



(51) МПК

A01K 61/00 (2006.01)

A01K 61/17 (2017.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01K 61/00 (2020.02); A01K 67/0276 (2020.02); C12N 15/113 (2020.02); C12N 15/873 (2020.02); A01K 2207/05 (2020.02); A01K 2217/075 (2020.02); A01K 2227/40 (2020.02); C12N 2310/11 (2020.02); C12N 2310/3233 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2016123427, 14.11.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.11.2014Дата регистрации:
08.06.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.11.2013 US 61/904,652;
21.03.2014 US 61/968,458;
16.09.2014 US 62/050,815

(43) Дата публикации заявки: 20.12.2017 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 08.06.2020 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.06.2016(86) Заявка РСТ:
US 2014/065698 (14.11.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/073819 (21.05.2015)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский бульвар, д. 11,
Гоулингз Интернэшнл Инк.

(72) Автор(ы):

ЗОХАР Йонатан (US),
ВОН Тен-тсао (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЮНИВЕРСИТИ ОФ МЭРИЛЕНД
БАЛТИМОР КАУНТИ (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP 2535404, 19.12.2012. YUAN S. et
al., Microinjection of mRNA and morpholino
antisense oligonucleotides in zebrafish embryos,
JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS,
2009, N. 27, p.e1113. WADA T. et al., Antisense
morpholino targeting just upstream from a poly
(A) tail junction of maternal mRNA removes the
tail and inhibits translation, Nucleic acids (см.
прод.)

C2

2723037

RU

RU

2723037

C2

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕСПЛОДНОЙ РЫБЫ И БЕСПЛОДНЫХ ПРОИЗВОДЯЩИХ ИКРУ
ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ И СПОСОБ ДОСТАВКИ СОЕДИНЕНИЙ В ИКРУ И ЭМБРИОНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способу получения репродуктивно стерильной рыбы. Способы включают в себя погружение неоплодотворенной икры рыбы, предварительно активированной водой оплодотворенной икрой или

оплодотворенной икры рыбы в иммерсионную среду, содержащую антисмысловой морфолиновый олигомер, который подавляет экспрессию гена рецептора *dead end* у рыбы, что позволяет получать из икры репродуктивно стерильную рыбу. 2 н. и 10 з.п. ф-лы, 3 пр., 10 ил.

(56) (продолжение):

research, 2012, V. 40, N. 22, p.e173. FUJIMOTO T. et al., Sexual dimorphism of gonadal structure and gene expression in germ cell-deficient loach, a teleost fish, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, V. 107, N. 40, p.17211-17216. WO 2012106026, 09.08.2012. US 0007935816, 03.05.2011. RU 2422529, 27.06.2011.

R U 2 7 2 3 0 3 7 C 2

R U 2 7 2 3 0 3 7 C 2

R U 2 7 2 3 0 3 7 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) RU (11) 2 723 037⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A01K 61/00 (2006.01)
A01K 61/17 (2017.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A01K 61/00 (2020.02); A01K 67/0276 (2020.02); C12N 15/113 (2020.02); C12N 15/873 (2020.02); A01K 2207/05 (2020.02); A01K 2217/075 (2020.02); A01K 2227/40 (2020.02); C12N 2310/11 (2020.02); C12N 2310/3233 (2020.02)

(21)(22) Application: 2016123427, 14.11.2014

(24) Effective date for property rights:
14.11.2014

Registration date:
08.06.2020

Priority:

(30) Convention priority:
15.11.2013 US 61/904,652;
21.03.2014 US 61/968,458;
16.09.2014 US 62/050,815

(43) Application published: 20.12.2017 Bull. № 35

(45) Date of publication: 08.06.2020 Bull. № 16

(85) Commencement of national phase: 15.06.2016

(86) PCT application:
US 2014/065698 (14.11.2014)

(87) PCT publication:
WO 2015/073819 (21.05.2015)

Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij bulvar, d. 11,
Goulingz Interneshnl Ink.

(72) Inventor(s):

ZOHAR Yonathan (US),
WONG Ten-tsao (US)

(73) Proprietor(s):

UNIVERSITY OF MARYLAND BALTIMORE
COUNTY (US)

(54) METHOD FOR PRODUCING INFERTILE FISH AND INFERTILE AQUATIC ANIMAL EGGS AND
METHOD OF DELIVERING COMPOUNDS INTO CAVIAR AND EMBRYOS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; fish farming.

SUBSTANCE: invention relates to a method for producing reproductive sterile fish. Methods include immersion of unfertilized fish caviar pre-activated with water of fertilized caviar or fertilized fish caviar in immersion medium, containing antisense morpholino oligomer, which suppresses expression of *dead end*

receptor gene in fish, which allows to produce reproductively sterile fish from caviar.

EFFECT: method of producing infertile fish and infertile aquatic animal eggs and a method of delivering compounds into caviar and embryos are proposed.

12 cl, 3 ex, 10 dwg

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №61/904652, поданной 15 ноября 2013, предварительной заявки на патент США №61/968458, поданной 21 марта 2014 года, и предварительной заявки на патент США №62/050815 поданной 16 сентября 2014 г. Раскрытия этих родственных предварительных заявок включены в настоящее описание посредством отсылки во всей их полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее описание относится к способам получения репродуктивно

стерильной рыбы и других производящих икру водных животных для аквакультуры, аквариумистики и контроля инвазивных видов. Способы включают в себя нарушение развития гонад посредством введения соединений, которые приводят к неспособности развития фертильных гонад. Такие соединения могут быть доставлены в икру до или после оплодотворения (или активации водой) посредством контакта неоплодотворенной или оплодотворенной икры с соединением, представляющим интерес.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Аквакультура играет все более важную роль для решения текущего и будущего глобального дефицита водных пищевых продуктов и доступности морепродуктов.

Поскольку продолжается сдвиг зависимости от урожая рыбного промысла в сторону искусственного размножения водных видов, то резко возрастает потребность в оптимизации методов аквакультуры для максимального производства продуктов питания и минимального влияния на экологию, тем самым обеспечивая долгосрочную экологическую устойчивость поставок морепродуктов.

[0004] Стерилизация (индуцированное бесплодие) искусственно выращенной рыбы

и других производящих икру водных животных повышает их скорость роста за счет увеличения превращения энергии пищи в рост мышечной массы вместо развития гонад. Кроме того, при попадании из аквакультуры в окружающую среду репродуктивно стерильной искусственно выращенной рыбы и других производящих икру водных животных, включая одомашненные, неаборигенные или генетически модифицированные виды, они не смогут размножаться или скрещиваться с дикой популяцией. Это способствует биологическому сдерживанию и предотвращению генетического загрязнения диких популяций и/или созданию в дикой природе одомашненной, неаборигенной или генетически модифицированной искусственно выращиваемой рыбы и других производящих икру водных животных.

[0005] Кроме того, репродуктивная стерилизация рыбы и других производящих икру водных животных предотвращает несанкционированное разведение и продажу запатентованной или иным образом защищенной, генетически отобранный или модифицированной рыбы и других производящих икру водных животных.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Раскрытие относится к способам получения популяций стерильных производящих икру водных животных, в которых способы стерилизации включают нарушение миграции и/или развития примордиальных половых клеток у каждой обработанной особи без вредного воздействия на другие характеристики нормального животного.

[0007] Один из аспектов раскрытия относится к способу получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных, при этом указанный способ включает контакт неоплодотворенной икры или оплодотворенной икры до активации водой с антисмысловым морфолиновым олигомером, который эффективен для трансфекции

икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных.

[0008] Другой из аспектов раскрытия относится к способу получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных, при этом указанный способ включает контакт неоплодотворенной икры или оплодотворенной икры до активации водой с 5 антисмысловым морфолиновым олигомером, который эффективен для трансфекции икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных, при этом антисмыловой морфолиновый олигомер конъюгирован с молекулой-переносчиком, эффективной для хорионического переноса конъюгата. Молекула-переносчик может, например, содержать октагуанидиновый дендример, содержащий 10 фрагмент триазинового ядра.

[0009] В другом аспекте раскрытие относится к способу получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных, при этом указанный способ включает контакт оплодотворенной икры с антисмыловым морфолиновым олигомером, конъюгированным с молекулой-переносчиком, который эффективен для трансфекции 15 оплодотворенной икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных.

[0010] В еще одном аспекте настоящего раскрытия предложен способ доставки соединений в икру производящих икру водных животных, включающий контакт неоплодотворенной или предварительно активированной водой икры с биологически 20 предпочтительным соединением или конъюгатом биологически предпочтительного соединения и молекулы-переносчика, содержащей октагуанидиновый дендример, содержащий фрагмент триазинового ядра.

[0011] Дополнительный аспект раскрытия относится к композиции для обработки икры рыбы для превращения рыб, полученных из нее, в репродуктивно стерильных, 25 указанная композиция содержит антисмыловый морфолиновый олигомер, содержащий олигомер, выбранный из группы, состоящей из олигомеров SEQ ID №: 1-4 и их вариантов, которые эффективны для репродуктивной стерилизации рыбы при контакте с икрой рыбы.

[0012] В еще одном аспекте раскрытие относится к композиции, в которой 30 антисмыловый морфолиновый олигомер конъюгирован с молекулой-переносчиком, эффективной для хорионического переноса конъюгата, при этом молекула-переносчик содержит октагуанидиновый дендример, содержащий фрагмент триазинового ядра.

[0013] Другие аспекты, особенности и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными из последующего описания и прилагаемой формулы изобретения.

35 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0014] На фиг. 1 показана блок-схема способа погружения согласно вариантам реализации раскрытия.

[0015] На фиг. 2 представлена блок-схема производства репродуктивно стерильной рыбы, полученной согласно другим вариантам реализации раскрытия.

[0016] На фиг. 3 представлена микрофотография, показывающая результаты погружения эмбрионов данио-перио в емкость для погружения с молекулой-переносчиком Vivo, конъюгированной с dnd-MO. На фиг. 3А обнаружены неохарактеризованные агрегаты в эмбрионах рыбы после 3-часового погружения с 20 μM zfnd-MO-Vivo. На фиг. 3В появилось больше агрегатов после 5-часового 45 погружения. На фиг. 3С и фиг. 3Д агрегаты не были обнаружены в эмбрионах, погружаемых с 20 μM zfnd-MO в течение (3С) 3 часов и (3Д) 5 часов (без Vivo).

