

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 987 265**

(51) Int. Cl.:

A01K 67/027 (2014.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/89 (2006.01)
C12N 15/88 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2018 PCT/NO2018/050308**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019 WO19117728**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2018 E 18834080 (6)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024 EP 3723479**

(54) Título: Métodos para la producción de peces estériles

(30) Prioridad:

15.12.2017 NO 20172005

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2024

(73) Titular/es:

**ACD PHARMACEUTICALS AS (100.0%)
Storgata 9
8370 Leknes, NO**

(72) Inventor/es:

JIMÉNEZ MARTÍNEZ, JUAN JOSÉ

(74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 987 265 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

Métodos para la producción de peces estériles

- 5 Esta invención se refiere a métodos para la producción de peces estériles. Los métodos incluyen la interrupción del desarrollo gonadal en peces a través de la administración de un gápmero como se menciona en las reivindicaciones que conducen a la falla del desarrollo gonadal fértil, y por lo tanto a peces reproductivamente estériles. Los métodos son para el uso en, por ejemplo, la piscicultura, el comercio de acuarios o el control de especies invasivas.
- 10 La piscicultura es actualmente una de las industrias de producción de alimentos de crecimiento más rápido y se torna cada vez más importante para resolver los déficits mundiales actuales y proyectados en la disponibilidad de alimentos acuáticos y productos del mar. La optimización de los métodos y procedimientos usados en la piscicultura es cada vez más necesaria para maximizar el bienestar/salud animal y la producción de alimentos y minimizar el impacto ecológico, para lograr de esta manera la sustentabilidad ambiental a largo plazo de nuestros suministros de 15 productos del mar.
- 20 La esterilización, es decir, la infertilidad inducida de peces y otros animales acuáticos ovíparos cultivados aumenta su ritmo de crecimiento mediante el aumento de la conversión de energía alimentaria en crecimiento muscular, en lugar del desarrollo gonadal. Además, si se escapan de las operaciones de piscicultura al medio ambiente, los peces y otros animales acuáticos ovíparos cultivados reproductivamente estériles, que incluyen las especies domesticadas, no nativas o modificadas genéticamente, no podrán reproducirse ni cruzarse con las poblaciones salvajes. Esto ayudará a la contención biológica e impedirá la contaminación genética de las poblaciones salvajes y/o el establecimiento en la naturaleza de peces y de otros animales acuáticos ovíparos cultivados domésticos, no nativos o modificados genéticamente.
- 25 La esterilidad en peces y otros animales acuáticos ovíparos puede lograrse mediante la interrupción del desarrollo de células de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y/o el desarrollo, migración y colonización de células germinales primordiales (PGC) en la gónada del embrión. Esto da como resultado la falla del desarrollo de la gónada y/o falla del funcionamiento gonadal completo y adecuado, y en última instancia la generación de peces y otros 30 animales acuáticos ovíparos reproductivamente estériles.
- 35 Los compuestos conocidos por interrumpir el desarrollo de células de GnRH y/o de PGC, su migración y/o supervivencia, incluyen oligonucleótidos antisentido (AON), que inactivan ARNm esenciales para células de GnRH y/o la formación, migración y/o supervivencia de PGC mediante el bloqueo de su traducción o interferir de cualquier otra manera con su procesamiento. Z. Linhartová y otros, Theriogenology 84 (2015), 1246-1255 describe la esterilización de esturión por microinyección en embriones de esturión de morfolino oligonucleótidos antisentido, lo que atenua la expresión del gen callejón sin salida (dnd). Dnd es un gen específico de vertebrados que codifica una proteína de unión a ARN, que es fundamental para la migración y supervivencia de PGC.
- 40 T. Wong y. Zohar, Sci. Rep. 5 (2015), 15822 divulga un método de inmersión en baño para producir pez cebra infértil que incluye el uso de morfolino oligonucleótidos conjugados con Vivo contra dnd de pez cebra.
- 45 El documento WO 2015/073819 A1 y el documento WO 2016/187198 divultan métodos para la producción de peces y animales acuáticos ovíparos reproductivamente estériles para, por ejemplo, piscicultura. Los compuestos para volver estériles a tales animales pueden suministrarse a los huevos de tales animales antes de la fertilización o la activación en el agua de dichos huevos o después de la fertilización y la activación en el agua mediante el contacto de los huevos en un medio de inmersión que incluye los compuestos de interés, y opcionalmente un transportador molecular.
- 50 A. Pauli y otros, PLOS ONE, vol. 10, núm. 10, (2015), página e0139504 divulga un método para silenciar la expresión de dnd en un huevo de pez cebra, el método comprende introducir un gápmero específico de dnd- en dicho huevo por microinyección.
- 55 Generalmente, en la tecnología antisentido, el ARNm se reconoce mediante hibridación de tipo Watson-Crick de un AON complementario. La meta de inhibir la expresión génica de una manera específica puede lograrse mediante la prevención de la maduración del ARNm, el bloqueo de la traducción o por inducción de la degradación. Para que sea eficaz el AON debe ser capaz de ingresar a la célula, estable frente a nucleasas, no tóxico y mostrar alta afinidad de unión y especificidad por el ARNm objetivo.
- 60 Se ha realizado un avance considerable con respecto a la estabilidad y la unión mediante el uso de AON modificados químicamente. Un ejemplo de tales oligonucleótidos AON modificados químicamente con una cadena principal de fosforotioato en lugar de una cadena principal de fosfodiéster o una cadena principal que comprende anillos de metilenomorfolina (es decir morfolino oligonucleótidos), lo que mejora la resistencia a la degradación enzimática. Otro ejemplo es ácidos nucleicos bloqueados (LNA), un nucleósido que comprende un resto de azúcar 65 bicíclico que comprende un puente 4'-CH₂-O-2', que "bloquea" el anillo de azúcar en una conformación que exhibe mayor afinidad de unión por el ARN complementario.

