) que como se muestra en la FIG. 9B, huevos preactivados con agua.

La FIG. 10 ilustra la porción del pez utilizada para la extracción de ARN y los resultados obtenidos. Los huevos de salmónidos (trucha) se sumergieron con *dnd-MO* de salmónido en A: Control; B: 10 μM *Ssdnd-MO*; C: 10 μM *Ssdnd-MO* + 1 μM *Ssdnd-MO-Vivo*; D: 10 μM *Ssdnd-MO* + 2 μM *Ssdnd-MO-Vivo* durante 48 horas antes de la fertilización. Cuando los huevos se trataron con 10 μM *Ssdnd-MO* + 1 μM *Ssdnd-MO-Vivo* o 10 μM *Ssdnd-MO* + 2 μM *Ssdnd-MO-Vivo*, las células germinales se eliminaron indicadas por la falta de expresión del gen creador específico de células germinales *vasa*.

Descripción detallada de la divulgación

La administración de compuestos beneficiosos en peces u otros animales acuáticos productores de huevos se ha logrado tradicionalmente a través de la alimentación, inyección o inmersión de embriones o individuos en un compuesto de interés. Sin embargo, inyectar a la población no es práctico en operaciones de acuicultura comercial a gran escala. Además, el uso del tratamiento de inmersión de huevos fertilizados y activados por agua ha sido limitado, debido a la baja permeabilidad del corion del huevo, una capa multicapa acelular gruesa, también conocida como envoltura del huevo, compuesta principalmente de proteínas y glucoproteínas. Por lo general, en el tratamiento de inmersión de peces u otros embriones de animales acuáticos productores de huevos, los compuestos moleculares grandes no pueden atravesar el corion y alcanzar el embrión.

Después de la ovulación/desove y antes de la fertilización y la activación con agua, los huevos tienen un corion permeable y perforado (o cubierta más externa) que permite la entrada de agua y sustancias en los huevos no fertilizados a través de los poros o el micropilo, un pequeño canal en el corion del huevo que permite que los espermatozoides penetren en la huevo para la fertilización. Después de la fertilización y la activación con agua, el corion se sella y el huevo se vuelve impermeable, evitando una mayor absorción de sustancias o agua del medio ambiente.

Como se ha descubierto, durante la ventana de tiempo entre la ovulación/desove y la fertilización/activación con agua, los huevos son permeables y la absorción de compuestos de los medios de inmersión en los huevos es eficiente. Después de un corto período de inmersión, los huevos son fertilizados y activados por el agua, momento en el que se vuelven impermeables y comienzan el desarrollo embrionario.

La presente descripción describe métodos para administrar de manera eficiente compuestos en huevos de peces y, por lo tanto, hacer que los peces producidos a partir de estos sean reproductivamente estériles, como se describe en las reivindicaciones.

Por consiguiente, en varios aspectos, la presente descripción se refiere a sumergir huevos no fertilizados o huevos

fertilizados antes de la activación con agua en un medio de inmersión acuoso como se describe en las reivindicaciones. El medio de inmersión en realizaciones específicas puede incluir compuestos adicionales u otros materiales que son beneficiosos para los peces nacidos de huevos sumergidos en el medio de inmersión, por ejemplo, materiales tales como ADN/ARN, hormonas, promotores del crecimiento, antígenos protectores, nutrientes, etc.

Por lo tanto, la descripción contempla métodos para producir peces reproductivamente estériles como se describe en las reivindicaciones, que implican sumergir huevos en un medio de inmersión acuoso con compuestos seleccionados que dan como resultado individuos reproductivamente estériles. Los métodos de esterilización comprenden la interrupción del desarrollo gonadal en el embrión. Los métodos descritos en las reivindicaciones pueden emplearse en métodos para prevenir el cruzamiento entre peces de piscifactoría domesticados, no nativos y modificados genéticamente y sus poblaciones silvestres, así como para el establecimiento de tales peces de acuicultura en la naturaleza. Además, los métodos descritos pueden emplearse para permitir la prevención de la contaminación genética de una población silvestre por peces cultivados.

Los métodos de la descripción son aplicables a los peces. Tal como se usa en la presente, los peces incluyen especies portadoras de huevos de todas las especies de peces.

Por consiguiente, el pez incluye todas las especies de peces, que incluyen, entre otros, salmón, salmón del Atlántico, salmón coho, salmón real, salmón chum, salmón rojo, salmón rosa, salmón masu, trucha, trucha arco iris, trucha de arroyo, trucha marrón, timalo común, timalo ártico, trucha alpina, róbalo, róbalo híbrido, róbalo rayado, róbalo blanco, híbridos de róbalo blanco rayado, róbalo amarillo, perca blanca, perca amarilla, perca europea, híbridos de róbalo-perca, tilapia del Nilo, tilapia azul, híbridos de tilapia azul-Nilo, tilapia de Mozambique, pez cebra, especies de carpa, bremsas, sargos, plumas, especies de pez gato y bacalao.

Tal como se define en la presente, se entiende que "esterilizar" peces significa hacer que un individuo no pueda reproducirse sexualmente. Los peces reproductivamente estériles se definen como individuos que no pueden alcanzar la madurez sexual o reproducirse al alcanzar la edad de madurez sexual.

Los métodos para producir un pez reproductivamente estéril incluyen la administración de un oligómero de Morfolino antisentido que suprime la expresión del gen del *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez a sus huevos antes de la fertilización o activación por agua para interrumpir el desarrollo celular de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y/o el desarrollo, migración y colonización de células germinales primordiales (PGC) en la gónada del embrión, lo que da como resultado la falla en el desarrollo de la gónada y/o la falla del funcionamiento gonadal completo y adecuado a nivel celular o celular, y en última instancia la generación de peces estériles.

La GnRH es necesaria para el desarrollo gonadal y el mantenimiento de los ciclos reproductivos en los vertebrados. Específicamente, la GnRH, también conocida como hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas, en particular la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que son esenciales para el desarrollo gonadal y, por lo tanto, la interrupción de la síntesis y secreción de GnRH es un método potente para inducir la esterilidad.

Las PGC (por sus siglas en inglés) son una población de células en el embrión de pez que son precursoras de los gametos de los peces adultos y otros animales acuáticos productores de huevos. Las PGC se producen durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. En etapas posteriores del desarrollo embrionario, las PGC migran a través del embrión desde su ubicación original hasta el área de los precursores gonadales. Al final de su migración, las PGC entran en las gónadas en desarrollo, colonizan el tejido e inician el proceso de gametogénesis, dando lugar a gónadas maduras en los peces adultos y otros animales acuáticos productores de huevos.

Los métodos de la descripción permiten la generación de peces reproductivamente estériles (infértiles). La estrategia de esterilización interrumpirá específicamente el desarrollo de las gónadas en los individuos sin afectar negativamente a ninguna otra característica, lo que dará como resultado la producción de peces completamente normales pero reproductivamente estériles.

La FIG. 1 es un diagrama del método de inmersión de las realizaciones de la descripción, para el compuesto que es un oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen del *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez y que se conjuga con VIVO. Como se muestra, los compuestos se administran a los huevos sumergiendo huevos no fertilizados (u huevos activados previamente con agua) u huevos fertilizados en los compuestos de interés en un medio de inmersión. Típicamente, los huevos se sumergen en el compuesto durante aproximadamente 2 a aproximadamente 96 horas o más dependiendo de la especie y la temperatura de inmersión. La administración del compuesto tendrá lugar preferentemente mientras el corion de los huevos es permeable. El tratamiento con los compuestos de interés dará como resultado embriones en etapa temprana que tienen una interrupción del desarrollo de GnRH o del desarrollo de PGC. Cuando los huevos son tratados por el proceso de inmersión, los peces adultos resultantes serán reproductivamente infértiles o estériles, típicamente sin desarrollo gonadal fértil.

Por lo tanto, en diversas realizaciones como se describe en las reivindicaciones, la descripción proporciona un método para administrar eficazmente compuestos en embriones al poner en contacto los huevos de peces con compuestos que son oligómeros de morfolino antisentido que suprimen la expresión del gen del *dead end* (*callejón sin salida*) en dichos peces antes de la fertilización o activación con agua. Los compuestos seleccionados alteran el desarrollo, la migración y/o la supervivencia de las células GnRH y/o PGC en un gran número de embriones, lo que resulta en la producción a gran escala de peces adultos reproductivamente estériles. Los métodos de la descripción también son aplicables a embriones individuales en la producción a menor escala de peces adultos reproductivamente estériles.

Los compuestos para su uso en los métodos de la descripción son oligómeros de morfolino antisentido que suprimen la expresión del gen del *dead end* (*callejón sin salida*) en peces, que son compuestos conocidos por alterar el desarrollo, la migración y/o la supervivencia de células de GnRH y/o PGC que se conjugan con 2-[(4-nitrofenil) oxicarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina y que son capaces de entrar en el corión de un huevo prefertilizado o activado con agua.

El oligómero de morfolino antisentido se utiliza para silenciar transitoriamente la expresión génica mediante el bloqueo de la traducción o el empalme de ARN, que es un paso esencial para generar ARNm. Se pueden identificar oligómeros de morfolino antisentido específicos para bloquear o suprimir transitoriamente la expresión de genes que son esenciales para el desarrollo de células germinales embrionarias que incluyen, pero no limitado a receptores *deadend*, *nanos*, *vasa*, *gnrh* o *fsh*, lo que resulta en la falla en el desarrollo gonadal y, en última instancia, genera peces estériles y otros animales acuáticos productores de huevos.