[0017] На фиг. 4 представлена флуоресцентная микрофотография, демонстрирующая эффекты введения в эмбрионы рыбы молекулы-переносчика, конъюгированной с

анти смысловым морфолиновым олигомером (МО), который эффективно блокирует трансляцию белка Dead end (Dnd). На фиг. 4А показано, что у контрольной рыбы половые клетки мигрировали в область гонад и сохранили свою морфологию. На фиг. 4В показано, что обработка zfdnd-MO-Vivo вызвала неправильную миграцию и в итоге 5 дифференцировку в другие типы клеток.

[0018] На фиг. 5 представлена фотография и графическое изображение, показывающее, что эмбрионы данио-рерио, обработанные dnd-MO-Vivo, развились в бесплодных взрослых самцов. На фиг. 5А показано отсутствие видимой разницы во внешнем виде или общем размере между обработанной взрослой рыбой и самцами 10 дикого типа. На фиг. 5В показано отсутствие существенной разницы в массе тела 3-месячной рыбы (n=12 методом случайной выборки) среди рыбы, обработанной zfdnd-MO-Vivo, и необработанными самцами дикого типа.

[0019] На фиг. 6 представлена микрофотография, показывающая, что zfdnd-MO-Vivo приводит к стерильности данио-рерио. Исследование гонадной ткани показало (фиг. 15 6А) хорошо развитые семенники у необработанных самцов рыбы; (фиг. 6В) хорошо развитые яичники у необработанных самок рыбы; (фиг. 6С) гонады рыбы, обработанной zfdnd-MO-Vivo, развились в тонкую нитеподобную ткань. На микрофотографиях (6Д-6F) показан (фиг. 6Д) активный сперматогенез в семенниках у необработанных самцов рыбы; (фиг. 6Е) хорошо развитые яичники у необработанных самок рыбы с ооцитами 20 на разных стадиях развития; (фиг. 6F) гонады обработанной рыбы, по-видимому, недостаточно развиты и окружены большим количеством адипоцитов без развитой структуры гонад или половых клеток.

[0020] На фиг. 7 представлено графическое изображение эмбрионов данио-рерио, обработанных dnd-MO-Vivo, которые развились в бесплодных взрослых особей. На 25 обеих фиг. 7А, 24 часа, и фиг. 7 В, от 5 до 6 часов погружения, все эмбрионы, которые первоначально погружали с 60 или 40 μ M zfdnd-MO-Vivo, развились в бесплодных рыб.

[0021] фиг. 8 представлено графическое изображение эмбрионов данио-рерио, обработанных dnd-MO-Vivo, которые развились в бесплодных взрослых особей. При нескольких оптимизированных условиях, когда погружение начинали немедленно после 30 оплодотворения и продолжали 24 часа (или стадии prim-5) и от 5 до 6 часов (или 50% стадии эпидермии), все эмбрионы, которых первоначально погружали с 60 или 40 μ M zfdnd-MO-Vivo, развились в стерильную рыбу.

[0022] На фиг. 9 представлена микрофотография, показывающая, что икра более проницаема до активации водой. При 5-часовом погружении с 40 μ M zfdnd-MO-Flu, как 35 показано на фиг. 9А, неоплодотворенная икра поглотила больше zfdnd-MO-Flu (более сильная зеленая флуоресценция), чем предварительно активированная водой икра, как показано на фиг. 9 В.

[0023] На фиг. 10 показан участок рыбы, используемый для экстракции РНК, а также полученные результаты. Лососевую (форели) икру погружали с лососевым dnd-MO, 40 где А: контроль; В: 10 μ M Ssdnd-MO; С: 10 μ M Ssdnd-MO +1 μ M Ssdnd-MO-Vivo; D: 10 μ M Ssdnd-MO +2 μ M Ssdnd-MO-Vivo на 48 часов до оплодотворения. После обработки икры при помощи 10 μ M Ssdnd-MO +1 μ M Ssdnd-MO-Vivo или 10 μ M Ssdnd-MO +2 μ M Ssdnd-MO-Vivo, половые клетки были уничтожены, на что указывает отсутствие экспрессии специфического маркера половых клеток гена vasa.

45 ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0024] В одном аспекте настояще раскрытие относится к доставке предпочтительных соединений к икре рыбы или других производящих икру водных животных посредством контакта икры с соединениями перед оплодотворением или активацией водой. Доставка

предпочтительных соединений в рыбу или других производящих икру водных животных традиционно достигается за счет кормления, инъекции или погружения эмбрионов или отдельных особей в соединение, представляющее интерес. Инъекции стада, однако, не

5 практическины при работе в крупномасштабной коммерческой аквакультуре. Кроме того, применение обработки погружением оплодотворенной и активируемой водой икры ограничено из-за низкой проницаемости хориона икры, толстого бесклеточного многослойного покрытия, также известного как яйцевая оболочка, состоящего в основном из белков и гликопротеинов. Как правило, при обработке погружением эмбрионов рыбы или других производящих икру водных животных,

10 высокомолекулярные соединения не способны пройти через хорион и достигнуть эмбриона.

[0025] После овуляции/метания икры и до оплодотворения и активации водой, икра имеет проницаемый и перфорированный хорион (или самый верхний слой), который позволяет проникать воде и веществам в неоплодотворенную икру через поры или 15 микропиле, небольшие каналы в хорионе икры, позволяя сперматозоиду проникнуть в яйцеклетку для оплодотворения. После оплодотворения и активации водой, хорион уплотняется и икра становится непроницаемой, предотвращая дальнейшее поглощение веществ или воды из окружающей среды.

[0026] Было обнаружено, что во временной промежуток между овуляцией/метанием 20 икры и оплодотворением/активацией водой, икра является проницаемой и эффективно поглощает вещества в икру из иммерсионной среды. После короткого периода погружения, икру оплодотворяют и активируют водой, в это время она становится непроницаемой и начинается эмбриональное развитие.

[0027] В настоящем раскрытии в некоторых аспектах описаны способы эффективной 25 доставки соединения в икру производящих икру водных животных посредством контакта икры с соединениями, представляющими интерес, в течение временного промежутка, когда икра является проницаемой для веществ из окружающей среды, то есть, после овуляции/метания икры и до оплодотворения, или после оплодотворения и до активации водой. В различных вариантах реализации контакт включает в себя погружение икры 30 в иммерсионную среду, содержащую одно или более соединение(й), представляющих интерес.

[0028] Соответственно, в различных аспектах настояще раскрытие относится к 35 контакту неоплодотворенной икры или оплодотворенной икры до активации водой с соединением в иммерсионной среде. Соединение, применяемое в иммерсионной среде, может способствовать стерилизации производящих икру водных животных, и иммерсионная среда в конкретных вариантах реализации может содержать дополнительные соединения или другие материалы, которые полезны для производящих икру водных животных, вылупившихся из икры, контактировавшей с иммерсионной средой, например, такие материалы, как ДНК/РНК, гормоны, стимуляторы роста, 40 защитные антигены, питательные вещества, и т.д.

[0029] Таким образом, раскрытие предполагает способы получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных, включающие контакт икры в иммерсионной среде с выбранными соединениями, что приводит к получению 45 репродуктивно стерильных особей. Способы стерилизации включают нарушение развития гонад у эмбриона. Настоящее раскрытие также относится к способам предотвращения скрещивания между одомашненными, неаборигенными и генетически модифицированными искусственно выращиваемыми рыбами/другими производящими икру водными животными и их дикими популяциями, а также приживаемости такой

рыбы из аквакультуры и других производящих икру водных животных в дикой природе. Кроме того, описанные способы можно применять для предотвращения генетического загрязнения дикой популяции посредством искусственно выращиваемых рыб и других производящих икру водных животных.

5 [0030] Способы раскрытия применимы к производящим икру водным животным. Используемые в данном описании производящие икру водные животные включают вынашивающие икру виды водных животных, включая все виды рыб и других производящих икру водных животных, таких как ракообразные и/или моллюски.

10 [0031] Соответственно, производящие икру водные животные включают в себя все виды рыб, включая, но не ограничиваясь, лосось, атлантический лосось, кижуч, чавычу, кету, нерку, горбушу, симу, форель, радужную форель, речную форель, озерную форель, обыкновенного хариуса, сибирского хариуса, арктического гольца, морского окуня (bass), гибридного окуня, полосатого окуня, белого окуня (white bass), гибридов полосатого и белого окуня, желтого окуня (yellow bass), окуня (perch), белого окуня (white perch), желтого окуня (yellow perch), речного окуня, гибридов окуней, нильскую тиляпию, голубую тиляпию, гибридов голубой и нильской тиляпии, мозамбикскую тиляпию, данио-рерио, виды карпа, лещей, морских карасей, спаровых, виды сомов и трески.

20 [0032] Способы раскрытия дополнительно применимы к производящим икру водным животным, таким как ракообразные и/или моллюски. Такие производящие икру водные животные могут включать, но не ограничиваются, креветок, глубоководных креветок, омаров, раков, крабов, устрицы, кальмаров, осьминогов и т.п.

25 [0033] Как определено в настоящем документе, под "стерилизацией" производящих икру водных животных понимается приведение особи в состояние невозможности воспроизвести потомство. Репродуктивно стерильные производящие икру водные животные определены как особи, которые не могут достичь половой зрелости или не могут размножаться при достижении возраста половой зрелости.

30 [0034] Способы получения репродуктивно стерильной рыбы и других производящих икру водных животных включают введение соединений в икру до оплодотворения или активации водой для нарушения развития гонадотропин-высвобождающих гормонов (GnRH) клеток и/или развития примордиальных половых клеток (PGC), их миграцию и колонизацию в гонадах эмбриона, что приводит к невозможности развития гонад и/или нарушению полного и надлежащего функционирования гонад на клеточном или тканевом уровне, и, в конечном счете, к получению стерильной рыбы и других производящих икру водных животных.

35 [0035] GnRH необходим для развития гонад и поддержания репродуктивных циклов у позвоночных. В частности, GnRH, также известный как рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (LHRH), стимулирует синтез и секрецию гонадотропинов, в частности, фолликулостимулирующего гормона (FSH) и лютеинизирующего гормона (LH), которые имеют важное значение для развития гонад и, следовательно, нарушение синтеза и секреции GnRH является действенным способом для индукции стерильности.

40 [0036] Клетки PGC представляют собой популяцию клеток в эмбрионе рыбы, которые являются предшественниками гамет взрослой рыбы и других производящих икру водных животных. Клетки PGC образуются на самых ранних стадиях эмбрионального развития. На более поздних стадиях эмбрионального развития PGC мигрируют через эмбрион из их первоначального расположения в область предшественников гонад. В конце их миграции PGC поступают в развивающиеся гонады, колонизируют ткань и начинают процесс гаметогенеза, что приводит к получению зрелых гонад у взрослых

рыб и других производящих икру водных животных.

