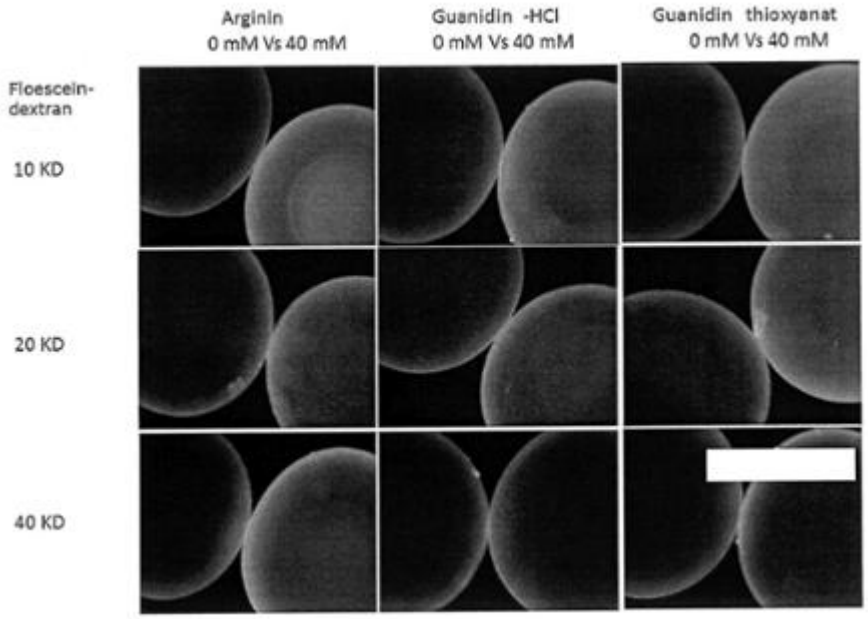
(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(11) **1-0031949**
(51)[8] **A01K 67/027**; C12N 15/87
(13) **B**

(21) 1-2017-04639
(22) 17/05/2016
(86) PCT/US2016/032873 17/05/2016
(87) WO2016/187198 24/11/2016
(30) 62/163,511 19/05/2015 US; 62/274,958 05/01/2016 US
(45) 25/05/2022 410
(43) 26/02/2018 359A
(73) UNIVERSITY OF MARYLAND BALTIMORE COUNTY (US)
1000 Hilltop Circle, Baltimore, MD 21250, United States of America
(72) WONG, Ten, Tsao (TW); ZOHAR, Yonathan (US).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP ĐƯA HÓA CHẤT VÀO TRỨNG CỦA CÁC ĐỘNG VẬT THUỶ SINH ĐẺ TRỨNG, TRỨNG ĐÃ ĐƯỢC CHUYỂN NHIỄM CỦA ĐỘNG VẬT THỦY SINH ĐẺ TRỨNG THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp đưa ít nhất một hóa chất vào trứng từ động vật thuỷ sinh đẻ trứng bao gồm cho trứng tiếp xúc với ít nhất một chất hóa học với sự có mặt của hợp chất có chứa guanidin có khả năng tăng tính thấm của màng đệm của trứng. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp để sàng lọc thuốc và khảo nghiệm độc tính. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản để nuôi trồng thủy sản. Oligome Morpholino đối nghĩa được sử dụng trong các phương pháp này và trứng đã chuyển nhiễm của động vật thủy sinh đẻ trứng bao gồm Oligome Morpholino đối nghĩa này cũng được đề cập đến.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp đưa hóa chất vào trứng và phôi của các động vật thuỷ sinh đẻ trứng. Đối tượng của sáng chế bao gồm các phương pháp được sử dụng để tăng cường độ thấm qua màng đệm và các chất xử lý, ví dụ, các phân tử lớn, vào trứng và phôi. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp sàng lọc thuốc và hoạt chất sinh học trong các khảo nghiệm an toàn và độc tính trong công nghiệp sinh học và dược phẩm, và sản xuất cá vô sinh trong nuôi trồng thuỷ sản, thị trường cá cảnh, và kiểm soát các loài xâm lấn.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp được sử dụng để đưa Oligome Morpholino (MO) vào trứng và phôi của động vật thuỷ sinh đẻ trứng dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và cá trưởng thành vô sinh.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Nuôi trồng thuỷ sản ngày càng trở nên quan trọng để giải quyết sự thiếu hụt thực phẩm thủy sản và hải sản hiện có trên toàn cầu hiện tại và đã dự báo. Việc thay đổi phương thức từ thu hoạch thủy sản tự nhiên sang nuôi trồng nhân tạo các loài thuỷ sản vẫn đang tiếp tục, việc tối ưu hóa các phương pháp nuôi trồng thủy sản ngày càng trở nên cần thiết để tối đa hóa việc sản xuất lương thực và giảm thiểu tác động đến sinh thái, từ đó đạt được tính bền vững về mặt môi trường lâu dài đối với nguồn cung cấp hải sản.