Por lo tanto, en un aspecto de la descripción, se proporciona un método para producir animales acuáticos productores de huevos reproductivamente estériles que, como se describe en las reivindicaciones, comprende poner en contacto, es decir, sumergir en un medio de inmersión acuoso, huevos no fertilizados o huevos fertilizados activados previamente con agua con oligómero de morfolino antisentido que es eficaz para transfectar el (los) huevo(s) y hacer que el (los) individuo(s) producido(s) a partir de ellos sean reproductivamente estériles. El contacto comprende la transfección coriónica del (los) huevo(s).

En tal aspecto, la descripción se refiere a métodos para producir peces reproductivamente estériles mediante la administración de oligómeros de Morfolino eficaces a huevos con el fin de interrumpir el desarrollo de células germinales primordiales (PGC), y la migración y colonización en la gónada del embrión, lo que da como resultado la falla en el desarrollo de la gónada y/o el funcionamiento gonadal completo y adecuado a nivel celular o celular, y en última instancia la generación de peces estériles, es decir, mediante la administración de un oligómero de Morfolino antisentido que suprime la expresión del gen del *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez.

Dead end (*callejón sin salida*) (*dnd*) es un componente específico de vertebrados del plasma germinal y los gránulos de células germinales que es esencial para el desarrollo de células germinales en ciertos peces. El gen *dnd* se expresa específicamente en plasma germinal y células germinales primordiales. Dado que el *DND* se considera esencial para la migración normal y la supervivencia de las PGC, los embriones desprovistos de esta proteína se convierten en adultos estériles.

Los métodos de la descripción son útiles para la producción de peces reproductivamente estériles para la acuicultura, el comercio en acuarios y el control de especies invasoras. En un aspecto, los métodos incluyen la interrupción del desarrollo gonadal a través de la administración de oligómero de morfolino antisentido contra ARNm de *dead end* (*callejón sin salida*) (*dnd*-MO) a huevo(s) prefertilizado(s) o activado(s) con agua. La acción de *dnd*-MO conduce al fracaso del desarrollo de gónadas fértiles y a la esterilización de peces adultos.

En realizaciones, el *dnd*-MO es capaz de suprimir transitoriamente la expresión de la proteína del *dead end* (*callejón sin salida*) que es esencial para el desarrollo de células germinales embrionarias.

La presente descripción también se refiere a secuencias de oligómero de morfolino específicas para su uso en métodos para la supresión de la expresión de un gen *dead end* (*callejón sin salida*) en un pez.

La FIG. 2 es un diagrama de flujo para la producción de peces reproductivamente estériles que no forma parte de la presente invención mediante la administración de oligómeros de morfolino específicos contra los ARNm *dead end* (*callejón sin salida*) de salmónidos, morónidos o cíclidos para interrumpir el desarrollo de células germinales primordiales (PGC), lo que da como resultado la falla en el desarrollo de gónadas y, en última instancia, la generación de peces estériles. Cuando los huevos no se tratan con oligómeros de morfolino, pueden convertirse en reproductores fértiles.

Como se muestra en la FIG. 2, los huevos de salmónidos, morónidos o cíclidos, u otras especies de peces, pueden ponerse en contacto con oligómeros de morfolino contra los genes *dead end* (*callejón sin salida*) de las especies de peces relevantes. La FIG. 2 ilustra la administración de oligómeros de morfolino específicos contra los genes *dead end* (*callejón sin salida*) de salmónidos, morónidos o cíclidos. Alternativamente, los huevos pueden no recibir tratamiento. Como se muestra, cuando los huevos no fertilizados se ponen en contacto con oligómeros de

morfolino, los oligómeros efectúan la supresión o el bloqueo de la traducción de la proteína del callejón sin salida, lo que resulta en la interrupción del desarrollo de PCG. En consecuencia, los salmónidos, monoides o cíclidos adultos son infértiles, ya que no hay desarrollo gonadal fértil. Cuando se permite el desarrollo normal de PGC, los peces tendrán un desarrollo gonadal fértil normal y los peces pueden usarse como reproductores.

Por lo tanto, en realizaciones, los oligómeros de morfolino antisentido para su uso en los métodos de la descripción son capaces de suprimir eficazmente la expresión de al menos uno de los genes *dead end* (*callejón sin salida*) de Salmonidae, gen *dead end* (*callejón sin salida*) de Moronidae o gen *dead end* (*callejón sin salida*) de Cichlidae.

En otro aspecto, la descripción se refiere a oligómeros de morfolino antisentido específicos para su uso en los métodos reivindicados que pueden suprimir de manera transitoria y eficaz la traducción de *Dead end*, una proteína esencial para la supervivencia de células germinales, y alterar específicamente el desarrollo gonadal que da como resultado la producción de peces infértiles, por ejemplo, salmones (salmones y truchas), morónidos (bajos) y cíclidos (tilapias y cíclidos ornamentales).

En otro aspecto, la descripción se refiere a un oligómero de morfolino específico, 5'-CTGACTTGAACGCTCCTCCATTATC-3' (SEQ ID NO: 1) y sus variantes, por ejemplo, 5'-ACTTGAACGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 2), para su uso en los métodos reivindicados que son capaces de suprimir de manera transitoria y efectiva la expresión del gen del *callejón sin salida* de Salmonidae, lo que da como resultado la falla en el desarrollo de las gónadas y/o la falla del funcionamiento gonadal completo y adecuado, y en última instancia la generación de salmónidos estériles. Por consiguiente, los métodos de la descripción son aplicables a todos los salmónidos, que incluyen, entre otros, salmones Atlántico, del Pacífico, real, chum, rojo, rosa y japonés, truchas arco iris, arroyo y marrón, timalo común y ártico y trucha ártica, entre otros.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un oligómero de morfolino específico, 5'-GGCTCTGCTTGCTCTCCATCATCTC-3' (SEQ ID NO: 3), y sus variantes para su uso en los métodos reivindicados que son capaces de suprimir de manera transitoria y efectiva la expresión del gen del *callejón sin salida* de Moronidae, lo que da como resultado la falla en el desarrollo de las gónadas y/o el fracaso del funcionamiento gonadal completo y adecuado, y en última instancia la generación de morónidos estériles. Por consiguiente, los métodos de la descripción son aplicables a todos los morónidos que incluyen, pero no limitado a róbalo rayado, róbalo blanco, híbridos de róbalo rayado-blanco, róbalo amarillo, perca blanca, perca amarilla, perca europea e híbridos de róbalo-perca, entre otros.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un oligómero de morfolino específico, 5'-CTGGCTTTGCGTGTTTCCATCGTC-3' (SEQ ID NO: 4), para su uso en los métodos reivindicados que son capaces de suprimir de manera transitoria y efectiva la expresión del gen del *callejón sin salida* de Cichlidae, lo que da como resultado la falla en el desarrollo de las gónadas y/o la falla del funcionamiento gonadal completo y adecuado, y en última instancia la generación de cíclidos estériles. Por consiguiente, los métodos de la descripción son aplicables a todas las especies de cíclidos y tilapia, que incluyen, pero no limitado a tilapia del Nilo, tilapia azul, híbridos de tilapia azul-Nilo, tilapia de Mozambique y otras especies de cíclidos comestibles y ornamentales y sus híbridos.

Los oligómeros de morfolino pueden ser variantes de las secuencias enumeradas. Estas variaciones pueden incluir, pero no limitado a otros ácidos nucleicos modificados y otros oligómeros de morfolino que cubren las secuencias completas o parciales enumeradas anteriormente. Se incluyen particularmente oligómeros antisentido que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, una o más de las SEQ ID NO: 1, 3 y 4. También se incluyen variantes de estos oligómeros antisentido, que incluyen oligómeros variantes que tienen 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% (que incluyen todos los números enteros intermedios) de identidad de secuencia u homología de secuencia con cualquiera de las SEQ. ID NO: 1, 3 y 4, y/o variantes que difieren de estas secuencias en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, preferentemente variantes que son eficaces en la esterilización reproductiva de peces tras el contacto con huevos de pez. La SEQ ID NO: 2 es una variante preferida de la SEQ ID NO: 1.

Las variantes que son eficaces en la esterilización reproductiva de peces tras el contacto con huevos de peces, tal como se usan en dicho contexto, significan que el uso de las variantes en los métodos descritos en la presente dará como resultado peces reproductivamente estériles. Las variantes suprimirán eficazmente la expresión de un gen de interés *dead end* (*callejón sin salida*).

De acuerdo con realizaciones de los métodos de la descripción, los huevos de pez no fertilizados (uno o más huevos) se sumergen en un medio de inmersión acuoso como se describe en las reivindicaciones que comprende un oligómero de morfolino antisentido capaz de suprimir eficazmente la expresión de un gen *dead end* (*callejón sin salida*) en el pez de interés. La concentración del oligómero de morfolino antisentido en el baño debe ser suficiente para permitir que el oligómero de morfolino antisentido atraviese el corion de los huevos de pez, transfecando eficazmente los huevos. En realizaciones, tal concentración será típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, más preferentemente, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 μM , y aún más preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 μM .

El medio de inmersión es un medio acuoso que puede comprender además líquido ovárico de pez o diluyente de fertilización que contiene sal, Tris (pH 7-9), glicina y/o 0 a 30% de suero e inhibidores de proteasa tales como aprotinina o leupeptina.