[0037] Способы раскрытия позволяют получить поколение репродуктивно стерильных (бесплодных) производящих икру водных животных. Стратегия стерилизации специфически нарушает развитие гонад у особей без вредного воздействия на любые 5 другие характеристики, в результате чего получаются абсолютно нормальные, но репродуктивно стерильные производящие икру водные животные.

[0038] На фиг. 1 показана схема способа погружения, согласно вариантам реализации раскрытия. Как показано, соединения доставляют к икре путем погружения неоплодотворенной икры (или предварительно активированной водой икры) или 10 оплодотворенной икры в иммерсионную среду с соединениями, представляющими интерес. Как правило, икру погружают с соединением примерно от 2 до примерно 96 часов или более в зависимости от вида и температуры иммерсионной среды. Введение соединения предпочтительно будет происходить, пока хорион икры является 15 проницаемым. Обработка соединениями, представляющими интерес, приводит к получению эмбрионов на ранней стадии развития, имеющих нарушения развития GnRH или развития PGC. При обработке икры при помощи процесса погружения, полученные в результате взрослые рыбы и другие производящие икру водные животные будут 20 репродуктивно бесплодными или стерильными, как правило, не имеющие фертильных развитых гонад.

[0039] Таким образом, в различных вариантах реализации раскрытие обеспечивает способ эффективного введения соединений в эмбрионы посредством контакта икры с соединениями до оплодотворения или активации водой. Выбранные соединения нарушают развитие клеток GnRH и/или PGC, их миграцию и/или выживание в большинстве эмбрионов, что приводит к крупномасштабному производству 25 репродуктивно стерильной взрослой рыбы и других производящих икру водных животных. Способы раскрытия также применимы к отдельным эмбрионам в мелкосерийном производстве репродуктивно стерильной взрослой рыбы и других производящих икру водных животных.

[0040] Соединения для применения в способах раскрытия могут включать в себя 30 соединения, известные как нарушающие развитие клеток GnRH и/или PGC, их миграцию и/или выживание, и которые способны проникать через хорион предварительно оплодотворенной или предварительно активированной водой икры. В одном из аспектов, такое соединение может представлять собой антисмысловой морфолиновый олигомер, способный 35 нарушать развитие клеток GnRH и/или PGC и способный проходить через хорион икры. Таким образом, антисмысловой морфолиновый олигомер, применяемый в способах раскрытия, представляет собой антисмысловой морфолиновый олигомер, 40 который эффективен для трансфекции икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных.

[0041] Антисмысловой морфолиновый олигомер применяют для временного 45 отключения экспрессии генов путем блокирования трансляции или сплайсинга РНК, который является важным шагом для образования мРНК. Конкретные антисмыловые морфолиновые олигомеры могут быть предназначены для временной блокировки или подавления экспрессии генов, которые необходимы для развития эмбриональных половых клеток, включая, но не ограничиваясь, receptor deadend, nanos, vasa, gnrh или fsh, что приводит к нарушению развития гонад, и, в конечном счете, к получению 45 стерильной рыбы и других производящих икру водных животных.

[0042] Таким образом, в одном аспекте настоящего раскрытия предложен способ получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных,

включающий контакт неоплодотворенной икры или предварительно активированной водой оплодотворенной икры с антисмысловым морфолиновым олигомером, который эффективен для трансфекции икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных. Контакт включает хорионическую трансфекцию икры.

- 5 [0043] В таком аспекте раскрытие относится к способам получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных путем введения эффективных морфолиновых олигомеров в икру для нарушения развития примордиальных половых клеток (PGC), а также их миграции и колонизации в гонадах эмбриона, что приводит к невозможности развития гонад и/или нарушению полного и надлежащего
- 10 функционирования гонад на клеточном или тканевом уровне, и, в конечном счете, к получению стерильной рыбы.

[0044] Dead end (dnd) является специфическим компонентом зародышевой плазмы (germ plasm) и гранулах половых клеток (germ-cell granules) у позвоночных, который имеет важное значение для развития половых клеток у некоторых рыб. Ген dnd

15 специфично экспрессируется в зародышевой плазме (germ plasm) и примордиальных половых клетках. Поскольку считается, что dnd необходим для нормальной миграции и выживания клеток PGC, эмбрионы, лишенные данного белка, развиваются в стерильных взрослых особей.

[0045] Описанные способы могут быть использованы для получения репродуктивно

20 стерильной рыбы и других производящих икру водных животных для аквакультуры, аквариумистики и контроля инвазивных видов. В одном из аспектов способы включают в себя нарушение развития гонад посредством введения в предварительно оплодотворенную или предварительно активированную водой икру антисмылового морфолинового олигомера к мРНК dead end (dnd-MO) или других генов, которые имеют

25 важное значение для развития гонад, включая, но не ограничиваясь, рецептор nanos, vasa, gnrh или fsh. Действие dnd-MO или другого антисмылового морфолинового олигомера против генов, которые имеют важное значение для развития гонад, приводит к нарушению развития фертильных гонад и получению стерильной взрослой рыбы.

[0046] В вариантах реализации dnd-MO способен временно подавлять экспрессию

30 белка dead end, который имеет важное значение для развития эмбриональных половых клеток.

[0047] Настоящее раскрытие также относится к специфическим последовательностям морфолиновых олигомеров для применения в способах подавления экспрессии гена dead end у рыб.

35 [0048] На фиг. 2 представлена блок-схема производства репродуктивно стерильной рыбы путем введения специфических морфолиновых олигомеров к мРНК dead end лососевых, мороновых или цихлид для нарушения развития примордиальных половых клеток (PGC), что приводит к невозможности развития гонад, и, в конечном счете, к получению стерильной рыбы. Если икру не обрабатывали морфолиновыми олигомерами,

40 из нее можно получить фертильное маточное стадо.

[0049] Как показано на фиг. 2, икру лососевых, мороновых или цихлид, или других видов рыб, можно приводить в контакт с морфолиновыми олигомерами к генам dead end соответствующих видов рыб. На фиг. 2 проиллюстрировано введение специфических морфолиновых олигомеров к генам dead end лососевых, мороновых или цихлид.

45 Альтернативно, икру можно не подвергать никакой обработке. Было показано, что при контакте неоплодотворенной икры с морфолиновыми олигомерами, олигомеры подавляют или блокируют трансляцию белка dead end, что приводит к нарушению развития PGC. Вследствие этого взрослые лососевые, мороновые или цихлиды являются

бесплодными из-за развития не фертильных гонад. Если допускается нормальное развитие PGC, то рыба будет иметь нормальные фертильные гонады и рыбу можно использовать в качестве маточного стада.

[0050] Таким образом, в вариантах реализации антисмыловые морфолиновые

5 олигомеры способны эффективно подавлять экспрессию по меньшей мере одного гена dead end Salmonidae, гена dead end Moronidae или гена dead end Cichlidae.

[0051] В другом аспекте раскрытие относится к идентификации специфических последовательностей морфолиновых олигомеров, которые можно применять для временного подавления экспрессии специфических генов, которые необходимы для

10 развития половых клеток. В другом аспекте раскрытие относится к специфическим антисмыловым морфолиновым олигомерам, которые способны временно и эффективно подавлять трансляцию dead end, который является необходимым белком для выживания половых клеток, и специфически нарушать развитие гонад, что приводит к получению бесплодной рыбы, например, лососевых (семги и форелей), мороновых (окуней) и цихлид (тилапии и декоративных цихлид).

15 [0052] В другом аспекте раскрытие относится к специфическому морфолиновому олигомеру 5'-CTGACTTGAACGCTCCTCCATTATC-3' (SEQ ID №: 1) и его вариантам, например, 5'-ACTTGAACGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID №: 2), которые способны временно и эффективно подавлять экспрессию гена dead end Salmonidae, что приводит к 20 невозможности развития гонад и/или нарушению полного и надлежащего функционирования гонад, и, в конечном счете, к получению стерильных лососевых. Соответственно, способы раскрытия применимы ко всем лососевым, включая, но не ограничиваясь, атлантического лосося, кижуча, чавычу, кету, нерку, горбушу и симу, 25 радужную форель, речную форель и озерную форель, обыкновенного и сибирского хариуса, арктического гольца среди прочих.

[0053] В другом аспекте раскрытие относится к специфическому морфолиновому олигомеру, 5'-GGCTCTGCTTGCTCTCCATCATCTC-3' (SEQ ID №: 3) и его вариантам, которые способны временно и эффективно подавлять экспрессию гена dead end 30 Moronidae, что приводит к невозможности развития гонад и/или нарушению полного и надлежащего функционирования гонад, и, в конечном счете, к получению стерильных мороновых. Соответственно, способы раскрытия применимы ко всем мороновым, включая, но не ограничиваясь, полосатого окуня, белого окуня (white bass), гибридов полосатого и белого окуня, желтого окуня (yellow bass), белого окуня (white perch), 35 желтого окуня (yellow perch), речного окуня и гибридов окуней среди прочих.

[0054] В другом аспекте раскрытие относится к специфическому морфолиновому олигомеру, 5'-CTGGCTTGCGTGTTCATCGTC-3' (SEQ ID №: 4) и его вариантам, которые способны временно и эффективно подавлять экспрессию гена dead end Cichlidae, что приводит к невозможности развития гонад и/или нарушению полного и надлежащего 40 функционирования гонад, и, в конечном счете, к получению стерильных цихлид. Соответственно, способы раскрытия применимы ко всем видам цихлид и тиляпии, включая, но не ограничиваясь, нильскую тиляпию, голубую тиляпию (blue tilapia), гибриды голубой и нильской тиляпии, мозамбикскую тиляпию, и другие съедобные и декоративные виды цихлид и их гибриды.

45 [0055] Морфолиновые олигомеры могут представлять собой варианты перечисленных последовательностей. Данные варианты могут включать в себя, но не ограничиваться, другие модифицированные нуклеиновые кислоты и другие морфолиновые олигомеры, которые полностью или частично охватывают последовательности, перечисленные

выше. В частности, включены антисмыловые олигомеры, которые содержат, в основном состоят или состоят из одной или более SEQ ID №:1, 3 и 4. Также включены варианты этих антисмыловых олигомеров, включая варианты олигомеров, имеющие 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, или 99% (включая все целые промежуточные числа)

5 идентичности последовательности или гомологии последовательности по отношению к любой SEQ ID №: 1, 3 и 4, и/или их вариантам, которые отличаются от этих последовательностей примерно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, предпочтительно к вариантам, которые являются эффективными в репродуктивной стерилизации рыбы при контакте с икрой рыбы. SEQ ID №:2 является предпочтительным 10 вариантом SEQ ID №: 1.