Triệt sản (gây ra vô sinh) ở cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi khác làm tăng tỷ lệ phát triển của chúng bằng cách chuyển đổi năng lượng từ thức ăn để tăng trưởng cơ, thay vì phát triển tuyến sinh dục. Ngoài ra, nếu thoát khỏi nơi nuôi trồng thủy sản ra môi trường, cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi vô sinh khác, bao gồm các loài đã được thuần hoá, không phải các loài không tự nhiên hoặc biến đổi gen, sẽ không thể tái sinh sản hoặc giao phối với các loài tự nhiên. Điều này sẽ giúp ngăn chặn sinh học và ngăn ngừa sự ô nhiễm di truyền của các loài tự nhiên và/hoặc sự thành lập của cá nuôi, các loài không tự nhiên hoặc biến đổi gen cá và các động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi khác trong môi trường tự nhiên.

Ngoài ra, triệt sản cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác sẽ ngăn ngừa việc nuôi và bán trái phép, hoặc mặt khác được bảo vệ, được chọn lọc di truyền hoặc biến

đổi gen cá và động vật thủy sinh đẻ trứng khác.

Hơn nữa, động vật thủy sinh, như cá ngựa vằn, được cung cấp như mô hình để thử nghiệm thuốc hoặc hoạt chất sinh học quan trọng. Tuy nhiên, một trong những thách thức lớn trong việc sử dụng trứng và phôi của các động vật thủy sinh là độ thấm thấp của màng đệm hoặc vỏ trứng, ngăn không cho các hóa chất này đi qua màng đệm và đến phôi.

Do đó, cần phải có các phương pháp để tăng cường độ thấm của màng đệm của trứng động vật thủy sinh và cho phép các thuốc thử, các hoạt chất sinh học và các phân tử lớn đi qua màng đệm và đến phôi. Ngoài ra, cần phải có các biện pháp để triệt sản các động vật thủy sinh đẻ trứng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một số hợp chất được tìm ra, ví dụ, guanidin, acginin, và các dẫn xuất của chúng, dime, trime hoặc polyme, có khả năng tăng cường hiệu quả độ thấm của màng đệm của trứng động vật thủy sinh, cho phép các hóa chất, như thuốc thử, hoạt chất có khả năng sinh học và/hoặc các phân tử lớn đi qua các màng đệm của trứng của các động vật thủy sinh đẻ trứng và đến phôi.

Một khía cạnh theo sáng chế đề cập đến phương pháp truyền ít nhất một hóa chất vào trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh từ động vật thủy sinh đẻ trứng, phương pháp này bao gồm việc tiếp xúc của trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh với ít nhất một hóa chất trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả làm tăng độ thấm của màng đệm của trứng. Các phương pháp này có thể được sử dụng trong các phương pháp sàng lọc cho các hóa chất quan trọng.