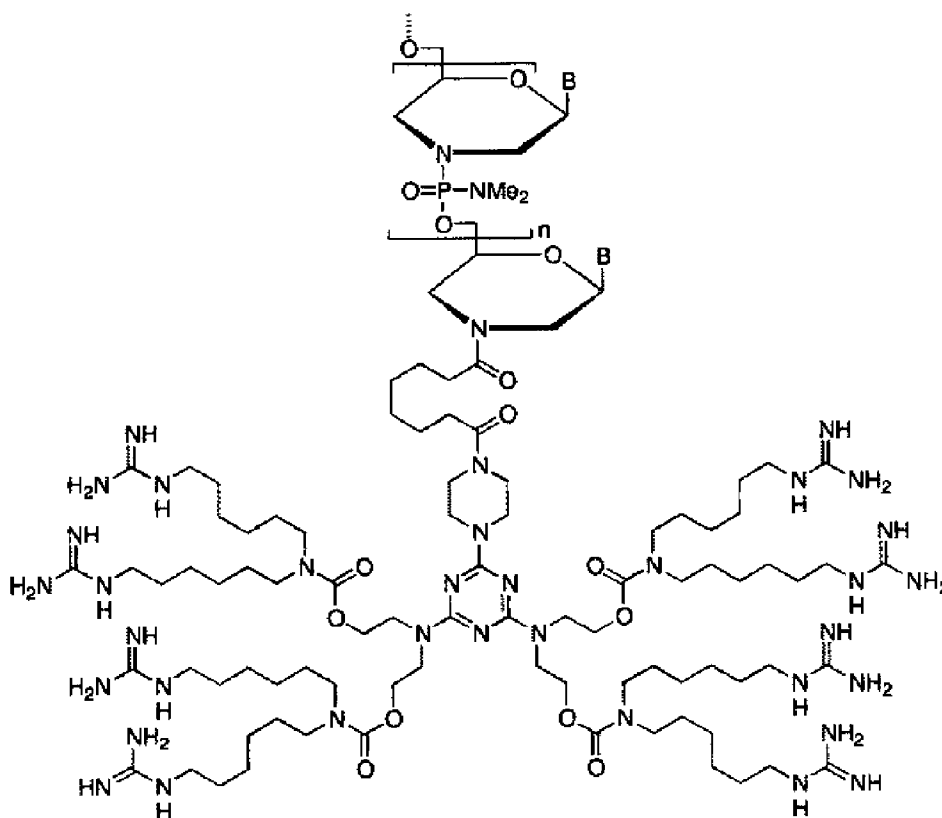
5 Aunque el tiempo requerido para la inmersión de los huevos no fertilizados o los huevos fertilizados activados previamente con agua para dar como resultado una esterilización satisfactoria del pez dependerá de la especie de pez, típicamente los huevos de pez se sumergirán en el medio de inmersión que contiene un oligómero de Morfolino durante aproximadamente 2 a aproximadamente 96 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 4 a aproximadamente 72 horas, y aún más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 48 horas.

10 Los métodos para la producción de peces reproductivamente estériles como se describe en las reivindicaciones pueden usarse para la acuicultura, el comercio de acuarios y el control de especies invasoras, en donde los métodos incluyen la interrupción del desarrollo gonadal a través de la administración de un oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez, y en donde dichos
15 oligómeros de morfolino antisentido se conjugan con 2-[(4-nitrofenil) oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina al huevo o embriones, por lo que los oligómeros de morfolino antisentido son capaces de transfectar el (los) huevo(s), es decir, alcanzar y entrar en huevos o embriones no fertilizados. La acción del oligómero morfolino antisentido dentro del huevo o embriones conduce al fracaso del desarrollo fértil de las gónadas y, en última instancia, a la producción de peces adultos
20 estériles. El transportador molecular 2-[(4-nitrofenil) oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil) -aminocarbonil-oxietil]amino}triazina es capaz de transportar eficazmente el oligómero morfolino antisentido conjugado a él a través de canales y poros minúsculos, lo que le permite pasar a través del corion y entrar en el huevo o embrión y llegar al tejido diana. Por lo tanto, a través de estos métodos, los huevos, ya sea no fertilizados o fertilizados, pueden ponerse en contacto eficazmente con oligómeros de morfolino
25 para producir peces reproductivamente estériles.

En un aspecto, la descripción se refiere a métodos para producir peces reproductivamente estériles mediante la administración de un oligómero de Morfolino antisentido que suprime la expresión del gen del *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez, y en donde dicho oligómero de Morfolino antisentido se conjuga con 2-[(4-nitrofenil) oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina a huevos o embriones de pez no fertilizados, como se describe en las reivindicaciones, con
30 el fin de interrumpir el desarrollo celular de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y/o el desarrollo y migración de células germinales primordiales (PGC) hacia, y la colonización en, la gónada del embrión, lo que da como resultado la falla en el desarrollo de la gónada y/o la falla del funcionamiento gonadal completo y adecuado a nivel celular o tisular, y finalmente la generación de peces estériles.

La 2-[(4-nitrofenil)oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina también se conoce en la técnica como "Vivo" y se describe en la patente de EE. UU. No. 7.935.816.

40 Una 2-[(4-nitrofenil) oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina ilustrativa con morfolino se muestra en el siguiente conjugado:



En otro aspecto, la descripción proporciona un método para producir peces reproductivamente estériles, dicho método comprende poner en contacto huevos no fertilizados o huevos fertilizados activados previamente con agua con un conjugado de un oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez, y en donde dicho oligómero de morfolino antisentido se conjuga con 2-[(4-nitrofenil)oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina que es eficaz para transfectar los huevos y hacer que los individuos producidos a partir de ellos sean reproductivamente estériles como se describe en las reivindicaciones.

En otro aspecto, la descripción contempla un método para producir peces reproductivamente estériles como se describe en las reivindicaciones, dicho método comprende poner en contacto huevos(o embriones) fertilizados con un conjugado de un oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez conjugado con un compuesto transportador molecular que es 2-[(4-nitrofenil)oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina que es eficaz para transfectar los huevos y hacer que los individuos producidos a partir de ellos sean reproductivamente estériles.

Los oligómeros seleccionados pueden alterar el desarrollo, la migración y/o la supervivencia de las células GnRH y/o PGC en un gran número de embriones, lo que resulta en la producción a gran escala de peces adultos reproductivamente estériles. Los métodos de la descripción también son aplicables a embriones individuales en la producción a menor escala de peces adultos reproductivamente estériles.

En otras realizaciones, el oligómero de morfolino antisentido para su uso en los métodos de la descripción son capaces de suprimir eficazmente la expresión de al menos uno de los genes *dead end* (*callejón sin salida*) de Salmonidae, gen *dead end* (*callejón sin salida*) de Moronidae o gen *dead end* (*callejón sin salida*) de cíclidos. En realizaciones adicionales, el oligómero de morfolino antisentido para su uso en los métodos de la descripción es la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o variantes de las mismas que son capaces de suprimir eficazmente la expresión de *dead end* (*callejón sin salida*) en especies de peces.

En una realización, se proporciona un método para producir peces reproductivamente estériles, que comprende sumergir huevos de pez no fertilizados o fertilizados en un medio de inmersión acuoso que comprende un conjugado de un compuesto transportador molecular que es 2-[(4-nitrofenil)oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina y un oligómero de morfolino antisentido capaz de suprimir eficazmente la expresión del gen *dead end* (*callejón sin salida*) en el pez.

De acuerdo con aspectos particulares de los métodos de la descripción, los huevos no fertilizados o los huevos

fertilizados activados previamente con agua (uno o más) se sumergen en un medio acuoso que comprende un oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez, y en donde dicho oligómero de morfolino antisentido se conjuga con 2-[(4-nitrofenil) oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina capaz de suprimir eficazmente la expresión de un gen *dead end* (*callejón sin salida*) en el pez. La concentración del oligómero de morfolino antisentido en el baño debe ser suficiente para permitir que el conjugado de oligómero de morfolino antisentido-transportador atraviese el corion del (los) huevo(s). En realizaciones, tal concentración será típicamente de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 μM , más preferentemente, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 μM , y aún más preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 μM .

Alternativamente, la descripción contempla un método para producir peces reproductivamente estériles, dicho método comprende poner en contacto, es decir, sumergir en un medio de inmersión acuoso, huevo(s) fertilizado(s) con oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen del *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez conjugado con un compuesto transportador molecular que es eficaz para transfectar el (los) huevo(s) fertilizado(s), que es 2-[(4-nitrofenil)oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina y hacer que el (los) individuo(s) producido(s) a partir de este sea reproductivamente estéril. El contacto comprende la transfección coriónica del (los) huevo(s).

La concentración del oligómero de morfolino antisentido en el baño debe ser suficiente para permitir que el conjugado de oligómero de morfolino antisentido-transportador atraviese el corion del (los) huevo(s) fertilizados. Tal concentración será mayor que la cantidad necesaria para la inmersión de los huevos de pez no fertilizados, ya que, después de la fertilización y la activación con agua, el corion del huevo se vuelve impermeable, lo que dificulta el recorrido hacia el huevo. Típicamente, la concentración del baño para la inmersión de embriones es de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 μM , preferentemente de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 μM .

En realizaciones del tratamiento de huevos fertilizados, el oligómero de morfolino antisentido es capaz de suprimir eficazmente la expresión de al menos uno del gen *dead end* (*callejón sin salida*) de Salmonidae, el gen *dead end* (*callejón sin salida*) de Moronidae o el gen *dead end* (*callejón sin salida*) de ciclidos. En realizaciones adicionales, el oligómero de morfolino antisentido es la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma que es capaz de suprimir eficazmente la expresión de *dead end* (*callejón sin salida*) en las especies de peces.