Esta invención se refiere a métodos como se define en las reivindicaciones.

En una primera modalidad, la invención proporciona un método para producir peces estériles como se define en la reivindicación 1.

- 5 Los peces incluyen todas las especies de peces, que incluyen, pero sin limitarse a, salmonidos, por ejemplo, salmón del Atlántico, salmón plateado, salmón real, salmón keta, salmón rojo, salmón rosado, salmón masu, especies de trucha, tales como trucha arcoiris, trucha de arroyo, trucha marrón, tímalo común, tímalo del Ártico, trucha ártica, morónidos, por ejemplo, lubina, lubina rayada, lubina blanca, lubina híbrida rayado-blanca, lubina amarilla, perca, tal como, perca blanca, perca amarilla o perca europea, híbridos perca-lubina, cíclidos, por ejemplo, tilapia del Nilo, tilapia azul, híbridos de tilapia azul-Nilo, tilapia de Mozambique, cíprinidos, por ejemplo, pez cebra y otras especies de carpa, bremas, por ejemplo, doradas, pargos, gádidos, por ejemplo, especies de bacalao, eglefino, pescadilla, abadejo y bagre.
- 10 15 En una modalidad preferida, el pez es uno para piscicultura tal como un salmón, una trucha, una lubina, una tilapia, una carpa o un bagre. En otra modalidad preferida, el pez es uno para el comercio de acuarios, por ejemplo, un pez cebra, un pez de colores, un bagre, un tetra, un pez hacha, un pez lápiz, una palometta negra, una damisela, un pez payaso o cromis.
- 20 25 En otra modalidad preferida, el pez es un salmonido, morónido, cíclido, gádido, pangásido, ictalúrido o cíprinido tal como un salmón, una trucha, una lubina, una tilapia, una carpa o un bagre.
- Como se usa en la presente descripción, el término "gápmero" se refiere a un oligonucleótido antisentido monocatenario que tiene una secuencia ala-espacio-ala contigua. El espacio comprende un segmento continuo de desoxinucleótidos modificados con fosforotioato en 2' que reclutan RNasa H. El espacio está flanqueado por una región de ala 5' y una región de ala 3', en donde los nucleótidos en dichas regiones de ala son ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o nucleótidos de ARN alquilados en 2'.
- 30 35 El espacio del gápmero puede consistir en 6 a 20 desoxinucleótidos modificados con fosforotioato en 2' que reclutan RNasa H enlazados, tal como 6 a 20, 6 a 18, 6 a 16, 6 a 14, 6 a 12 o 6 a 10 o 7 a 20, 7 a 18, 7 a 16, 7 a 14, 7 a 12, 7 a 10 u 8 a 20, 8 a 18, 8 a 16, 8 a 14, 8 a 12, 8 a 10 o 9 a 20, 9 a 18, 9 a 16, 9 a 14, 9 a 12 o 9 a 10 o 10 a 20, 10 a 18, 10 a 16, 10 a 14 o 10 a 12.
- 40 45 La región de ala 5' del gápmero puede consistir en 1 a 8 nucleótidos enlazados, tal como 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos u 8 nucleótidos, en donde dichos nucleótidos son LNA o nucleótidos de ARN alquilados en 2'.
- La región de ala 3' del gápmero puede consistir en 1 a 8 nucleótidos enlazados, tal como 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos u 8 nucleótidos, en donde dichos nucleótidos son LNA o nucleótidos de ARN alquilados en 2'.
- 50 55 La región de ala 5' puede consistir en el mismo número de LNA enlazados o nucleótidos de ARN alquilados en 2' como la región de ala 3' o la región de ala 5' y la región de ala 3' puede consistir en un número diferente de LNA enlazados o nucleótidos de ARN alquilados en 2'.
- Cada LNA o nucleótido de ARN alquilado en 2' de la región de ala puede ser un nucleótido químicamente modificado mejorador de la afinidad. Ejemplos de tales nucleótidos son LNA en la conformación α -L o conformación β -D, nucleótidos 2'-O-metil-ARN o nucleótidos 2'-O-metoxietil-ARN.
- El gápmero puede consistir en 8 a 36 nucleótidos. En algunas modalidades, el gápmero consiste en 10 a 22 nucleótidos, tal como 12 a 18, 13 a 17 o 12 a 16 nucleótidos, por ejemplo 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos o 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. En algunas modalidades, el gápmero consiste en no más de 22 nucleótidos, por ejemplo, no más de 20 nucleótidos o no más de 18 nucleótidos, tal como 15, 16 o 17 nucleótidos. En algunas modalidades, el gápmero comprende menos de 20 nucleótidos.
- El motivo ala-espacio-ala del gápmero puede ser 5-8-5, 5-6-5, 4-10-4, 4-8-4, 46-4, 3-12-3, 3-10-3, 3-8-3, 2-16-2, 2-14-2, 2-12-2, 2-10-2, 1-16-1, 1-14-1, 1-12-1, 110-1, 2-8-2, 1-8-1, 3-6-3 o 1-6-1.
- 60 65 Los enlaces internucleósidos entre los nucleótidos en el gápmero pueden ser todos enlaces internucleósidos fosforotioato. En algunas de tales modalidades, los enlaces internucleósidos fosforotioato están estereodefinidos, es decir configuración [todo Rp] o configuración [todo Sp]. En otras modalidades, los enlaces internucleósidos fosforotioato no están estereodefinidos, es decir mezclas racémicas de Rp y Sp. En otra modalidad más, los enlaces internucleósidos fosforotioato dentro de la región de ala 5' y/o el espacio y/o la región de ala 3' están estereodefinidos.

Los gápmberos pueden sintetizarse mediante métodos conocidos en la técnica. Están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Qiagen, Bio-Synthesis Inc., Exiqon y similares.

5 La secuencia del gápmero puede diseñarse mediante el uso de bases de datos de secuencias génicas disponibles y herramientas bioinformáticas para lograr alta afinidad por el objetivo, especificidad de secuencia y estabilidad biológica. Las empresas que brindan síntesis de gápmberos personalizados a menudo también brindan herramientas para su diseño.

10 Como se usa en la presente descripción, el término pez "estéril" se refiere a un individuo que no puede reproducirse sexualmente. Los peces estériles se definen como individuos que no son capaces de alcanzar la madurez sexual o reproducirse cuando alcanzan la edad de la madurez sexual.