[0056] Варианты, которые являются эффективными для репродуктивной стерилизации рыбы при контакте с икрой рыбы, используемые в таком контексте, означают применение вариантов в способах, раскрытых в настоящем документе, которые приведут к получению репродуктивно стерильный рыбы. В вариантах реализации варианты 15 будут эффективно подавлять экспрессию гена dead end, представляющего интерес.

[0057] В соответствии с вариантами реализации способов раскрытия неоплодотворенную икру рыбы (одно или более яиц) погружают в иммерсионную среду, содержащую антисмыловой морфолиновый олигомер, способный эффективно подавлять экспрессию гена dead end у рыб, представляющих интерес. Концентрация 20 антисмылового морфолинового олигомера в емкости должна быть достаточной, чтобы позволить антисмыловому морфолиновому олигомеру проникнуть через хорион икры рыбы, эффективно трансфекции икру. В вариантах реализации такая концентрация обычно составляет примерно от 1 до примерно 20, более предпочтительно, примерно от 3 до примерно 15 μ M, и еще более предпочтительно, примерно от 5 до примерно 10 25 μ M.

[0058] Иммерсионная среда представляет собой водную среду, которая может дополнительно содержать овариальную жидкость рыб или разбавитель оплодотворяющей жидкости, который содержит соли, Трис (pH 7-9), глицин и/или от 0 до 30% сыворотки и ингибиторов протеаз, таких как апратинин или лейпептин.

[0059] Хотя время, необходимое для погружения неоплодотворенной икры или 30 предварительно активированной водой оплодотворенной икры, для получения удовлетворительной стерилизации рыбы и других производящих икру водных животных, будет зависеть от вида рыбы и других производящих икру водных животных, как правило, икру рыбы или другую икру погружают в иммерсионную среду, содержащую 35 морфолиновый олигомер, в течение примерно от 2 до примерно 96 часов, более предпочтительно примерно от 4 до примерно 72 часов, и еще более предпочтительно примерно от 5 до примерно 48 часов.

[0060] Настоящее раскрытие также относится к способам получения репродуктивно стерильной рыбы и других производящих икру водных животных для аквакультуры, 40 аквариумистики и контроля инвазивных видов, при этом способы включают в себя нарушение развития гонад посредством введения в икру или эмбрионы соединений, конъюгированных с молекулой-переносчиком, с помощью которой соединения способны трансфектировать икру, т.е. достигать и проникать в неоплодотворенную икру или эмбрионы. Действие соединений внутри икры или эмбрионов приводит к нарушению 45 развития фертильных гонад и, в конечном счете, получению стерильной взрослой рыбы и других производящих икру водных животных. Молекула-переносчик способна эффективно транспортировать соединения, конъюгированные с ней, через микроскопические каналы и поры, тем самым позволяя химическим веществам,

лекарственным средствам, пептидам и т.д., проходить через хорион и проникать икру или эмбрион и достигать целевой ткани. Таким образом, с помощью этих способов неоплодотворенную или оплодотворенную икру можно эффективно приводить в контакт с морфолиновыми олигомерами (или другими биологически предпочтительными соединениями) для получения репродуктивно стерильной рыбы и других производящих икру водных животных.

[0061] В одном из аспектов раскрытие относится к способам получения репродуктивно стерильной рыбы и других производящих икру водных животных посредством введения соединений, конъюгированных с молекулой-переносчиком, в неоплодотворенную икру или эмбрионы для нарушения развития гонадотропин-высвобождающих гормон (GnRH) клеток и/или развития примордиальных половых клеток (PGC) и их миграции и колонизации в гонадах эмбриона, что приводит к невозможности развития гонад и/или нарушению полного и надлежащего функционирования гонад на клеточном или тканевом уровне, и, в конечном счете, к получению стерильной рыбы и других производящих икру водных животных.

[0062] Молекула-переносчик может представлять собой любое соединение, способное к конъюгации с морфолиновым олигомером для доставки морфолинового олигомера в икру или эмбрионы.

[0063] В одном из аспектов раскрытие относится к молекуле-переносчику, содержащей дендримерный олигогуанидин с триазиновым ядром, например такого типа, как описано в патенте США №7935816. Такая молекула-переносчик может представлять собой октагуанидиновый дендример с триазиновым ядром, также известная в данной области техники как "Vivo". Раскрытие патента США №7935816 включено в настоящий документ посредством ссылки в соответствующем объеме.

[0064] Иллюстративный октагуанидиновый дендример-переносчик с морфолином, как пример биоактивного вещества, показан на следующем конъюгате:

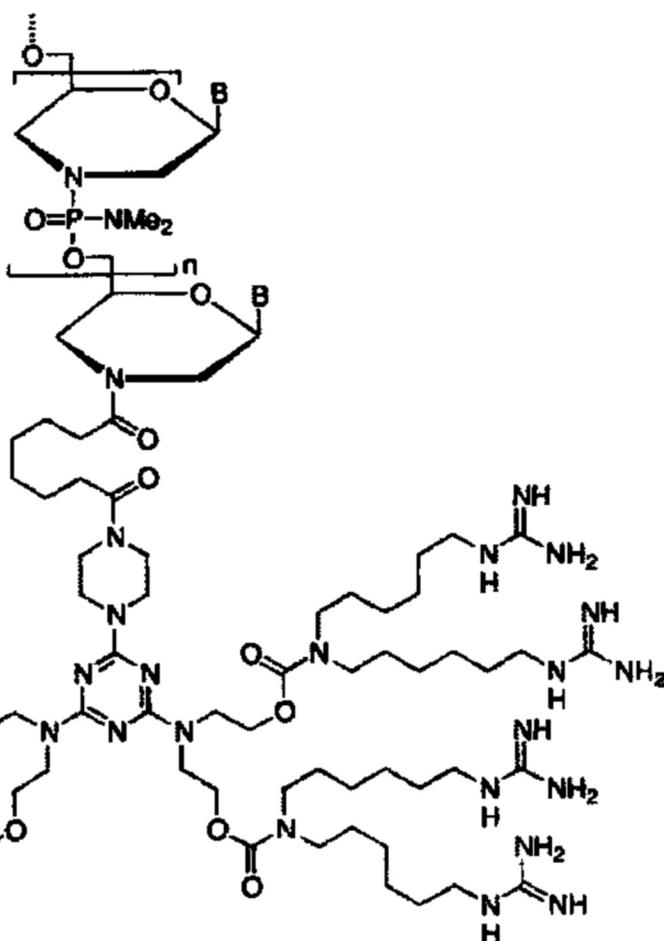
30

35

40

45

5



20

25

[0065] Конкретный предшественник соединения-переносчика, который является пригодным для применения с морфолиновыми олигомерами согласно раскрытию, представляет собой 2-[(4-нитрофенил)оксикарбонилгексаметиленкарбонилпиперазинил]-4,6-бис{ди-[ди(трифторацетамидогексил)аминокарбонилоксиэтил]амино}триазин.

30

[0066] Раскрытие также относится к применению октагуанидинового дендримера с триазиновым ядром в качестве молекулы-переносчика для переноса крупных биологически активных молекул или биологически предпочтительных соединений через хорион икры. Такая молекула-переносчик эффективна для хорионического переноса конъюгата молекулы-переносчика и морфолинового олигомера.

35

[0067] В другом аспекте раскрытия предложены способы для доставки соединений в икру производящих икру водных животных, включающие контакт неоплодотворенной или предварительно активированной водой икры с по меньшей мере одним биологически предпочтительным соединением. В соответствии с этими способами неоплодотворенная или предварительно активированная водой икра является достаточно проницаемой для эффективного поглощения по меньшей мере одного биологически предпочтительного соединения. Термин "эффективное поглощение", применяемый в настоящем документе, означает, что биологически предпочтительное соединение будет эффективно для оказания благотворного влияния, которое подразумевается его применением. Биологически предпочтительное соединение может быть выбрано из группы, состоящей из антител, белков, пептидов, РНК и ДНК.

45

[0068] В вариантах реализации биологически предпочтительное соединение будет предложено в виде конъюгата биологически предпочтительного соединения и молекулы-переносчика, содержащей октагуанидиновый дендример, содержащий фрагмент

триазинового ядра. В этих вариантах реализации молекула-переносчик эффективна для хорионического переноса биологически предпочтительного соединения, таким образом, что контакт включает хорионическую трансфекцию икры. Биологически предпочтительное соединение в вариантах реализации предложено в виде конъюгата и представляет собой соединение, которое может образовывать конъюгат с молекулой-переносчиком, содержащей октагуанидиновый дендример, содержащий фрагмент триазинового ядра. Биологически предпочтительное соединение может быть выбрано из группы, состоящей из антител, белков, пептидов, РНК и ДНК.

[0069] В другом аспекте раскрытия предложен способ получения репродуктивно

10 стерильных производящих икру водных животных, при этом указанный способ включает контакт неоплодотворенной икры или предварительно активированной водой оплодотворенной икры с антисмысловым морфолиновым олигомером, который эффективен для трансфекции икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных, при этом указанный антисмыловой морфолиновый 15 олигомер конъюгирован с молекулой-переносчиком, эффективной для хорионического переноса конъюгата.

[0070] В другом аспекте раскрытия предусмотрен способ получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных, при этом указанный способ включает контакт оплодотворенной икры (или эмбрионов) с антисмыловым морфолиновым 20 олигомером, конъюгированным с молекулой-переносчиком, который эффективен для трансфекции икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных.

[0071] Выбранные олигомеры могут нарушать развитие клеток GnRH и/или PGC, миграцию и/или выживание в большинстве эмбрионов, что приводит к

25 крупномасштабному получению репродуктивно стерильной взрослой рыбы и других производящих икру водных животных. Способы раскрытия также применимы к отдельным эмбрионам в мелкосерийном производстве репродуктивно стерильной взрослой рыбы и других производящих икру водных животных.

[0072] В вариантах реализации способы включают получение и использование

30 молекулы-переносчика, конъюгированной с антисмыловым морфолиновым олигомером, способным эффективно подавлять экспрессию *dnd*, *nanos* или *vasa* у видов рыб и других производящих икру водных животных. В других вариантах реализации антисмыловой морфолиновый олигомер способен эффективно подавлять экспрессию по меньшей мере одного гена *dead end* *Salmonidae*, гена *dead end* *Moronidae* или гена *dead 35 end* цихлид. В еще одних вариантах реализации антисмыловой морфолиновый олигомер представляет собой SEQ ID №: 1, SEQ ID №: 2, SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 4 или их варианты, которые способны эффективно подавлять экспрессию *dead end* у видов рыб.