Se reconocerá que la puesta en contacto de huevos y/o embriones con un oligómero de morfolino antisentido que suprime la expresión del gen *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez, y en donde dicho oligómero de morfolino antisentido se conjuga con 2-[(4-nitrofenil) oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[di(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada, lo que implica la puesta en contacto por inmersión en un medio de inmersión acuoso, ya que se debe reconocer que la puesta en contacto por inmersión proporciona una técnica de contacto eficiente y eficaz que es susceptible de operaciones a gran escala para la producción de peces reproductivamente estériles.

Las ventajas y características de la descripción se ilustran adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse de ninguna manera como limitativos del alcance de las reivindicaciones, sino más bien como ilustrativos de realizaciones particulares de la descripción en aplicaciones específicas de las mismas.

Ejemplo 1:

Se seleccionó el pez cebra para la ejemplificación inicial de los métodos de la descripción, debido a su corto tiempo de generación y gran cantidad de embriones producidos por apareamiento, que se obtienen fácilmente de forma diaria o semanal. Además, los embriones de pez cebra son transparentes, lo que facilita las observaciones y son resistentes. El desarrollo normal de las células GnRH, las PGC y las gónadas dentro del embrión es un mecanismo evolutivamente conservado que se encuentra en todos los peces. Por consiguiente, los métodos de la descripción son aplicables a todas las especies de peces, que incluyen, pero no limitado a pez cebra, especies de carpa, especies de trucha, especies de salmón, brevas (que incluyen sargos y plumas), lubinas (que incluyen lubinas marinas y de agua dulce y lubinas híbridas, etc.), percas (perca amarilla, perca blanca, etc.), especies de bagre, bacalao y otras clases principales que son candidatas para el cultivo en cautiverio.

Vivo y *dnd*-MO

Un transportador molecular, una octaguanidina dendrimerica con un núcleo de triazina también conocido como Vivo, se conjugó con *dnd*-MO de pez cebra, 5'-GCTGGGCATCCATGTCTCCGACCAT-3' (SEQ ID NO 5) (*zfdnd*-MO-Vivo) y se utilizó en una inmersión que contenía embriones de pez cebra en agua. Después de una inmersión de 3 horas con 20 μM de *zfdnd*-MO-Vivo, se encontraron agregados no caracterizados aproximadamente la parte interna del corion o la superficie del blastodisco de los embriones (FIG. 3A). Aparecieron más agregados después de una inmersión de 5 horas (FIG. 3B). Estos agregados no se observaron en los grupos de control no conjugados que se sumergieron con 20 μM de *zfdnd*-MO para 3 (FIG. 3C) o 5 (FIG. 3D) horas. Los resultados indicaron que la

conjugación de los oligómeros de morfolino antisentido con Vivo proporcionó la capacidad del compuesto conjugado para actuar sobre el corión que causó agregados.

A los 2 días posteriores a la fertilización, el examen de microscopía de fluorescencia reveló que las células germinales en los embriones sumergidos con *zfdnd*-MO-Vivo 40 o 60 μ M habían migrado mal y se habían diferenciado a otros tipos de células (FIG. 4A, FIG. 4B). Como se muestra, el pez cebra *dnd*-MO-Vivo interrumpió el desarrollo de células germinales en el pez cebra. La FIG. 4A muestra que en los peces de control, las células germinales migraron a la región gonadal y mantuvieron su morfología (células con forma redondeada). La FIG. 4B muestra que el tratamiento de *zfdnd*-MO-Vivo causó una migración errónea de las células germinales y eventualmente se diferenció en otros tipos de células.

Ejemplo 2:

El pez cebra tratado en el Ejemplo 1 se examinó después del desarrollo en peces adultos. La inmersión en baño de embriones de pez cebra con 40 o 60 μ M de *zfdnd*-MO-vivo permitió inducir de manera eficiente el 100% de esterilidad en los individuos que se trataron en condiciones óptimas como se muestra en la FIG. 8, sin afectar ninguna otra característica fisiológica del pez (FIG. 5). Como se muestra en la FIGURA 5, los embriones tratados con *dnd*-MO-Vivo de pez cebra se convirtieron en adultos infértiles de tipo masculino. La FIG. 5A no muestra ninguna diferencia en la apariencia o el tamaño general observado entre los peces adultos tratados y los machos de tipo silvestre. La FIG. 5B no muestra diferencias significativas en el peso corporal de los peces de 3 meses de edad ($n = 12$ mediante muestreo aleatorio) entre los peces tratados con *zfdnd*-MO-Vivo y los machos de tipo silvestre no tratados.

En experimentos adicionales, los métodos de la descripción se aplicaron con éxito al pez cebra y la duración de la inmersión se redujo a 5 a 6 horas sin afectar la eficiencia de la esterilidad (FIG. 6, FIG. 7 y FIG. 8). En la FIG. 6, se muestra la esterilidad inducida por *zfdnd*-MO-Vivo en pez cebra. Examen del tejido gonadal que muestra (A) un testículo bien desarrollado de peces machos no tratados. (B) Un ovario bien desarrollado de peces hembra no tratados. (C) Las gónadas de los peces tratados con *zfdnd*-MO-Vivo se desarrollaron en un tejido delgado similar a un filamento. Las microfotografías (D-F) muestran (D) espermatogénesis activa de los testículos de peces machos no tratados. (E) Un ovario bien desarrollado de un pez hembra no tratada con ovocitos en diferentes etapas de desarrollo. (F) Las gónadas de los peces tratados parecen estar subdesarrolladas y rodeadas de una gran cantidad de adipocitos sin estructura gonadal avanzada o células germinales.

Como se muestra en la FIG. 7 y FIG. 8, los embriones tratados con *dnd*-MO-Vivo de pez cebra se convirtieron en adultos infértiles. Tanto en A) inmersiones de 24 horas como en B) de 5 a 6 horas, todos los embriones que se sumergieron inicialmente con 60 o 40 μ M de *zfdnd*-MO-Vivo inmediatamente después de la fertilización se convirtieron en peces infértiles.

Ejemplo 3:

Para optimizar continuamente la tecnología que no forma parte de la presente invención, la inmersión en baño se realizó utilizando huevos no fertilizados, ya que la permeabilidad del corion disminuye gradualmente después de la fertilización y la activación con agua. Nuestros resultados muestran que cuando los huevos se sumergieron con *zfdnd*-MO (*dnd*-MO-Flu) marcado con fluoresceína 40 μ M, los huevos no fertilizados tomaron más *dnd*-MO-Flu que los huevos que se activaron con agua 1 hora antes de la inmersión (FIG. 9). Como se muestra en la FIG. 9, los huevos son más permeables antes de la activación con agua. En una inmersión de 5 horas con 40 μ M de *zfdnd*-MO-Flu, A) huevos no fertilizados captan más *zfdnd*-MO-Flu (fluorescencia verde más fuerte) que B) huevos preactivados con agua.

Ejemplo 4:

Cuando los huevos de salmónidos prefertilizados (trucha) se sumergieron con *dnd*-MO + *dnd*-MO-Vivo de salmónido (*Ssdnd*-MO + *Ssdnd*-MO-Vivo), las células germinales se eliminaron (FIG. 10) indicado por la falta de expresión del gen creador específico de células germinales *vasa*. Como se muestra en la FIG. 10, los huevos de salmónidos (trucha) se sumergieron con *dnd*-MO de salmónido en A: Control; B: 10 μ M *Ssdnd*-MO; C: 10 μ M *Ssdnd*-MO + 1 μ M *Ssdnd*-MO-Vivo; D: 10 μ M *Ssdnd*-MO + 2 μ M *Ssdnd*-MO-Vivo durante 48 horas antes de la fertilización. Poco después de la eclosión, la parte media del cuerpo se cortó y se utilizó para la extracción de ARN y RT-PCR para detectar la expresión de *vasa*. Un pez del grupo C y otro del grupo D parecían tener una expresión de *vasa* muy baja, lo que indica un posible efecto en la reducción de la abundancia de células germinales. RT: transcripción inversa.

Como se describe en la presente, los métodos de la invención son generalmente aplicables a peces de piscifactoría, ya que es deseable la producción de especies de piscifactoría estériles. Por consiguiente, los métodos de la invención son aplicables a cualquier especie cultivada de peces, particularmente a especies cultivadas comercialmente importantes.

Aplicabilidad industrial

5 Los métodos de la descripción producen peces reproductivamente estériles. La esterilización (infertilidad inducida) de peces de piscifactoría y animales acuáticos productores de huevos mejora su tasa de crecimiento al aumentar la conversión de energía de los alimentos en crecimiento muscular, en lugar del desarrollo gonadal. Además, si se escapa de las operaciones de acuicultura al medio ambiente, los peces de piscifactoría reproductivamente estériles y los animales acuáticos productores de huevos, incluidas las especies domesticadas, no nativas o modificadas genéticamente, no podrán reproducirse o cruzarse con la población silvestre. Esto ayudará a la contención biológica y evitará la contaminación genética de las poblaciones silvestres y/o el establecimiento en la naturaleza