15 La producción de peces estériles de acuerdo con la invención implica la interrupción del desarrollo gonadal en el embrión desarrollado a partir de los huevos de tales animales después de la fertilización. Esto se logra mediante la transfección de los huevos con un gápmero que tiene una secuencia adecuada para dirigirse al ARN de un gen seleccionado de callejón sin salida (dnd), nanos, vasa, piwi, receptor de gnrh o fsh , es decir que es capaz de interrumpir el desarrollo de células de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y/o el desarrollo de células germinales primordiales (PGC) mediante la atenuación del ARNm de dichos genes y por lo tanto interrumpir la generación de un producto génico responsable de o implicado en el desarrollo de células de GnRH y/o PGC, su migración y/o colonización.

20 25 30 El gápmero usado en el método de la invención cataliza la degradación dependiente de RNasa H de ARNm complementarios objetivos, por lo tanto, la "atenuación" de tales objetivos: las regiones de ala del gápmero logran suficiente afinidad de unión al objetivo y confieren resistencia a nucleasas. Cuando el gápmero se hibrida con su ARN objetivo, el espacio central activa la escisión por RNasa H de la hebra de ARN opuesta y por lo tanto la degradación del ARN objetivo. El gápmero para el uso en el método de la invención por lo tanto tiene una secuencia que es adecuada para el ARNm objetivo de un gen que es esencial para el desarrollo de células germinales embrionarias seleccionado de dnd, nanos, vasa, piwi, receptor de gnrh o fsh, escinde dicho ARN y suprime la expresión de la proteína respectiva, que es esencial para el desarrollo de células germinales embrionarias, de esta manera provocan la falla del desarrollo gonadal fetal.

35 El gápmero para el uso en el método de la invención tiene una secuencia adecuada para dirigirse al ARN de genes seleccionados de dnd, nanos, vasa, piwi, receptor de gnrh o fsh que son esenciales para el desarrollo de células germinales embrionarias. La secuencia específica del gápmero depende del ARN objetivo, la ubicación de la unión dentro del ARN objetivo y la especie del pez. En una modalidad preferida, el gápmero para el uso en el método de la invención tiene una secuencia adecuada para dirigirse al ARN de dnd. La atenuación de dichos genes da como resultado la falla del desarrollo gonadal fetal y en última instancia genera animales acuáticos ovíparos estériles.

40 El término "que se dirige" como se usa en la presente descripción se refiere al gápmero que se une a/se hibrida con un ARN complementario.

El término "huevo" como se usa en la presente descripción se refiere al recipiente que contiene un cigoto o un embrión, es decir un huevo fertilizado.

45 Los huevos transfectados por el método de la invención son huevos fertilizados preactivados en agua. En tales huevos, la estructura del corion ha cambiado de manera que el paso de las moléculas se limita.

50 Los huevos se transfectan por inmersión en un medio de inmersión acuoso. Generalmente, el medio de inmersión comprende al menos el gápmero y agua. En una modalidad, el medio de inmersión acuoso consiste en el gápmero y agua. En otra modalidad, el medio de inmersión puede comprender además otros compuestos, que incluyen compuestos que ayudan o promueven la transfección y/o compuestos que son beneficiosos para los embriones/peces que eclosionan de los huevos transfectados.

55 Los compuestos que ayudan o promueven la transfección como se describe en las reivindicaciones incluyen sales tales como acetatos, citratos, boratos, fosfatos y similares, agentes tamponantes que mantienen el pH del medio de inmersión acuoso dentro de un intervalo deseado, preferentemente en el intervalo de 7-9, que incluye Tris, HEPES, MOPS y similares y agentes quelantes tales como EDTA, aminoácidos como glutamina, glicina y similares.

60 Los compuestos que son beneficiosos para los embriones/peces que eclosionan de los huevos transfectados incluyen hormonas, promotores del crecimiento, antígenos protectores, antibióticos, nutrientes y similares.

Otros compuestos que pueden estar presentes en el medio de inmersión acuoso incluyen medio de cultivo para huevos de pez, fluido ovárico, suero, inhibidores de proteasa y similares.