Do đó, theo khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp tiến hành sàng lọc thuốc và khảo nghiệm độc tính hợp chất bằng cách sử dụng động vật thủy sinh, phương pháp bao gồm việc tiếp xúc của trứng từ động vật thủy sinh với ít nhất một hóa chất bao gồm thuốc, thuốc thử, hợp chất độc hoặc hợp chất thử độc hại trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng, phương pháp này còn bao gồm phản ứng của động vật thủy sinh với hóa chất.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp làm tăng độ thấm của màng đệm của trứng của động vật thủy sinh đẻ trứng bao gồm việc tiếp xúc với trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh từ động vật thủy sinh đẻ trứng với hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng.

Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất các tập hợp động vật thuỷ

sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, trong đó các phương pháp triệt sản bao gồm sự phá vỡ sự di chuyển tế bào mầm phôi ban đầu và/hoặc sự phát triển ở mỗi cá thể được xử lý mà không ảnh hưởng xấu đến các đặc tính khác của động vật bình thường.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, phương pháp đã đề cập bao gồm việc tiếp xúc của trứng đã thụ tinh với Oligome Morpholino đối nghĩa được lựa chọn từ chuỗi oligomer chứa 12 bazơ có hiệu quả để chuyển trứng và làm cho (các) cá thể được tạo ra từ đó vô sinh.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, phương pháp đã đề cập bao gồm việc tiếp xúc ngay lập tức sau khi thụ tinh của trứng đã thụ tinh với Oligome Morpholino đối nghĩa có hiệu quả để chuyển trứng và làm cho (các) cá thể được tạo ra từ đó vô sinh.

Theo các khía cạnh, tính năng và lợi ích khác của sáng chế sẽ được rõ ràng hơn từ việc bộc lộ và yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là sơ đồ minh hoạ quá trình sàng lọc thuốc hoặc khảo nghiệm độc tính của hóa chất theo các phương án theo sáng chế sử dụng (các) hợp chất có chứa guanidin (GCCs) để tăng cường độ thấm của màng đệm.

Hình 2 là sơ đồ minh hoạ quá trình sản xuất cá vô sinh thu được theo các phương án theo sáng chế sử dụng (các) hợp chất có chứa guanidin (GCCs) để tăng cường độ thấm của màng đệm.

Hình 3 là sơ đồ minh hoạ quá trình sản xuất cá vô sinh thu được theo các phương án của sáng chế.

Hình 4 là ảnh chụp huỳnh quang minh hoạ hiệu quả của việc truyền tới phôi cá floescein-dextran sử dụng GCC arginin, guanidin-HCl và guanidin thioxyanat.

Hình 5 là hình ảnh phóng đại minh hoạ ảnh hưởng của việc truyền tới phôi cá poly-arginin/9me. Hình 5 minh hoạ các kết quả ảnh chụp sáng của poly-arginin/9 me (100 μM) nồng độ cao được tạo ra các khối không đặc chủng tổng hợp trong vòng 1 giờ ủ và gây ra sự phân tách màng đệm sau 18 giờ ủ, mà không thấy trong nhóm được xử lý với 10 μM poly-arginin/9 me.

Hình 6A đến hình 6D là hình ảnh hiển vi minh hoạ tác động của việc chỉ truyền floescein-dextran và kết hợp với poly-arginin để tạo phôi cá. Hình 6A minh hoạ những kết quả ảnh chụp sáng với poly-arginin và floescein-dextran; Hình 6B minh hoạ những kết quả ảnh chụp sáng với chỉ floescein-dextran. Hình 6C minh hoạ những kết quả ảnh huỳnh quang với poly-arginin và floescein-dextran; Hình 6D minh hoạ những kết quả ảnh huỳnh quang với chỉ floescein-dextran.