10 de peces domésticos, no nativos o genéticamente modificados y animales acuáticos productores de huevos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar huevos de pez fertilizados o fertilizados no fertilizados o activados previamente con agua para hacer que los peces producidos a partir de estos sean reproductivamente estériles, en donde dichos huevos de pez se sumergen en un medio de inmersión acuoso que comprende un oligómero de Morfolino antisentido que suprime la expresión del gen *dead end* (*callejón sin salida*) en dicho pez, y en donde dicho oligómero de Morfolino antisentido se conjuga con 2-[(4-nitrofenil)oxycarbonilhexametileno-carbonilpiperazinil]-4,6-bis{di[(trifluoroacetamido-hexil)-aminocarbonil-oxietil]amino}triazina.
2. El método de la reivindicación 1, en donde los huevos son huevos no fertilizados o huevos fertilizados activados previamente con agua y la concentración del oligómero de morfolino antisentido en el medio de inmersión está en un intervalo de desde 1 a 20 μ M.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración del oligómero de morfolino antisentido en el medio de inmersión está en un intervalo de desde 3 a 15 μ M.
4. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración del oligómero de morfolino antisentido en el medio de inmersión está en un intervalo de desde 5 a 10 μ M.
5. El método de la reivindicación 1, en donde los huevos son huevos fertilizados y la concentración del oligómero de morfolino antisentido en el medio de inmersión está en un intervalo de desde 20 a 80 μ M.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dichos huevos se sumergen en dicho medio de inmersión durante un período de tiempo que está en un intervalo de desde 2 a 96 horas.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dichos huevos son huevos fertilizados no fertilizados o activados previamente con agua que se sumergen en dicho medio de inmersión durante un período de tiempo que está en un intervalo de desde 4 a 72 horas.
8. El método de la reivindicación 7, en donde dichos huevos se sumergen en dicho medio de inmersión durante un período de tiempo que está en un intervalo de desde 5 a 48 horas.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el oligómero de morfolino antisentido comprende un oligómero seleccionado del grupo que consiste en oligómeros de las SEQ. ID NO: 1-4 y variantes de las mismas que son eficaces en la esterilización reproductiva de peces tras el contacto con huevos de pez.
10. El método de la reivindicación 9, en donde el oligómero de morfolino antisentido comprende un oligómero de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o la SEQ ID NO: 4.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho gen *dead end* (*callejón sin salida*) comprende al menos uno de los genes *dead end* (*callejón sin salida*) de Salmonidae, Moronidae y Cichlidae.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el oligómero de morfolino antisentido comprende un oligómero de la SEQ ID NO: 1.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 y 6 a 8, en donde el medio de inmersión acuoso comprende además fluido ovárico de pez o diluyente de fertilización que contiene sal, Tris (pH 7-9), glicina y/o 0 a 30% de suero e inhibidores de proteasa tales como aprotinina o leupeptina.