65 Los huevos se sumergen en el medio de inmersión acuoso y el gápmero se absorbe naturalmente en los huevos. Tal absorción sin ayuda también se conoce como gimnosis. Los huevos sumergidos pueden someterse a ultrasonidos

brevemente. Las concentraciones de gápmero pueden estar en el intervalo de 1 nM a 250 µM, por ejemplo 1 nM a 5 nM o 5 nM a 50 nM o 10 nM a 20 nM o 100 nM a 250 µM, por ejemplo 100 a 250 nM, 250 a 500 nM, 500 a 1000 nM, 1µM a 50 µM, 50µM a 100 µM, 100 µM a 150 µM, 150 µM a 200 µM o 200 µM a 250 µM, tal como al menos 5 nM, al menos 10 nM, al menos 20 nM, al menos 50 nM, al menos 100 nM, al menos 250 nM, al menos 500 nM, al menos 1 µM, al menos 50 µM, al menos 100 µM, al menos 150 µM, al menos 200 µM.

5 El tiempo requerido para la transfección satisfactoria, es decir el tiempo requerido para que los huevos se sumerjan en el medio de inmersión dependerá del tipo de huevo (especie de pez).

10 Si la transfección se lleva a cabo por gimnosis como se reivindica, los huevos pueden sumergirse en el medio de inmersión acuoso que comprende el gápmero durante 1 a 144 horas, por ejemplo 1 hora a 2 horas, 2 horas a 6 horas, 6 horas a 12 horas, 12 horas a 24 horas, 24 horas a 36 horas, 36 horas a 48 horas, 48 horas a 120 horas o 4 horas a 12 horas, 24 horas a 96 horas, o 36 a 72 horas, tal como al menos 2 horas, al menos 4 horas, al menos 6 horas, al menos 8 horas, al menos 12 horas, al menos 24 horas, al menos 36 horas, al menos 48 horas, al menos 60 horas, al menos 72 horas, al menos 84 horas, al menos 96 horas, al menos 108 horas, al menos 120 horas o al menos 132 horas. Para períodos de inmersión prolongados, puede ser beneficioso reemplazar el medio de inmersión con medio de inmersión nuevo.

20 La temperatura del medio de inmersión acuoso depende del tipo de huevo/especie de pez y la duración de la transfección, es decir el tiempo que los huevos deben mantenerse en el medio de inmersión acuoso para que se transfecen. Para la gimnosis como se reivindica, la temperatura del medio de inmersión acuoso se mantendrá típicamente en el intervalo de la temperatura del agua del hábitat natural de los huevos. Para los huevos de peces de agua fría tales como el salmón, la temperatura del medio de inmersión se mantiene típicamente a 2 a 8 °C, por ejemplo 2 a 4 °C, 4 a 6 °C o 3 a 8 °C, mientras que para los huevos de peces de agua caliente tales como la tilapia, la temperatura del medio de inmersión se mantiene típicamente de 21 a 25 °C.

25 El éxito de la transfección, es decir la degradación del ARN objetivo y la supresión de la expresión de proteínas, puede determinarse fácilmente por PCR cuantitativa (qPCR); por tanto, los huevos transfectados con éxito pueden identificarse y seleccionarse y no hay necesidad de seguir los embriones hasta la maduración de las gónadas para demostrar que el desarrollo de las células de GnRH y/o de PGC, su migración y/o colonización, se interrumpió y los animales acuáticos ovíparos adultos resultantes serán reproductivamente estériles.

30 Después de la transfección de huevos fertilizados preactivados en agua, tales huevos se activan en agua. Antes de la activación en el agua los huevos pueden lavarse con agua o un medio adecuado antes de transferirlos a un hábitat/un ambiente, que permita el desarrollo del embrión, su crecimiento y en última instancia la eclosión del pez. Después de la transfección de huevos fertilizados, tales huevos pueden lavarse con agua o un medio adecuado antes de transferirlos a un hábitat/un ambiente, que permita el desarrollo del embrión, su crecimiento y en última instancia la eclosión del pez.

35 40 El método de la invención es útil para producir peces reproductivamente estériles. La esterilización (infertilidad inducida) de peces cultivados mejora su ritmo de crecimiento al aumentar la conversión de energía alimentaria en crecimiento muscular, en lugar del desarrollo gonadal. Además, si se escapan de las operaciones de piscicultura al medio ambiente, los peces estériles, que incluyen las especies domesticadas, no nativas o modificadas genéticamente, no podrán reproducirse ni cruzarse con las poblaciones salvajes. Esto ayudará a la contención biológica e impedirá la contaminación genética de poblaciones salvajes y/o el establecimiento en la naturaleza de peces domésticos, no nativos o modificados genéticamente cultivados.