Hình 7A-7G là ảnh hiển vi minh hoạ cá hồi đã được xử lý bằng *dnd*-MO-Vivo trong cá hồi vân đã được xử lý vô sinh. Thí nghiệm sợi mô sinh dục minh hoạ (Hình 7A) tinh hoàn phát triển tốt của cá đực không được xử lý; (Hình 7B) buồng trứng phát triển tốt của cá cái không được xử lý; (Hình 7C) tinh hoàn của cá hồi chứa gen *dnd*-MO-Vivo được xử lý phát triển thành mô mỏng giống như sợi; (Hình 7D) hình ảnh hiển vi của các tuyến sinh dục bị cắt; (Hình 7E) sự hình thành tinh trùng hoạt tính của tinh hoàn của cá đực không được xử lý; (Hình 7F) buồng trứng phát triển tốt của cá cái không được xử lý với noãn bào ở các giai đoạn phát triển khác nhau; (Hình 7G) các thí nghiệm mô học của mô sinh dục cho thấy tinh hoàn của cá hồi chứa gen *dnd*-MO-Vivo được xử lý dường như kém phát triển không có cấu trúc sinh dục hoàn thiện hoặc tế bào mầm phôi.

Hình 8A-8D là hình ảnh hiển vi minh hoạ cá hồi chứa gen *dnd*-MO hoặc *dnd*-MO-Vivo ngăn chặn sự phát triển tuyến sinh dục ở cá hồi Đại Tây Dương. Trong cá hồi Đại Tây Dương 10 tháng tuổi, (Hình 8A) tinh hoàn phát triển của cá đực không được xử lý; (Hình 8B) buồng trứng đang phát triển của cá cái không được xử lý; (Hình 8C) các tuyến sinh dục của cá chứa gen*dnd*-MO-Vivo hoặc *dnd*-MO được xử lý phát triển thành mô mỏng giống như sợi; (Hình 8D) hình ảnh hiển vi của các tuyến sinh dục bị cắt bỏ từ (A), (B) và (C).

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp tăng cường độ thấm của màng đệm của trứng từ động vật thủy sinh đẻ trứng bao gồm việc tiếp xúc với trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh từ động vật thủy sinh đẻ trứng với hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng. Phương pháp này cho phép truyền các hóa chất quan trọng vào phôi bằng cách tăng cường độ thấm của màng đệm đủ để cho phép hóa chất tiếp xúc với bên trong trứng.

Việc đưa hóa chất vào cá hoặc các động vật thủy sinh đẻ trứng khác theo cách truyền thống đã được thực hiện thông qua đường thức ăn, tiêm, hoặc ngâm phôi hoặc cá thể trong hóa chất quan trọng. Tuy nhiên, việc tiêm thuốc không được áp dụng thực tế trong các hoạt động nuôi trồng thủy sản thương mại quy mô lớn. Ngoài ra,

việc sử dụng phương pháp ngâm xử lý trứng đã thụ tinh và kích hoạt nước còn hạn chế do độ thấm của màng đệm của trứng thấp, vỏ nhiều lớp không phân bào dày, còn gọi là vỏ trứng, chủ yếu bao gồm protein và glycoprotein. Thông thường, trong xử lý ngâm phôi cá hoặc động vật thủy sinh đẻ trứng khác, các hóa chất quan trọng, ví dụ như các hợp chất phân tử lớn, không thể đi qua màng đệm và đến phôi.

Sau khi rụng trứng/đẻ trứng và trước khi thụ tinh và kích hoạt nước, trứng có màng đệm thấm qua được và có lỗ (hoặc lớp ngoài cùng) cho phép nước và các chất đi vào trứng không thụ tinh thông qua các lỗ nhỏ hoặc lỗ noãn, rãnh nhỏ trong màng đệm của trứng cho phép tinh trùng thâm nhập vào trứng để thụ tinh. Tuy nhiên, sau khi thụ tinh và kích hoạt nước, màng đệm trở nên kín và trứng được tạo ra không thấm qua được, ngăn chặn việc tiếp nhận các chất hoặc nước từ môi trường.

Các phương pháp theo sáng chế nhằm tăng cường độ thấm của màng đệm của trứng của động vật thủy sinh đẻ trứng, trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh, truyền ít nhất một hóa chất vào trứng từ động vật thủy sinh đẻ trứng có thể đạt được. Các phương pháp như vậy bao gồm việc tiếp xúc với trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh từ động vật thủy sinh đẻ trứng với ít nhất một hóa chất trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin (GCC) có khả năng tăng độ thấm của màng đệm của trứng.