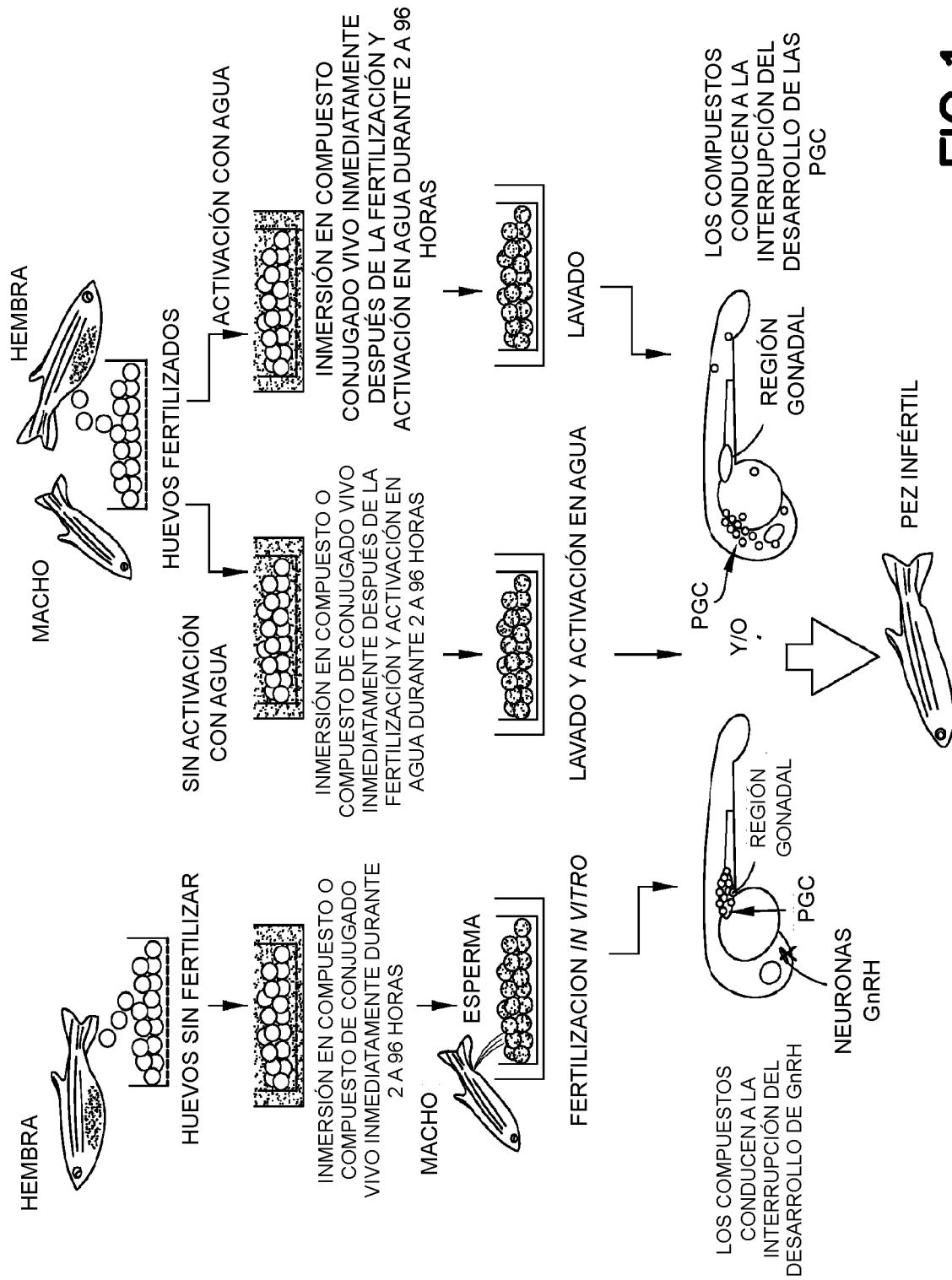


FIG.1

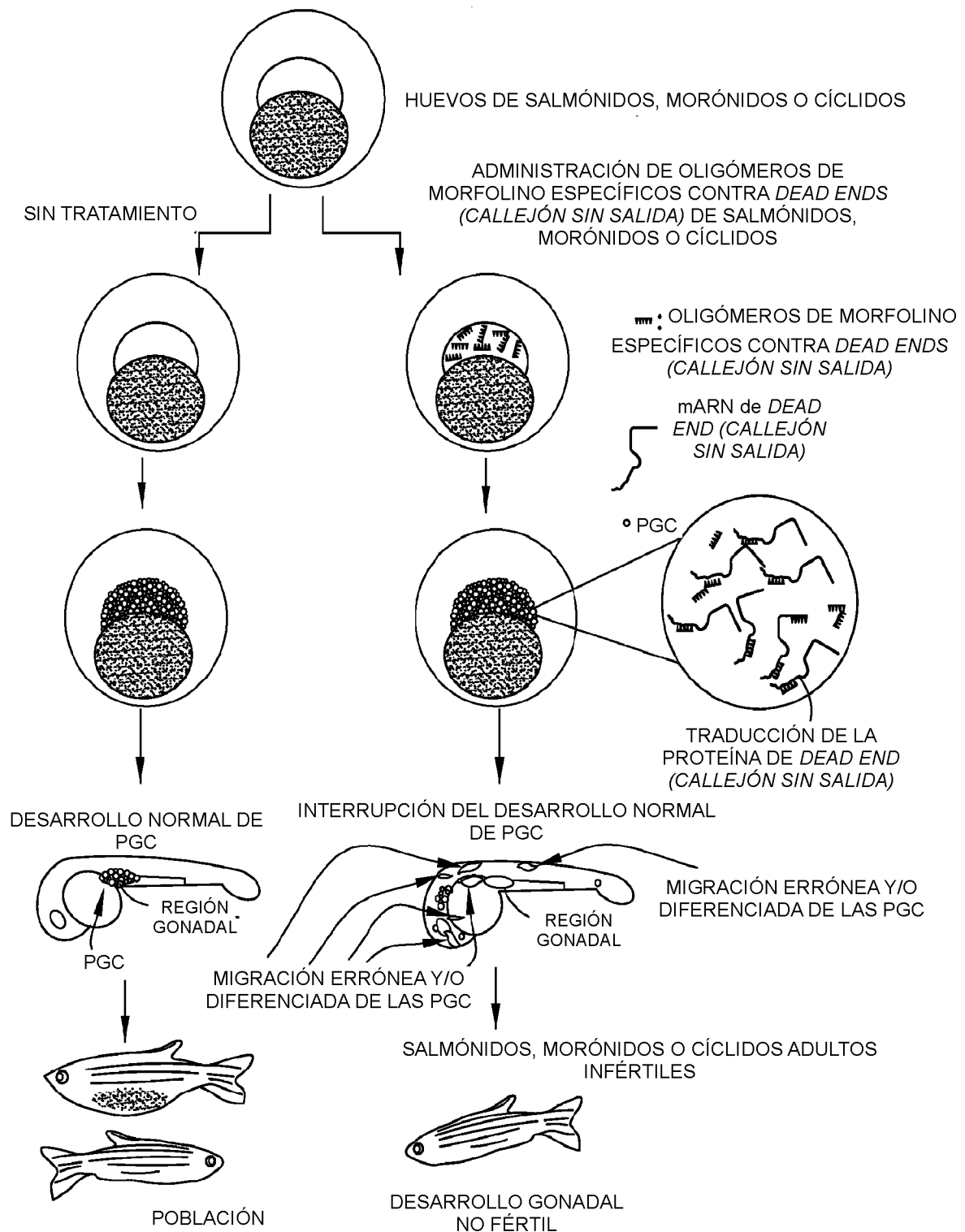


FIG.2

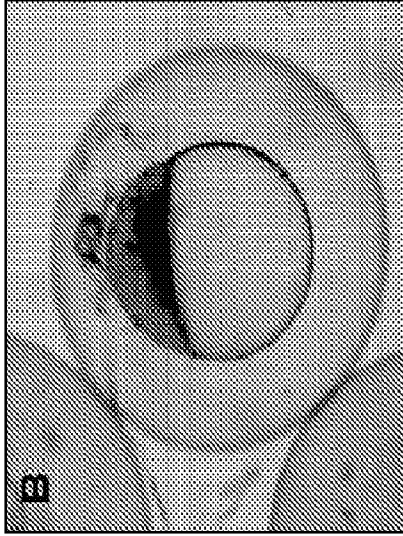


FIG.3B

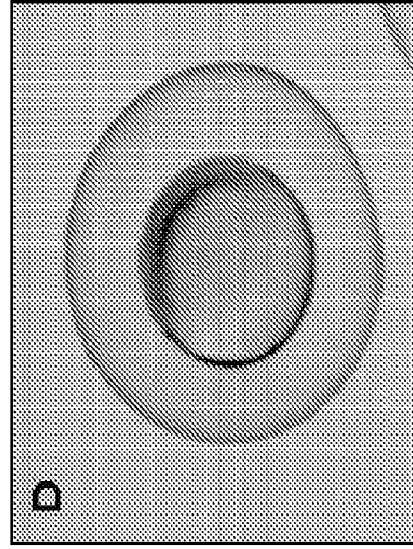


FIG.3D

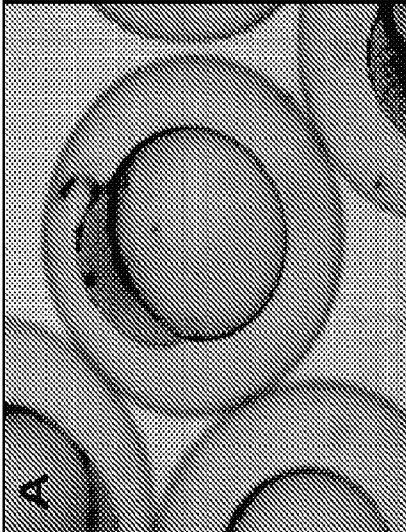


FIG.3A