45 En una modalidad, el gápmero para el uso en el método de la invención tiene una secuencia adecuada para dirigirse al ARN de dnd en el salmón del Atlántico, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 o una variante de estas, que difiere de estas secuencias en 1 a 5 nucleótidos y que es adecuada para dirigirse al ARN de dnd en el salmón del Atlántico. En otra modalidad, el gápmero para el uso en el método de la invención consiste en un gápmero de SEQ ID NO: 1 y un gápmero de SEQ ID NO: 2 (o variantes de estos, que difieren de estas secuencias en 1 a 5 nucleótidos y que son adecuadas para dirigirse al ARN de dnd en el salmón del Atlántico) o un gápmero de SEQ ID NO: 1 y un gápmero de SEQ ID NO: 3 (o variantes de estos, que difieren de estas secuencias en 1 a 5 nucleótidos y que son adecuadas para dirigirse al ARN de dnd en el salmón del Atlántico) o un gápmero de SEQ ID NO: 2 y un gápmero de SEQ ID NO: 3 (o variantes de estos, que difieren de estas secuencias en 1 a 5 nucleótidos y que son adecuadas para dirigirse al ARN de dnd en el salmón del Atlántico) o un gápmero de SEQ ID NO: 1, un gápmero de SEQ ID NO: 2 y un gápmero de SEQ ID NO: 3 (o variantes de estos, que difieren de estas secuencias en 1 a 5 nucleótidos y que son adecuadas para dirigirse al ARN de dnd en el salmón del Atlántico).

50 55 60 La invención se ilustrará por los siguientes ejemplos.

Ejemplos

65 Ejemplo 1: Transfección de huevos de *Salmo salar* fertilizados por inmersión en un medio de inmersión acuoso que comprende un gápmero que se dirige al ARNm de callejón sin salida

Los gápmberos 1-3 que se dirigen al ARNm de callejón sin salida (dnd) de *Salmo salar* y el gápmero 4 que tiene una secuencia no específica de dnd (control negativo) se diseñaron mediante el uso de la herramienta en línea de diseño de gápmberos de Qiagen y se compraron a Qiagen:

- 5 Gápmero 1: TTGAACGCTCCTCCAT (SEQ ID NO: 1)
Gápmero 2: GGAGCAGCGAGGAGGT (SEQ ID NO: 2)
Gápmero 3: GCAAAACATTAAAGTA (SEQ ID NO: 3)
Gápmero 4: GCTCCCTTCAATCCAA (SEQ ID NO: 4)
- 10 El espacio de los gápmberos comprendía nucleótidos modificados con fosforotioato mientras que las alas comprendían LNA.
- 15 Los huevos de *Salmo salar* se fertilizaron en un medio de inmersión acuoso (NaCl 150 mM, KCl 3,3 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) durante 10 minutos antes de recoger y enjuagar los huevos fertilizados una vez en el medio de inmersión acuoso. Los huevos se colocaron en 10 tubos de ensayo (3 huevos/tubo de ensayo) y se sumergieron en un medio de inmersión acuoso (NaCl 150 mM, KCl 3,3 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) que contiene 10 nM de gápmero 1, 2, 3 o 4 (2 tubos de ensayo cada uno) o sin gápmero (2 tubos de ensayo). De los dos tubos de ensayo iguales, uno se sometió a ultrasonidos brevemente (10 s, 42 kHz). Todos los tubos de ensayo se almacenaron a 8 °C en la oscuridad durante 4 horas, después se extrajo el ARN de acuerdo con el método TRIzol, y se trató con DNase para eliminar completamente cualquier ADN del ARN extraído.
- 20 Los ARN se sometieron a transcripción inversa a ADNc mediante el uso del kit de RT-PCR de Qiagen OneStep, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo con un termociclador MyCycler de BioRad mediante el uso del kit de polimerasa OneTaq (New England Biolabs) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron los siguientes cebadores específicos de dnd (tamaño del amplicón 401 pb):
- 25 Salgap2-F: GAGCGTTCAAGTCAGGTGTTG (SEQ ID NO: 5)
Salgap2-R: CAGAGCTGACGTTCTCCGT (SEQ ID NO: 6)
- 30 La amplificación por PCR de un gen constitutivo de *Salmo salar* común se llevó a cabo para controlar la integridad del ARN extraído/ADNc transcrita. Todas las muestras mostraron una banda igualmente fuerte para el gen constitutivo. Los controles de PCR sin plantilla estaban en blanco, es decir mostraban que no había contaminación de plantilla de dnd en los reactivos de PCR y/o el equipo que produjera resultados falsos.
- 35 Los huevos que se habían sumergido en medio de inmersión solo (sin gápmero) proporcionaron señales de PCR fuertes, que demostraban que el ARNm de dnd era detectable en tales huevos. Los huevos que se habían sumergido en medio de inmersión que comprende gápmero 4 también proporcionaron señales de PCR fuertes, que demostraban que la secuencia de gápmero aleatoria no se dirigía al ARNm de dnd.
- 40 Los huevos que se habían sumergido en medio de inmersión que comprende gápmero 1 proporcionaron una señal de PCR muy débil (con ultrasonidos) y nula (sin ultrasonidos), que demostraba que los huevos se habían transfecado con éxito y que el gápmero 1 era eficaz para dirigirse a y destruir el ARNm de dnd, es decir atenuar el gen callejón sin salida que es fundamental para la migración y supervivencia de PGC. Si los huevos se hubieran dejado desarrollar, los peces eclosionados de estos habrían sido reproductivamente estériles.