Sự tiếp xúc của trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh bao gồm sự chuyển nạp màng đệm của trứng.

Hợp chất có chứa guanidin theo sáng chế có thể được chọn từ guanidin, dẫn xuất guanidin, dime, trime hoặc polyme guanidin, ví dụ: dendrime, hoặc muối của chúng, hoặc arginin, dẫn xuất arginin, dime, trime hoặc polyme arginin, ví dụ: dendrime, hoặc muối của chúng có chứa một phần guanidin, và hỗn hợp của chúng.

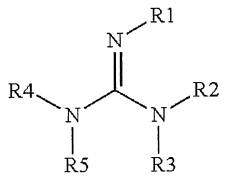
Các hợp chất có chứa guanidin thích hợp để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế là các hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả tăng độ thấm của màng đệm của trứng của động vật thủy sinh. Như được sử dụng ở đây "có hiệu quả tăng độ thấm của màng đệm" có nghĩa là sau khi trứng của động vật thủy sinh được tiếp xúc với hợp chất có chứa guanidin, màng đệm của trứng như vậy có khả năng thấm hơn mảng đệm của trứng động vật thủy sinh cùng loài không tiếp xúc với hợp chất có chứa guanidin. Ví dụ, độ thấm của màng đệm của trứng của động vật thủy sinh sau khi tiếp xúc với hợp chất có chứa guanidin ở thời điểm T1 có thể có khả năng thấm hơn so với màng đệm của trứng động vật thủy sinh cùng loài không tiếp xúc với hợp chất có chứa guanidin tại thời điểm T1. Độ thấm có thể được xác định bằng các phương pháp được biết đến trong lĩnh vực; xem, ví dụ, Hagedorn, M., et al. (1997) "Phân bố và thẩm thấu nước của phôi cá ngựa vằn, Brachydanio rerio" *J Exp Zool*

278, 356-371; và Kais, B., et al., (2013) "DMSO biến đổi độ thấm của màng đệm cá ngựa vằn (Danio rerio)-sử dụng để xét nghiệm phôi cá (FET)," *Aquat Toxicol*, 140-141: p. 229-38.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "dẫn xuất" có nghĩa là các chất dẫn xuất bao gồm cấu trúc chức năng giống như hợp chất mà đã đề cập, và có các tính chất tương tự, ví dụ, có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng của động vật thuỷ sinh.

Như được sử dụng ở đây, "guanidin" có nghĩa là bất kỳ hợp chất nào trong công thức hóa học có ít nhất một nguyên tử cacbon có liên kết đôi đến nguyên tử nitơ và liên kết đơn đến hai nguyên tử nitơ và bao gồm muối của các hợp chất đó.

Hợp chất có chứa guanidin, một mặt, có thể được chọn từ các hợp chất của công thức chung (A) dưới đây:



(A)

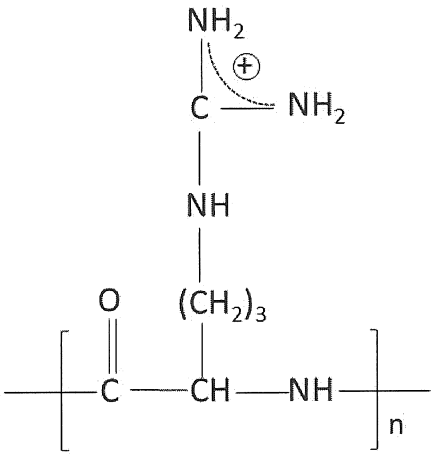
trong đó:

R1, R2, R3, R4 và R5 đại diện, một cách độc lập:

nguyên tử hydro, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc C_1-C_4 alkenyl gốc, tùy chọn được thế bằng một hoặc hai gốc tự do được chọn từ: hydroxyl, amino, dimetylamino, metoxy, etoxy, cacboxyl, cacboxamit, N-metylcacboxamit hoặc SO_3H, hoặc muối của chúng.