[0073] В одном варианте реализации предложен способ получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных, включающий погружение

40 неоплодотворенной или оплодотворенной икры рыбы в иммерсионную среду, содержащую конъюгат молекулы-переносчика и антисмылового морфолинового олигомера, способного эффективно подавлять экспрессию гена *dead end* или других генов, таких как гены рецептора *nanos*, *vasa*, *gnrh* или *fsh*, которые необходимы для развития гонад у рыб и других производящих икру водных животных. Предпочтительно, 45 молекула-переносчик представляет собой октагуанидиновый дендример с триазиновым ядром.

[0074] В соответствии с конкретными аспектами способов раскрытия неоплодотворенную икру или предварительно активированную водой икру (одно или

более яиц) погружают в водную среду, содержащую антисмысловой морфолиновый олигомер или антисмыловой морфолиновый олигомер, конъюгированный с молекулой-переносчиком, способный эффективно подавлять экспрессию гена *dead end* или других генов, которые необходимы для развития гонад у рыб и других производящих икру

5 водных животных. Концентрация антисмылового морфолинового олигомера в емкости должна быть достаточной, чтобы позволить антисмыловому морфолиновому олигомеру, конъюгированному с молекулой-переносчиком, проникнуть через хорион икры. В вариантах реализации такая концентрация обычно составляет примерно от 1 до примерно 20 μM , более предпочтительно примерно от 3 до примерно 15 μM , еще

10 более предпочтительно примерно от 5 до примерно 10 μM .

[0075] Альтернативно, раскрытие предполагает способ получения репродуктивно стерильных производящих икру водных животных, при этом указанный способ включает контакт оплодотворенной икры с антисмыловым морфолиновым олигомером, конъюгированным с молекулой-переносчиком, который эффективен для трансфекции

15 оплодотворенной икры и превращения особи(ей), полученных из нее, в репродуктивно стерильных. Контакт включает хорионическую трансфекцию икры.

[0076] В вариантах реализации данных способов оплодотворенную икру (эмбрионы) обрабатывают путем погружения в иммерсионную среду, содержащую антисмыловой морфолиновый олигомер, конъюгированный с молекулой-переносчиком, способный

20 эффективно подавлять экспрессию гена *dead end* или других генов, которые необходимы для развития гонад у рыб и других производящих икру водных животных, представляющих интерес. Концентрация антисмылового морфолинового олигомера в емкости должна быть достаточной, чтобы позволить антисмыловому морфолиновому олигомеру, конъюгированному с молекулой-переносчиком, проникнуть через хорион

25 оплодотворенной икры. Такая концентрация будет выше, чем то количество, необходимое для погружения неоплодотворенной икры рыбы, поскольку, после оплодотворения и активации водой, хорион икры становится непроницаемым, что затрудняет проникновение в яйцеклетку. Как правило, концентрация в емкости для

30 погружения эмбрионов составляет примерно от 20 до примерно 80 μM , предпочтительно примерно от 40 до примерно 60 μM .

[0077] В вариантах реализации обработки оплодотворенной икры антисмыловой морфолиновый олигомер способен эффективно подавлять экспрессию по меньшей мере одного гена *dead end* *Salmonidae*, гена *dead end* *Moronidae* или гена *dead end* цихлид. В еще одних вариантах реализации антисмыловой морфолиновый олигомер

35 представляет собой SEQ ID №: 1, SEQ ID №: 2, SEQ ID №: 3, SEQ ID №: 4 или их варианты, которые способны эффективно подавлять экспрессию гена *dead end* у видов рыб и других производящих икру водных животных.

[0078] В другом аспекте раскрытия предложена композиция, эффективная для

нарушения миграции примордиальных половых клеток у рыб, содержащая

40 антисмыловой морфолиновый олигомер, выбранный из SEQ ID №: 1, SEQ ID №: 3 и SEQ ID №: 4 или их вариантов, таких как SEQ ID №: 2, которые способны эффективно подавлять экспрессию гена *dead end* у рыб. В таком аспекте предложена композиция для обработки икры рыбы для превращения рыб, полученных из нее, в репродуктивно

стерильных, содержащая антисмыловой морфолиновый олигомер, содержащий

45 олигомер, выбранный из группы, состоящей из олигомеров SEQ ID №: 1-4 и их вариантов, которые эффективны для репродуктивной стерилизации рыбы при контакте с икрой рыбы. Данную композицию морфолинового олигомера предпочтительно применяют для обработки неоплодотворенной икры рыбы.

[0079] Раскрытие также относится к новому соединению, которое способно специфически нарушать развитие гонад, что приводит к получению бесплодной рыбы. Новое соединение содержит октагуаниновый дендример-переносчик, конъюгированный с морфолиновым антисмысловым олигомером, который эффективно подавляет трансляцию mRNK dead end, т.е. белка, необходимого для выживания половых клеток. Такой конъюгат можно применять для обработки неоплодотворенной или предварительно активированной водой икры или для обработки оплодотворенной икры.

[0080] Такие конъюгированные соединения можно применять для производства

стерильных рыб и других производящих икру водных животных. Соединения с морфолиновым олигомером могут быть конъюгированы с молекулой-переносчиком для эффективного проникновения через хорион и введения в эмбрионы. Следовательно, соединения могут специфически нарушать развитие гонад, что приводит к получению бесплодных рыб и других производящих икру водных животных. Предпочтительно, что молекула-переносчик содержит октагуаниновый дендример с триазиновым ядром и олигомер содержит антисмыловый морфолиновый олигомер, выбранный из SEQ ID №: 1, SEQ ID №: 3 и SEQ ID №: 4 или любых их вариантов, которые эффективны для репродуктивной стерилизации рыбы при контакте с икрой рыбы, такие как SEQ ID №: 2.

[0081] Понятно, что контакт икры и/или эмбрионов с соединениями, конъюгатами и композициями согласно настоящему раскрытию можно осуществлять любым подходящим способом, например, с применением контакта путем погружения, или, альтернативно, путем контакта, не связанного с погружением, хотя следует признать, что контакт путем погружения обеспечивает продуктивную и эффективную технику контакта, которая пригодна для крупномасштабных операций по производству репродуктивно стерильной рыбы и водных животных. Методики контакта без погружения, которые можно применять в широкой практике настоящего раскрытия, включают без ограничения, спреи или способы капельного контакта, способы сухого переноса, в которых икра контактирует с носителем или поверхностью, покрытой или иным образом поддерживающей любое из соединений, конъюгатов или композиций согласно настоящему раскрытию, которые эффективны для производства репродуктивно стерильной рыбы, или другие техники, с помощью которых икра и/или эмбрионы контактируют с соединениями, конъюгатами и/или композициями согласно настоящему раскрытию. Контакт предпочтительно включает неинъекционный контакт.

[0082] Преимущества и особенности раскрытия дополнительно проиллюстрированы со ссылкой на следующие примеры, которые не следует рассматривать как каким-либо образом ограничивающие объем раскрытия, а скорее в качестве иллюстрации частных вариантов реализации раскрытия в их специфических практических применениях.

[0083] Пример 1:

[0084] Данио-рерио (zebrafish) выбраны для первоначальной иллюстрации способов раскрытия из-за короткого времени генерации и большого количества эмбрионов, получаемых при спаривании, которые легко получать ежедневно или еженедельно. Кроме того, эмбрионы данио-рерио прозрачные, обеспечивая тем самым легкое визуальное наблюдение, а также они являются выносливыми. Нормальное развитие клеток GnRH, PGC и гонад в эмбрионе представляет собой эволюционно консервативный механизм, который встречается у всех рыб. Соответственно, способы раскрытия применимы ко всем видам рыб, включая, но не ограничиваясь, данио-рерио, виды карпа, виды форели, виды лососей, лещей (включая морских карасей и спаровых),

окуней (basses) (включая морского и пресноводного окуня и гибридов окуней и т.д.), окуней (perches) (белый окунь, желтый окунь и т.д.), виды сомов, трески и другие основные классы, которые являются перспективными для разведения в неволе.

[0085] Vivo и dnd-MO

[0086] Молекула-переносчик представляет собой дендримерный октагуанидин с триазиновым ядром, которая также известна как Vivo, конъюгирована с dnd-MO данио-перио, **5'-GCTGGGCATCCATGTCTCCGACCAT-3'** (SEQ ID №5) (zfdnd-MO-Vivo) и применяется в иммерсионной среде, содержащей эмбрионы данио-перио в воде. После 3-часового погружения с 20 μ M zfdnd-MO-Vivo были обнаружены неохарактеризованные агрегаты вокруг внутренней части хориона или поверхности бластодиска эмбрионов (фиг. 3А). Появилось больше агрегатов после 5-часового погружения (фиг. 3В). Данные агрегаты не были обнаружены в неконъюгированных контрольных группах, которые погружали с 20 μ M zfdnd-MO на 3 (фиг. 3С) или 5 (фиг. 3Д) часов. Результаты показали, что конъюгация антисмысловых морфолиновых олигомеров с Vivo обеспечивает способность конъюгированного соединения действовать на хорион, что приводит к образованию агрегатов.

[0087] Через 2 дня после оплодотворения, исследование при помощи флуоресцентной микроскопии показало, что половые клетки в эмбрионах, которых погружали в 40 или 60 μ M zfdnd-MO-Vivo, неправильно мигрировали и дифференцировались в другие типы клеток (фиг. 4А, фиг. 4В). Как было показано, dnd-MO-Vivo данио-перио нарушает развитие половых клеток данио-перио. На фиг. 4А показано, что у контрольных рыб половые клетки мигрировали в область гонад и сохранили свою морфологию (клетки круглой формы). На фиг. 4В показано, что обработка zfdnd-MO-Vivo вызвала неправильную миграцию половых клеток и в итоге дифференцировку в другие типы клеток.

[0088] Пример 2:

[0089] Данио-перио, обработанные в примере 1, исследовали после превращения во взрослую рыбу. Погружение эмбрионов данио-перио в емкости с 40 или 60 μ M zfdnd-MO-vivo позволяло эффективно индуцировать 100% стерильность у особей, обработанных в оптимальных условиях, как показано на фиг. 8, не затрагивая другие физиологические особенности рыб (фиг. 5). Как показано на фиг. 5, обработанные dnd-MO-Vivo эмбрионы данио-перио развивались в бесплодных взрослых самцов. На фиг. 5А показано отсутствие видимой разницы во внешнем виде или общем размере между обработанной взрослой рыбой и самцами дикого типа. На фиг. 5В показано отсутствие существенной разницы в массе тела 3-месячной рыбы (n=12 методом случайной выборки) среди рыбы, обработанной zfdwd-MO-Vivo, и необработанными самцами дикого типа.