- 45 Los huevos que se habían sumergido en medio de inmersión que comprende gápmero 2 proporcionaron una señal de PCR débil (con o sin ultrasonidos), que demostraba que los huevos se habían transfecado con éxito y que el gápmero 2 fue en gran medida eficaz para dirigirse a y destruir el ARNm de dnd. Es probable que el gápmero 2 pudiera demostrar una eficacia igualmente buena en condiciones de incubación optimizadas, por ejemplo, un tiempo de incubación más prolongado.
- 50 Los huevos que se habían sumergido en medio de inmersión que comprende gápmero 3 proporcionaron una señal de PCR fuerte (con ultrasonidos) y señal de PCR nula (sin ultrasonidos). Se cree que la señal de PCR fuerte en los huevos con ultrasonidos no se debe a la falla en la transfección de los huevos o la falta de eficacia del gápmero sino más bien a que los huevos hayan sufrido por el tratamiento mecánico. Esta hipótesis tiene como soporte la ausencia de la señal de PCR en los huevos sin ultrasonidos que demuestra que los huevos se habían transfecado con éxito y que el gápmero 3 fue eficaz para dirigirse a y destruir el ARNm de dnd, es decir atenuar el gen callejón sin salida que es fundamental para la migración y supervivencia de PGC. Si los huevos se hubieran dejado desarrollar, los peces eclosionados de estos habrían sido reproductivamente estériles.
- 55 60 Los siguientes Ejemplos 2 y 3 no están de acuerdo con la invención y están presentes únicamente con fines ilustrativos.
- Ejemplo 2: Transfección de huevos de *Salmo salar* fertilizados por microinyección de un gápmero que se dirige al ARNm de callejón sin salida

Los huevos de *Salmo salar* se fertilizan en agua complementada con glutatión para impedir el endurecimiento del corion. En la etapa de una sola célula, los huevos se recogen y se dividen en 5 lotes (10 huevos/lote) y los gápmberos descritos en el Ejemplo 1 se disuelven en solución salina fisiológica para preparar soluciones de gápmberos 1-4 a una concentración de 400 ng/μl. Un lote de huevos se somete a microinyección con una solución de gápmero, es decir 5 lote 1/solución de gápmero 1, lote 2/solución de gápmero 2 y así sucesivamente mientras que el lote 5 se inyecta con solución salina fisiológica sola (mismo volumen que la solución de gápmero). La microinyección se lleva a cabo mediante el uso de una picobomba neumática PV820 de World Precision instruments, acoplada con un micromanipulador Narishige MN-151. Después de la inyección, los huevos se cultivan en agua que contiene glutatión a 8 °C en la oscuridad durante 24 horas. De cada lote, se transfieren 3 huevos a un tubo de ensayo para la 10 extracción del ARN, la transcripción inversa y la PCR que se lleva a cabo como se describió en el Ejemplo 1. La ausencia de o una señal de PCR débil demuestra que la transfección tiene éxito y que el gápmero es eficaz para dirigirse a y destruir el ARNm de dnd, es decir atenuar el gen callejón sin salida que es fundamental para la migración y supervivencia de PGC. Los huevos restantes se enjuagan en solución salina fisiológica y se transfieren para su posterior desarrollo en su hábitat natural hasta que los peces reproductivamente estériles eclosionen de 15 estos.