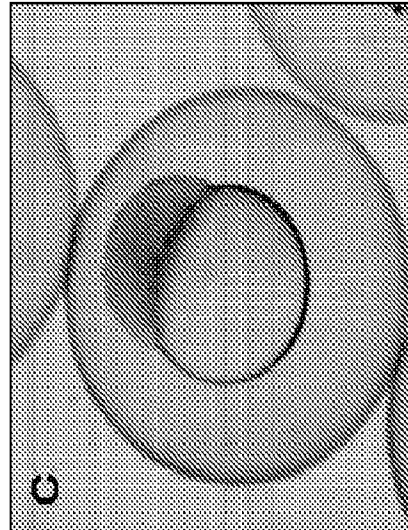


FIG.3C

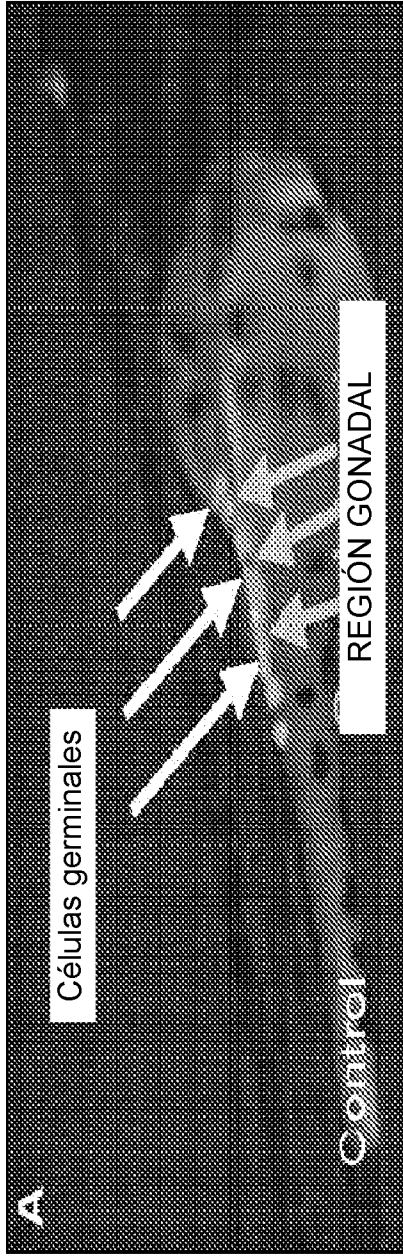


FIG.4A

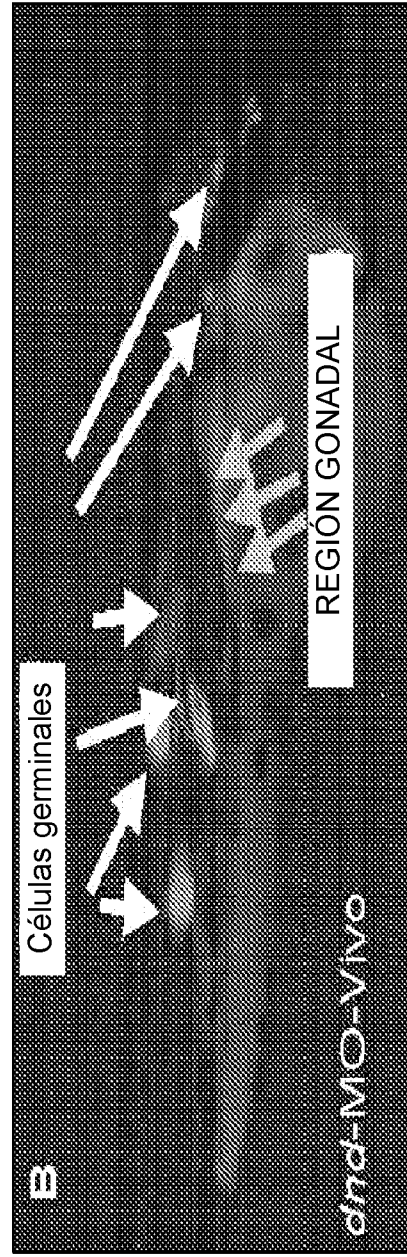


FIG.4B

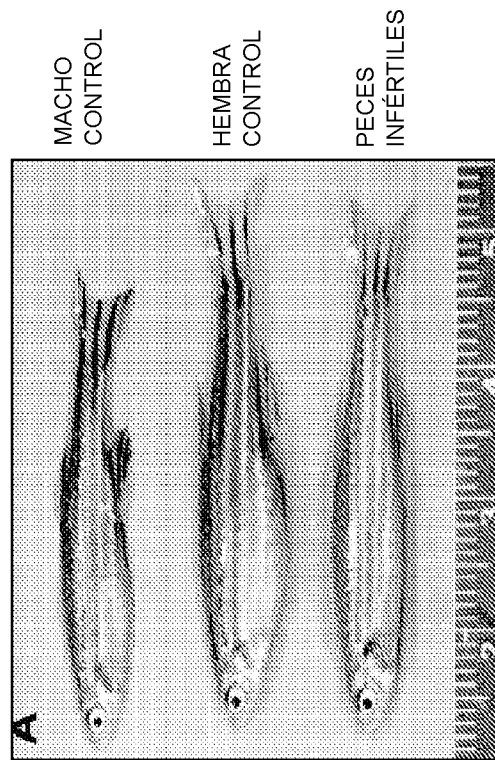


FIG.5A

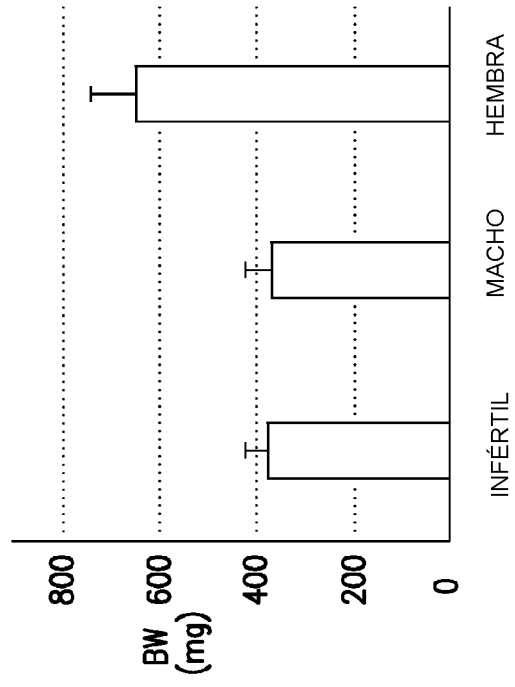


FIG.5B

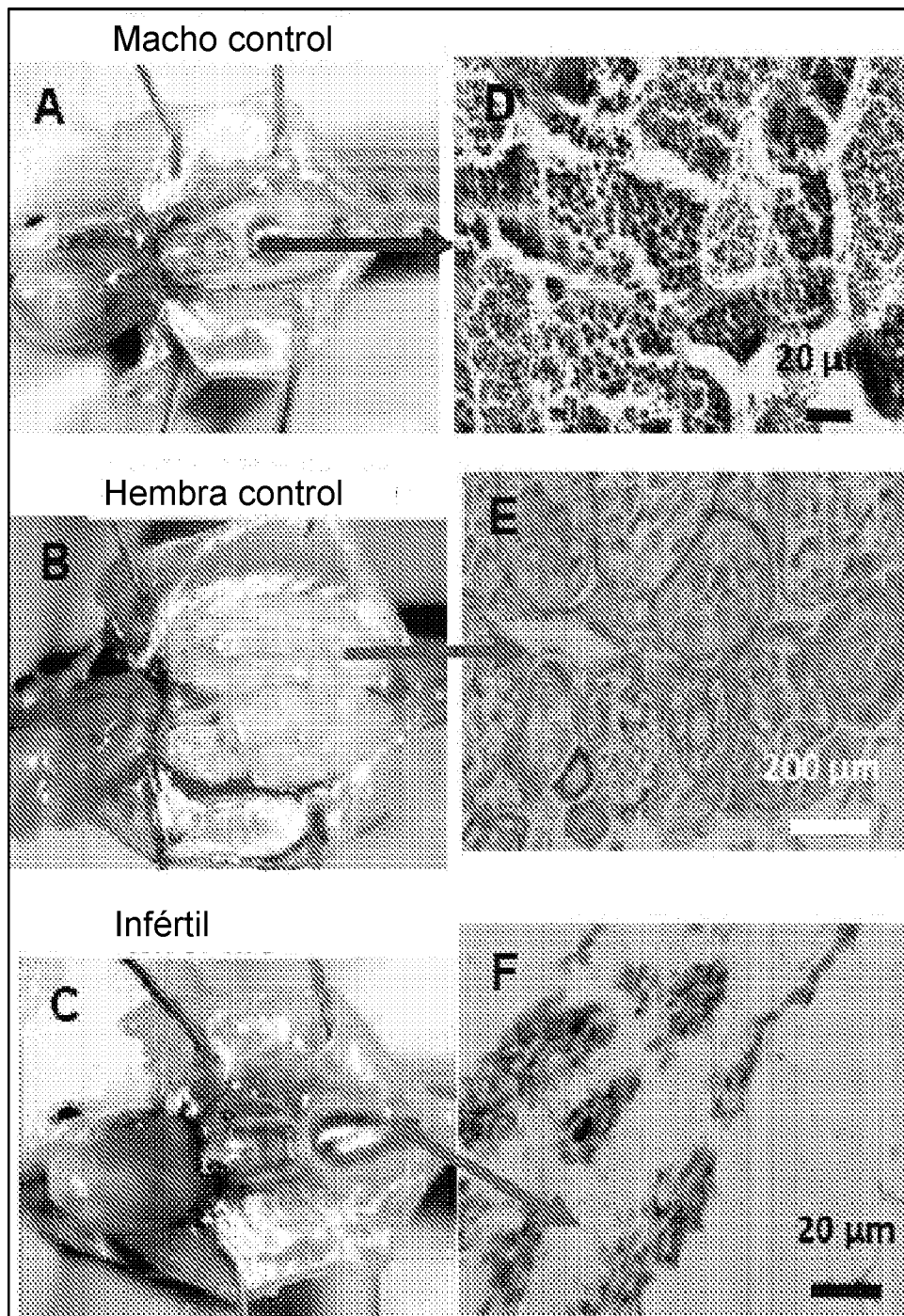