[0090] В дополнительных экспериментах способы раскрытия успешно применяли к данио-перио и продолжительность погружения была уменьшена от 5 до 6 часов без влияния на эффективность стерильности (фиг. 6, фиг. 7 и фиг. 8). На фиг. 6 показано, что zfdnd-MO-Vivo вызвал стерильность у данио-перио. Исследование гонадной ткани показало (A) хорошо развитые семенники у необработанных самцов рыбы. (B) Хорошо развитые яичники у необработанных самок рыбы. (C) Гонады рыбы, обработанной zfdnd-MO-Vivo, развились в тонкую нитеподобную ткань. На микрофотографиях (D-F) показан (D) активный сперматогенез в семенниках у необработанных самцов рыбы. (E) Хорошо развитые яичники у необработанных самок рыбы с ооцитами на разных стадиях развития. (F) Гонады обработанной рыбы, по-видимому, недостаточно развиты и окружены большим количеством адипоцитов без развитой структуры гонад или половых клеток.

[0091] Как показано на фиг. 7 и фиг. 8, эмбрионы данио-перио, обработанные dnd-MO-Vivo, развивались в бесплодных взрослых особей. В обоих случаях погружения А) 24 часа и В) от 5 до 6 часов, все эмбрионы, которые первоначально погружали с 60 или 40 μ M zfdnd-MO-Vivo, сразу после оплодотворения развились в бесплодных рыб.

5 [0092] Пример 3:

[0093] С целью непрерывной оптимизации технологии, погружение в емкости проводили с использованием неоплодотворенной икры, так как проницаемость хориона постепенно уменьшается после оплодотворения и активации водой. Результаты показали, что когда икру погружали с 40 μ M меченый флуоресцеином zfdnd-MO (dnd-MO-Flu),

10 неоплодотворенная икра поглотила больше dnd-MO-Flu, чем икра активированная водой за 1 час до погружения (фиг. 9). Как показано на фиг. 9, икра более проницаема до активации водой. При 5-часовом погружении с 40 μ M zfdnd-MO-Flu, А) неоплодотворенная икра поглотила больше zfdnd-MO-Flu (более сильная зеленая флуоресценция), чем В) икра, предварительно активированная водой.

15 [0094] Пример 4:

[0095] При погружении предварительно оплодотворенной лососевой (форели) икры с лососевыми dnd-MO +dnd-MO-Vivo (Ssdnd-MO +Ssdnd-MO-Vivo), половые клетки были устраниены (фиг. 10), на что указывает отсутствие экспрессии специфического маркера половых клеток гена vasa. Как показано на фиг. 10, лососевую (форели) икру погружали 20 с лососевым dnd-MO, где А: контроль; В: 10 μ M Ssdnd-MO; С: 10 μ M Ssdnd-MO +1 μ M Ssdnd-MO-Vivo; D: 10 μ M Ssdnd-MO +2 μ M Ssdnd-MO-Vivo на 48 часов до оплодотворения. Вскоре после вылупления среднюю часть тела вырезали и использовали для экстракции РНК и для ОТ-ПЦР определения экспрессии vasa. Одна рыба из группы С и одна из группы D, по-видимому, имела очень низкую экспрессию vasa, что указывает на 25 возможное влияние на снижение численности половых клеток. ОТ: обратная транскрипция.

[0096] Как описано в настоящем документе, способы в целом применимы к искусственно выращиваемым рыбам и производящим икру водным животным, поскольку желательно производство стерильных искусственно выращиваемых видов. 30 Соответственно, способы настоящего изобретения применимы к любым искусственно выращиваемым видам рыб и производящим икру водным животным, в частности, к коммерчески важным культивируемым видам.

[0097] Хотя раскрытие было изложено в настоящем документе посредством ссылки на конкретные аспекты, особенности и иллюстративные варианты реализации, следует 35 принять во внимание, что полезность раскрытия таким образом не ограничена, а скорее распространяется и охватывает другие многочисленные варианты, модификации и альтернативные варианты реализации, как будет понятно специалистам в области настоящего раскрытия на основе описания в данном документе. Соответственно, изобретение, как далее указано в формуле изобретения, предполагает широкое 40 толкование и интерпретацию, как включающее в себя все такие варианты, модификации и альтернативные варианты реализации в пределах его сущности и объема.

ПРОМЫШЛЕННОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

[0098] Способы и соединения раскрытия приводят к получению репродуктивно стерильной рыбы и производящих икру водных животных. Стерилизация 45 (индуцированное бесплодие) искусственно выращиваемой рыбы и производящих икру водных животных повышает их скорость роста за счет увеличения превращения энергии пищи в рост мышечной массы вместо развития гонад. Кроме того, при попадании из аквакультуры в окружающую среду репродуктивно стерильной искусственно

выращенной рыбы и производящих икру водных животных, включая одомашненные, неаборигенные или генетически модифицированные виды, они не смогут размножаться или скрещиваться с дикой популяцией. Это способствует биологическому сдерживанию и предотвращению генетического загрязнения диких популяций и/или приживаемости 5 в дикой природе одомашненной, неаборигенной или генетически модифицированной искусственно выращиваемой рыбы и производящих икру водных животных.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЮНИВЕРСИТИ ОФ МЭРИЛЕНД БАЛТИМОР КАУНТИ

10 <120> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕСПЛОДНОЙ РЫБЫ И БЕСПЛОДНЫХ ПРОИЗВОДЯЩИХ ИКРУ ВОДНЫХ ЖИВОТНЫХ И СПОСОБ ДОСТАВКИ СОЕДИНЕНИЙ В ИКРУ И ЭМБРИОНЫ

<130> 4451-267-РСТ

<140> Not yet assigned

<141> 2014-11-14

<150> US 61/904,652

15 <151> 2013-11-15

<150> US 61/968,458

<151> 2014-03-21

<150> US 62/050,815

<151> 2014-09-16

20 <160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

25 <213> *Salmo salar*

<400> 1

ctgacttgaa cgctcctcca ttatc

25

<210> 2

<211> 18

30 <212> DNA

<213> *Salmo salar*

<400> 2

acttgaacgc tcctccat

18

<210> 3

35 <211> 25

<212> DNA

<213> *Morone saxatilis*

<400> 3

ggctctgctt gctctccatc atctc

25

40 <210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> *Oreochromi niloticus*

<400> 4

45 ctggctttgc gtgtttccca tcgtc

25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

```

<213> Danio rerio
<400> 5
gctggggcatc catgtctccg accat

```

25

5 (57) Формула изобретения

1. Способ модификации икры рыбы для превращения рыбы, полученной из нее, в репродуктивно стерильную, при этом способ включает в себя погружение неоплодотворенной икры рыбы, предварительно активированной водой оплодотворенной икры или оплодотворенной икры рыбы в иммерсионную среду, содержащую антисмысловой морфолиновый олигомер, который подавляет экспрессию гена рецептора *dead end y* рыбы, и при этом указанный антисмысловой морфолиновый олигомер конъюгирован с молекулой-переносчиком, представляющей собой октагуанидиновый дендример с триазиновым ядром.

10 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная икра представляет собой неоплодотворенную икру или предварительно активированную водой оплодотворенную икру.

15 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная икра представляет собой оплодотворенную икру.

4. Способ по одному из пп. 1-3, отличающийся тем, что ген *dead end* содержит по 20 меньшей мере из генов *dead end* *Salmonidae*, *Moronidae* и *Cichlidae*.

5. Способ по одному из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный антисмысловой морфолиновый олигомер содержит олигомер, выбранный из группы, состоящей из олигомеров SEQ ID NO: 1-4 и их вариантов, которые эффективны для репродуктивной стерилизации рыбы при контакте с икрой рыбы.

25 6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что антисмысловой морфолиновый олигомер содержит олигомер, выбранный из группы, состоящей из олигомеров SEQ ID NO: 1-4.

7. Способ по одному из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанная молекула-переносчик содержит 2-[(4-нитрофенил)оксикарбонил гексаметиленкарбонилпiperазинил]-4,6-бис{ди[ди(трифторацетамидогексил)-амино карбонилоксиэтил]амино}триазин.

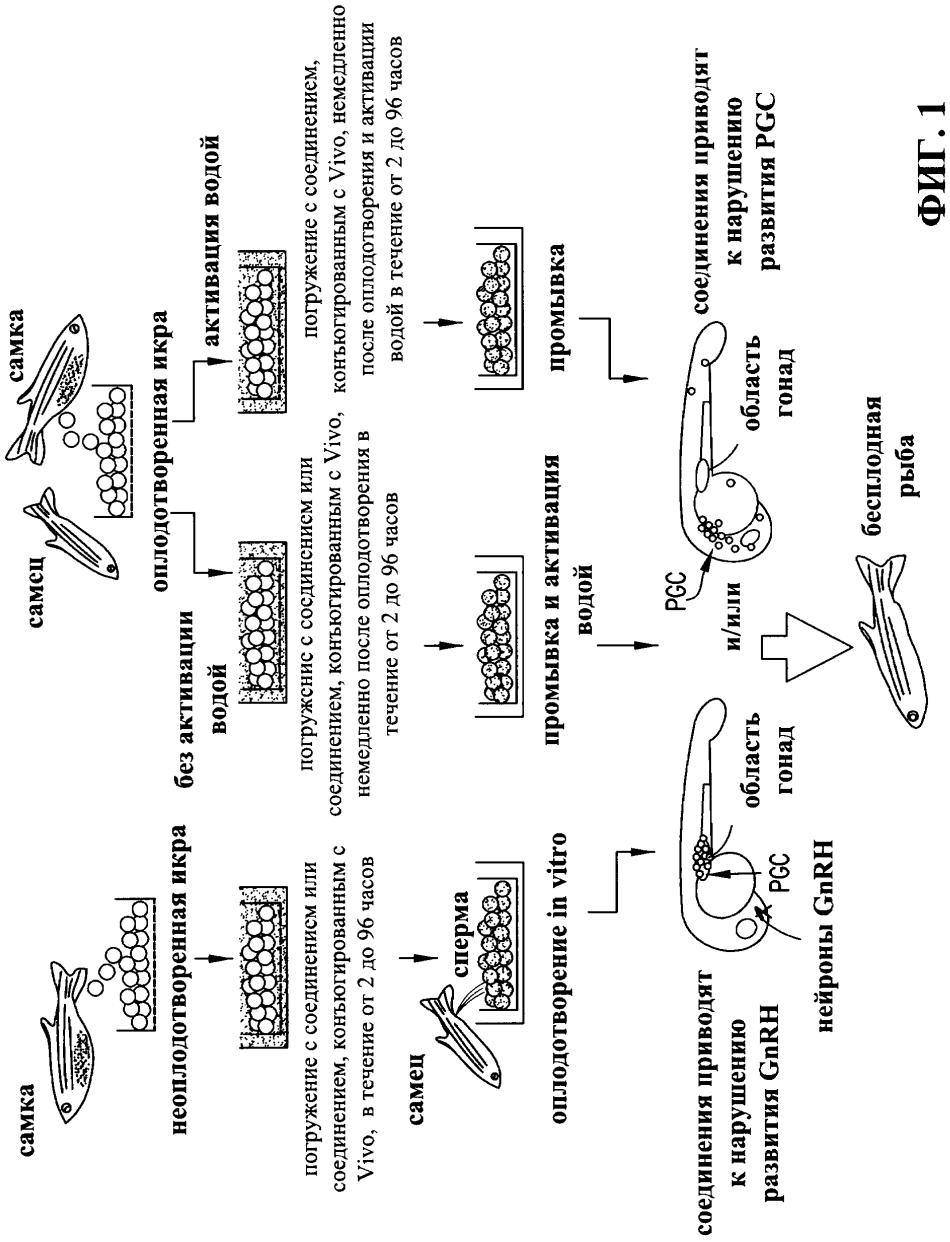
30 8. Композиция для обработки икры рыбы для превращения рыбы, полученной из нее, в репродуктивно стерильную, содержащая в эффективном количестве антисмысловой морфолиновый олигомер, конъюгированный с молекулой-носителем, представляющей собой октагуанидиновый дендример с триазиновым ядром, при этом указанный антисмысловой морфолиновый олигомер подавляет трансляцию гена *dead end y* рыбы.