Ejemplo 3: Transfección de huevos de *Salmo salar* fertilizados por inmersión en un medio de inmersión acuoso que comprende un gápmero que se dirige al ARNm de callejón sin salida y un agente de transfección

20 Los huevos de *Salmo salar* se fertilizan en un medio de inmersión acuoso (NaCl 150 mM, KCl 3,3 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) durante 10 minutos antes de recoger y enjuagar los huevos fertilizados una vez en el mismo medio de inmersión acuoso. Los huevos se colocan en 10 tubos de ensayo (10 huevos/tubo de ensayo) y se sumergen en un medio de inmersión acuoso (NaCl 150 mM, KCl 3,3 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4) que contiene una premezcla del gápmero 1, 2, 3 o 4 y Oligofectamine™ (Thermofisher) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o solo el 25 agente de transfección y sin gápmero. La concentración de gápmero en los medios de inmersión que contienen gápmero es 8 nM. Todos los tubos de ensayo se almacenan a 8 °C en la oscuridad durante 6 horas. De cada tubo de ensayo, se transfieren 3 huevos a un tubo de ensayo nuevo para la extracción del ARN, la transcripción inversa y la PCR que se lleva a cabo como se describió en el Ejemplo 1. La ausencia de o una señal de PCR débil demuestra que la transfección tiene éxito y que el gápmero es eficaz para dirigirse a y destruir el ARNm de dnd, es decir 30 atenuar el gen callejón sin salida que es fundamental para la migración y supervivencia de PGC. Los huevos restantes se enjuagan en solución salina fisiológica y se transfieren para su posterior desarrollo en su hábitat natural hasta que los peces reproductivamente estériles eclosionen de estos.

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir peces estériles, dicho método comprende transfectar huevos de pez fertilizados con un gápmero que es eficaz para volver estériles a los individuos producidos a partir de estos por inmersión en un medio de inmersión acuoso que comprende dicho gápmero, en donde el gápmero tiene una secuencia adecuada para dirigirse al ARN de un gen seleccionado de callejón sin salida (dnd), nanos, vasa, piwi, receptor de gnrh o fsh, en donde el gápmero comprende un espacio que comprende un segmento continuo de desoxinucleótidos modificados con fosforotioato en 2' que reclutan RNasa H y en donde dicho espacio está flanqueado por una región de ala 5' y una región de ala 3', en donde los nucleótidos en dichas regiones de ala son ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o nucleótidos de ARN alquilados en 2', y en donde el gápmero se absorbe en los huevos por gimnosis.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gápmero tiene una secuencia adecuada para dirigirse al ARN de dnd.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el gápmero consiste en 8 a 36 nucleótidos, preferentemente 10 a 22 nucleótidos y con mayor preferencia, 14 a 20 nucleótidos.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el pez es un salmónido, morónido, cíclido, gádido, pangásido, ictalúrido o ciprínido.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el pez es un salmónido.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho salmónido es salmón del Atlántico, salmón plateado, salmón real, salmón keta, salmón rojo, salmón rosado, salmón masu, trucha arcoiris, trucha de arroyo, trucha marrón, tímalo común, tímalo del Ártico o trucha ártica.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho salmónido es salmón del Atlántico.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el gápmero tiene una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 o una variante de estas, que difiere de estas secuencias en 1 a 5 nucleótidos y que es adecuada para dirigirse al ARN de dnd en el salmón del Atlántico.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho gápmero tiene una secuencia seleccionada de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde los nucleótidos en dichas regiones de ala son LNA.