FIG.6

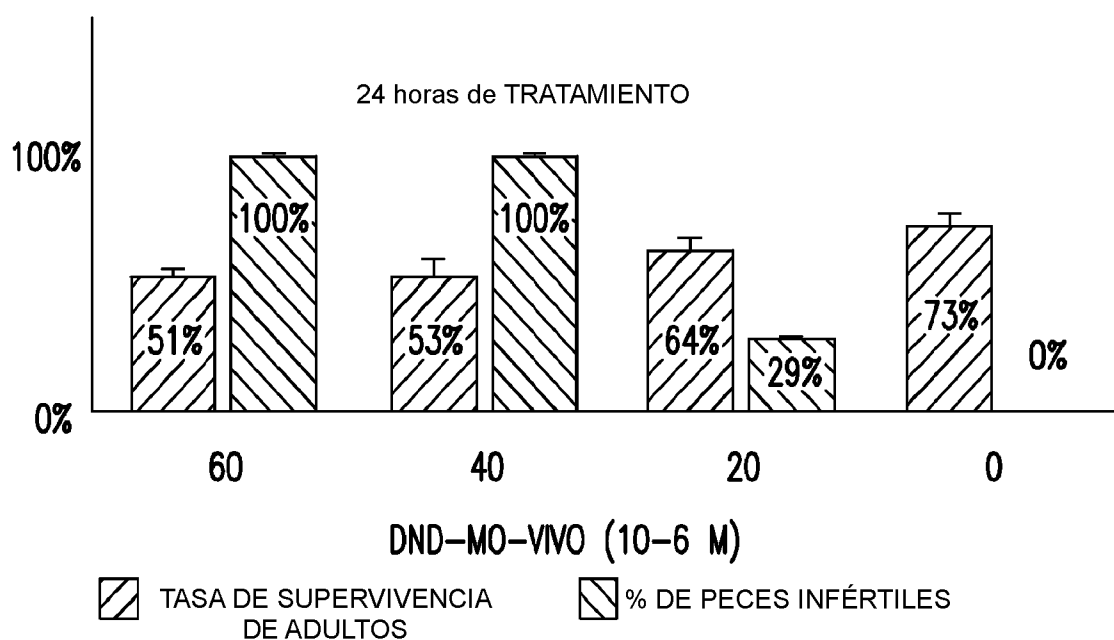


FIG.7A

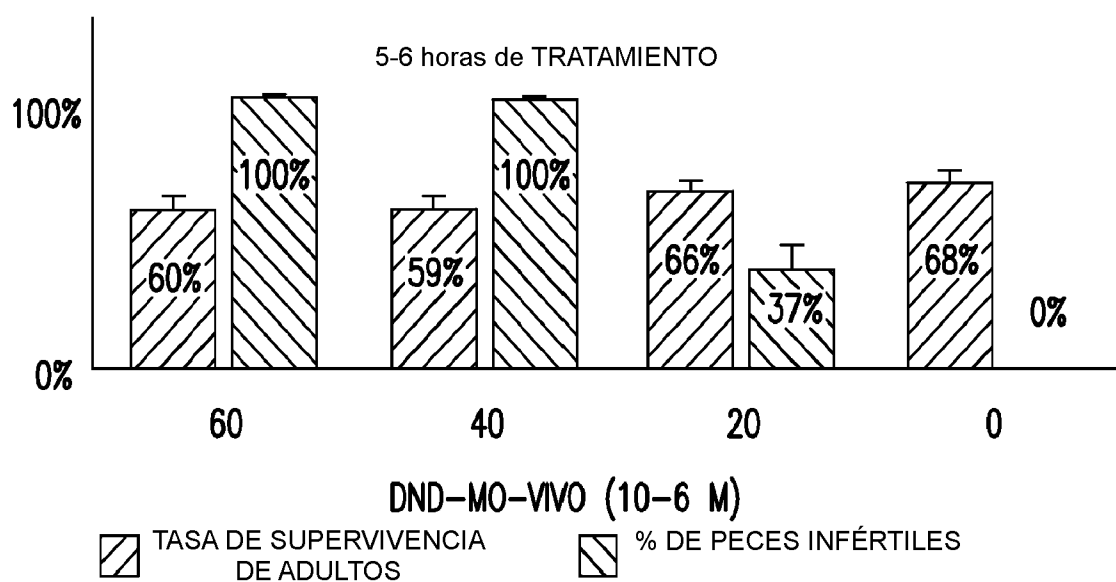


FIG.7B

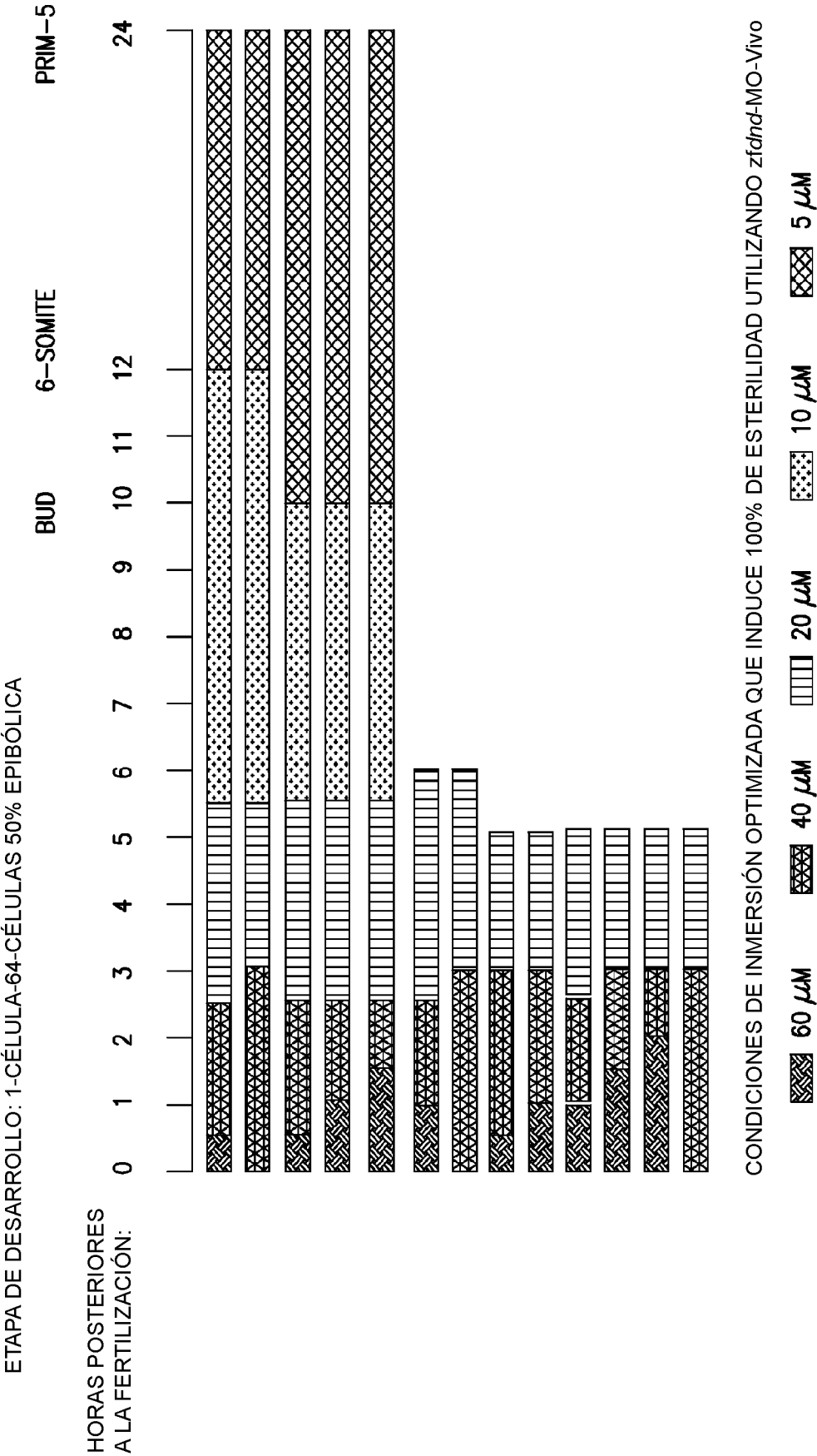


FIG.8

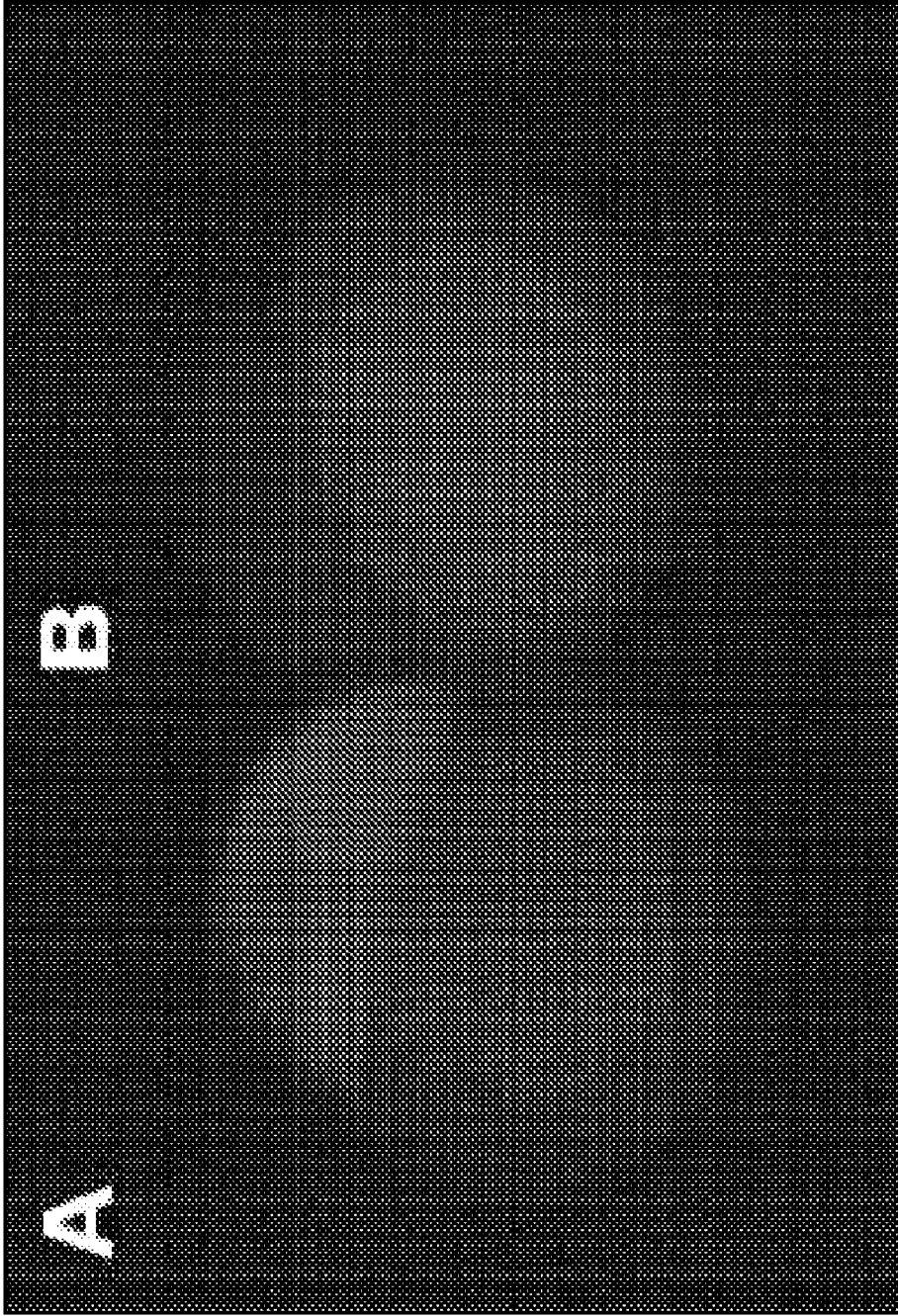


FIG.9

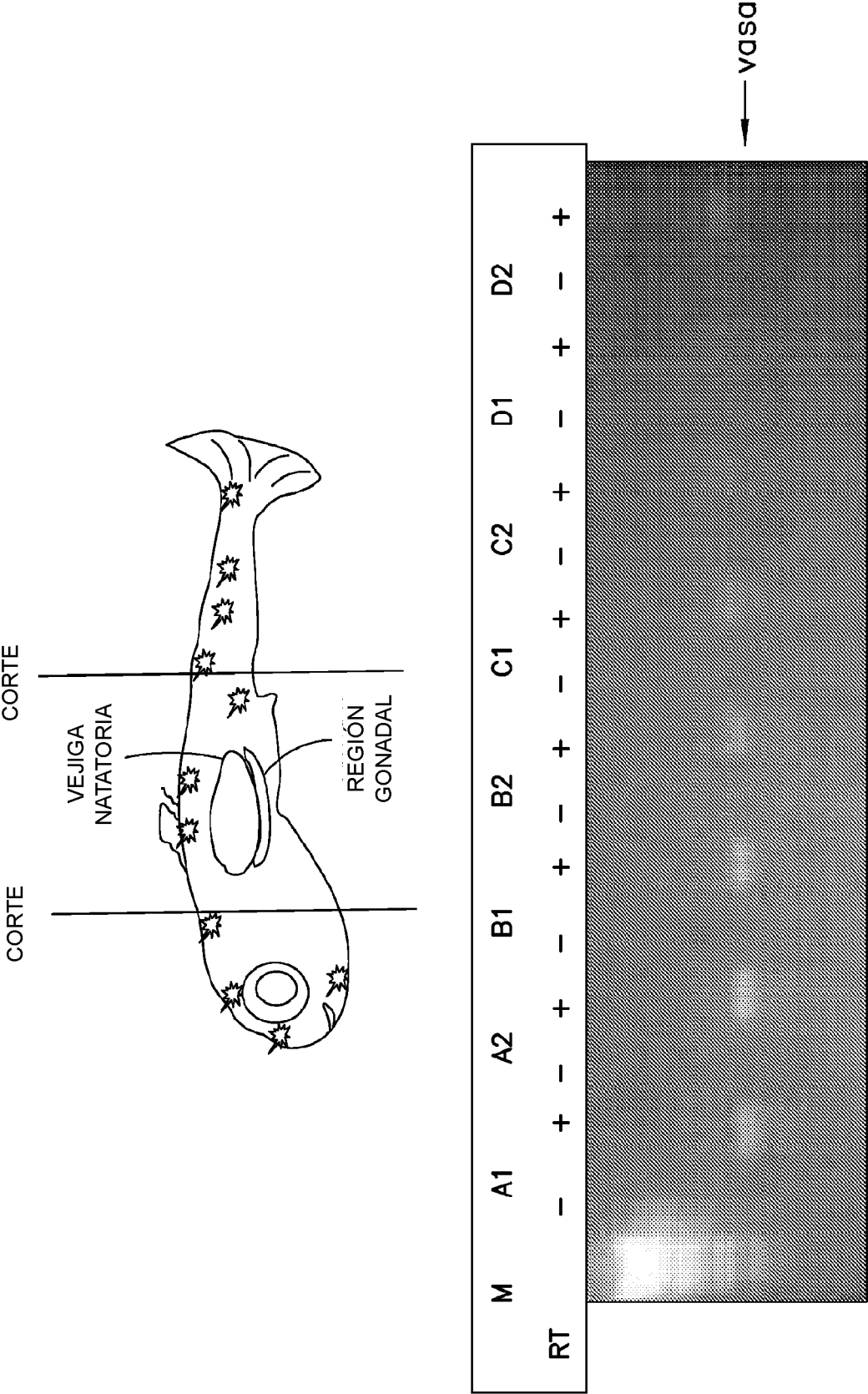


FIG.10