35 9. Композиция п. 8, отличающаяся тем, что антисмысловой морфолиновый олигомер содержит олигомер, выбранный из группы, состоящей из олигомеров SEQ ID NO: 1-4 и их вариантов, которые эффективны для репродуктивной стерилизации рыбы при контакте с икрой рыбы.

40 10. Композиция по п. 8 или 9, дополнительно содержащая водную среду.

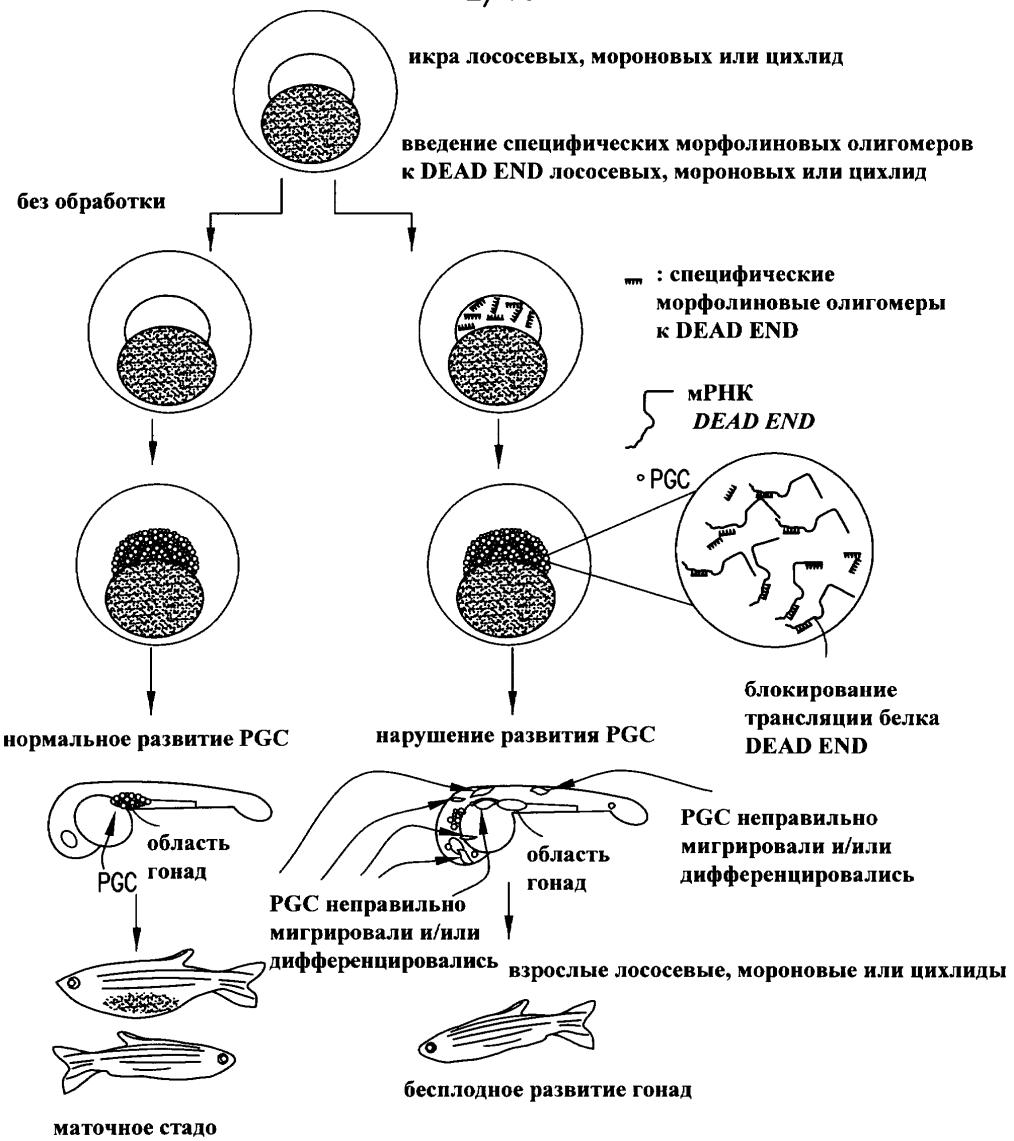
11. Композиция по одному из пп. 8-10, отличающаяся тем, что указанный антисмысловой морфолиновый олигомер содержит олигомер, выбранный из группы, состоящей из олигомеров SEQ ID NO: 1-4.

45 12. Композиция по пп. 8-11, отличающаяся тем, что молекула-переносчик представляет собой 2-[(4-нитрофенил)оксикарбонил гексаметиленкарбонилпiperазинил]-4,6-бис{ди[ди(трифторацетамидогексил)-амино карбонилоксиэтил]амино}триазин.



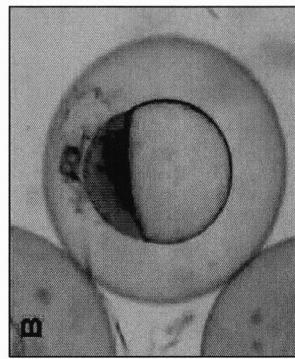
ФИЛ · 1

2/10

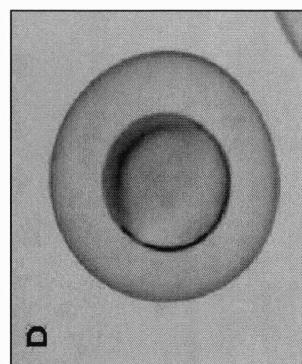


ФИГ. 2

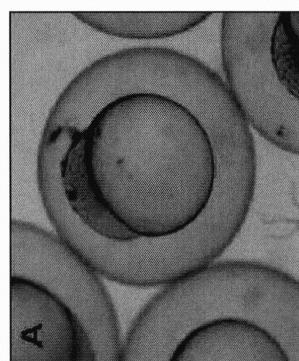
3/10



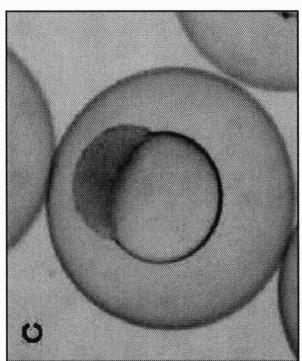
ФИГ. 3В



ФИГ. 3Д

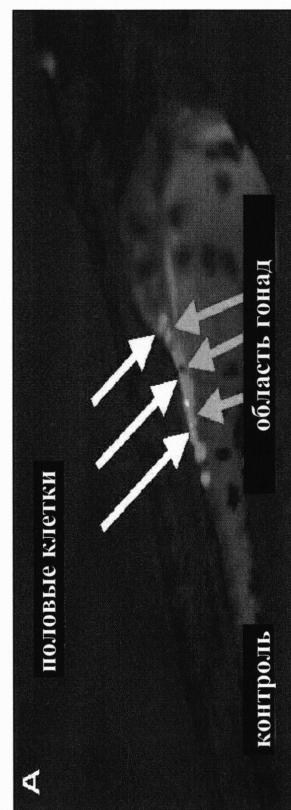


ФИГ. 3А

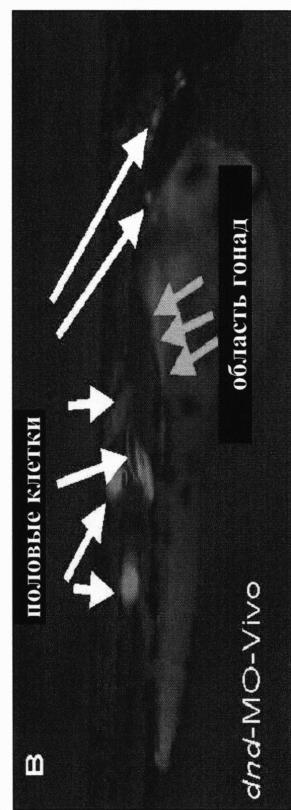


ФИГ. 3С

4/10

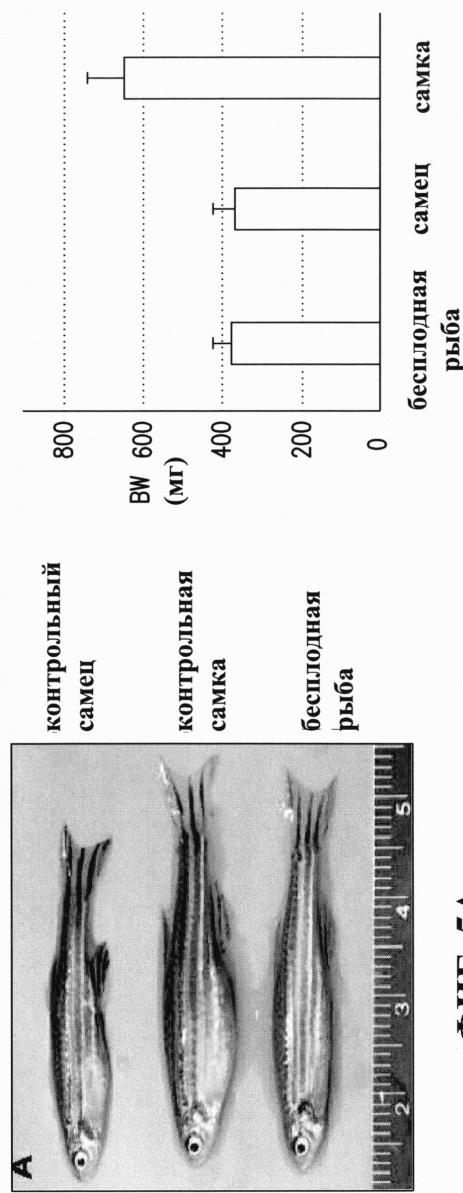


ФИГ. 4А

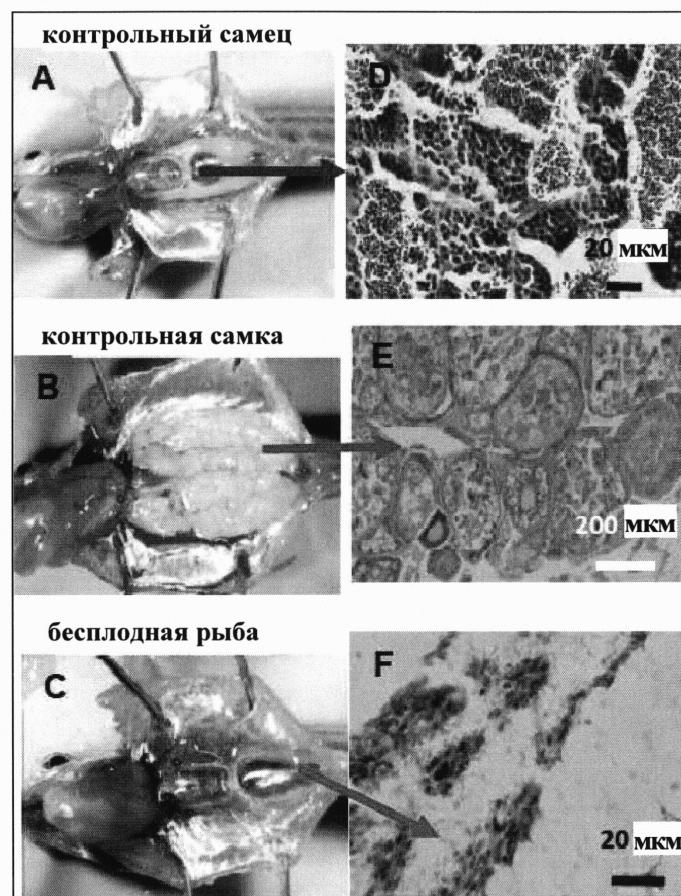


ФИГ. 4В

5/10

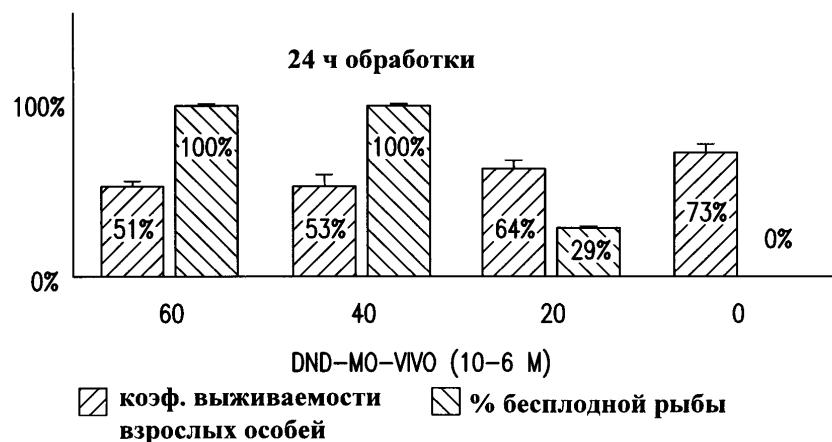


6/10



ФИГ. 6

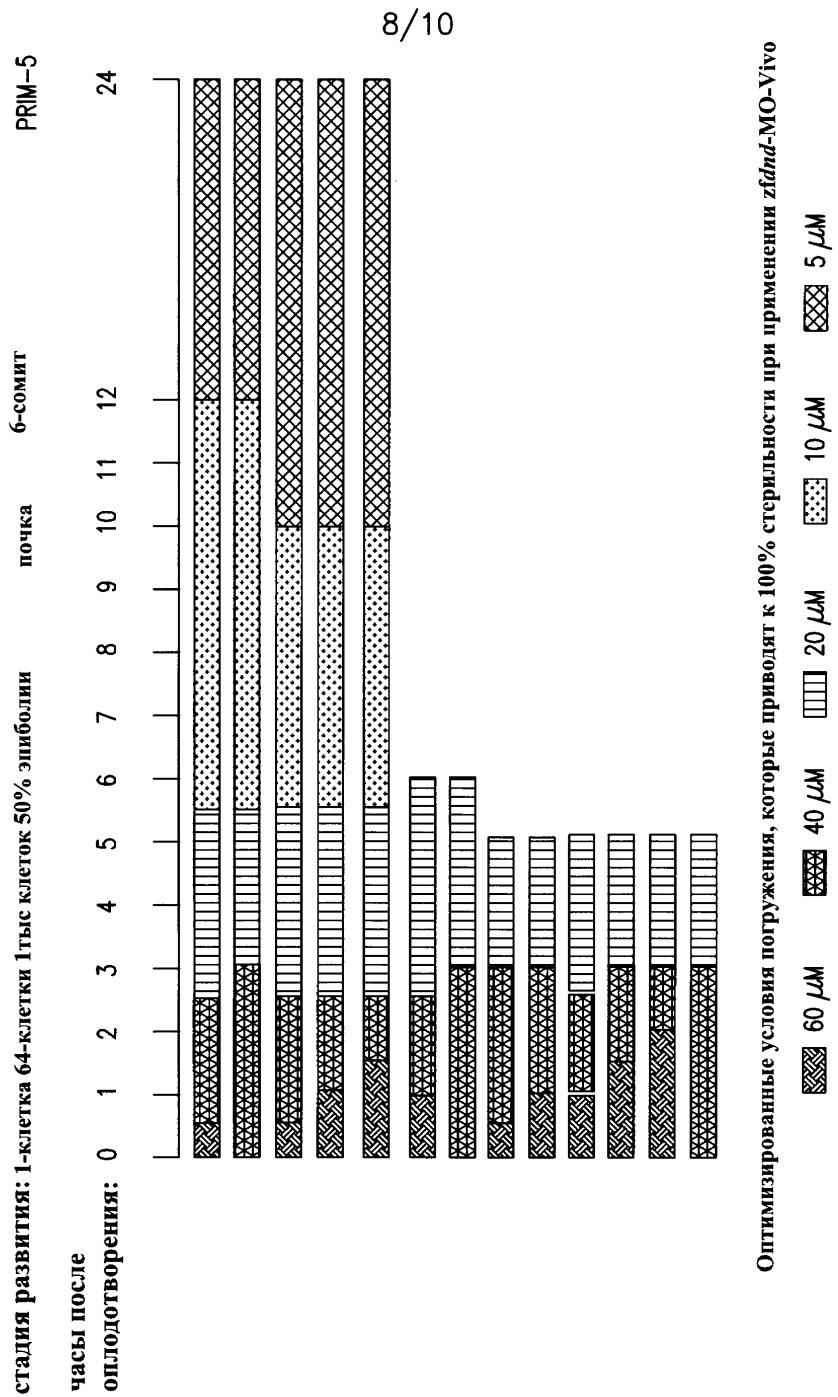
7/10



ФИГ. 7А

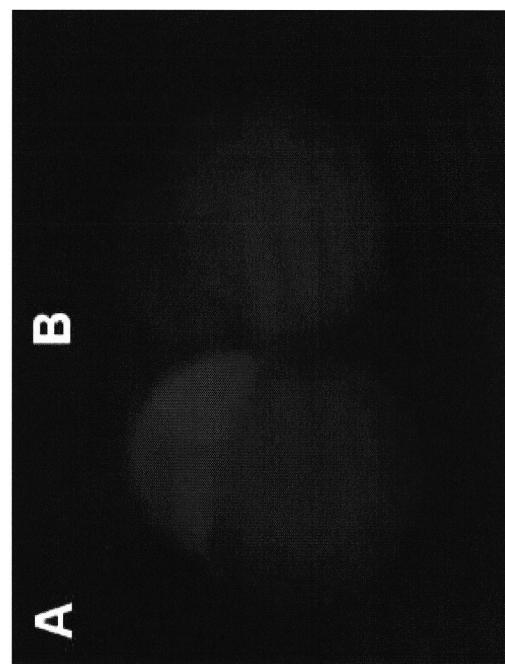


ФИГ. 7В



ФИГ. 8

9/10



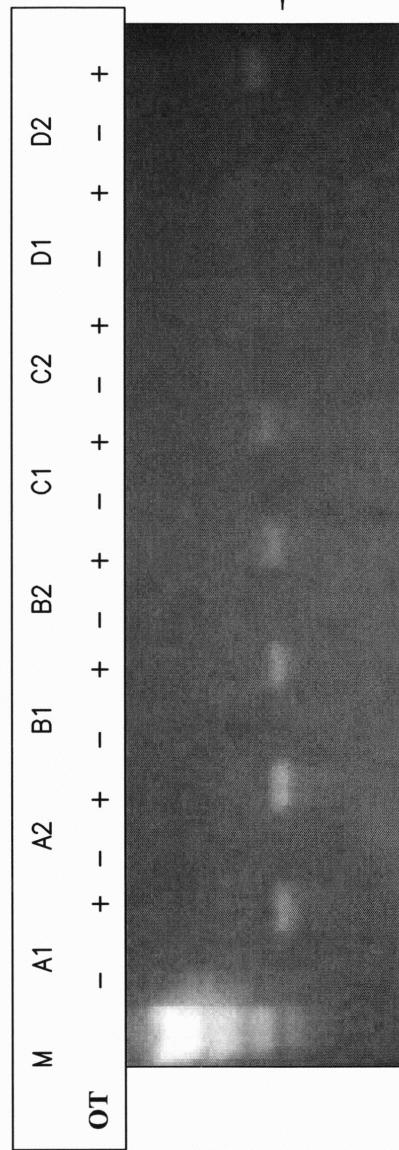
ФИГ. 9

10/10

разрез

плавательный
пузырьобласть
гонад

→ vasa



ФИГ. 10