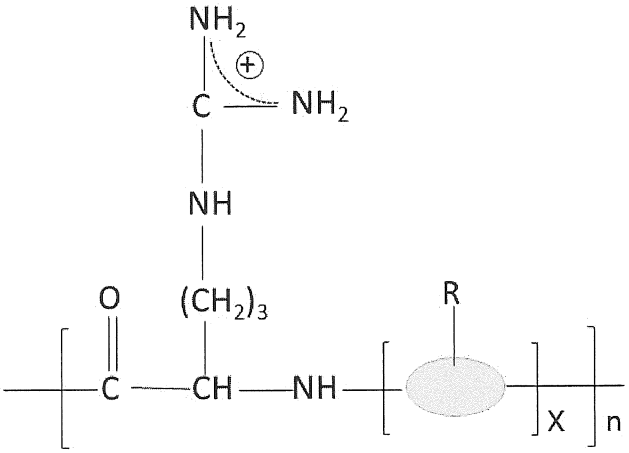
Ví dụ hợp chất có chứa guanidin bao gồm arginin, guanidin-HCl, guanidin-thixcyanat, guanidin-axetat, guanidin-cacbonat, guanidin-nitrat, guanidin-sulfat, guanidin-bicacbonat và guanidin-hydrobromit.

Theo các khía cạnh khác, hợp chất có chứa guanidin là dime, trime hoặc polyme có chứa guanidin. Theo một khía cạnh, hợp chất có chứa guanidin, có thể được chọn từ các hợp chất của công thức chung (I) đến (IV) dưới đây:



dime Arginin và
poly-arginin liền kề

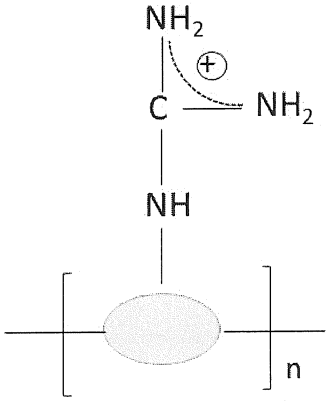
(I)



hợp chất dime Arginin-liên kết và
được ghép với hợp chất poly arginin-liên kết

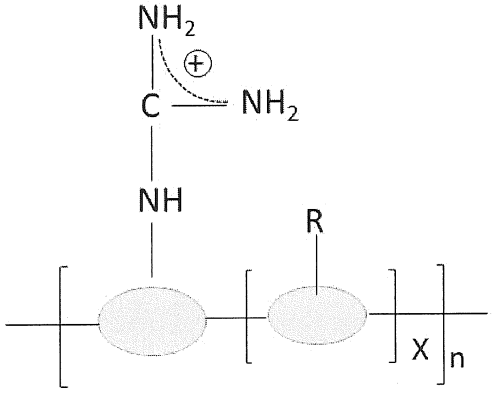
(II)

R: Các nhóm biến thể : Biến thể liên kết chính $n \geq 2$; $x \geq 1$



hợp chất dime Guanidin-liên kết và
hợp chất poly guanidin-liên kết liền kề

(III)



hợp chất dime Guanidin-liên kết và
được ghép với hợp chất poly guanidin-liên kết

(IV)

R: Các nhóm biến thể : Biến thể liên kết chính $n \geq 2$; $x \geq 1$

Nhóm biến thể "R" có thể được chọn từ nguyên tử hydro, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc C_1-C_4 alkenyl gốc, tùy chọn được thế bằng một hoặc hai gốc được chọn từ: hydroxyl, amino, dimetylamino, metoxy, etoxy, cacboxyl, cacboxamit, N-metylcacboxamit hoặc SO_3H, hoặc muối của chúng. Biến thể liên kết chính có thể được chọn từ amino axit, nucleotit, photphoamidat, glycol, polyetylen glycol, nitro, amino, xyano, phenyl,

xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh. Ví dụ, polyarginin/9-arginin là hợp chất có công thức I với n=9.

Hợp chất có chứa guanidin có thể được sử dụng trong phương pháp truyền ít nhất một hóa chất vào trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh từ động vật thủy sinh đẻ trứng, phương pháp đã đề cập bao gồm việc tiếp xúc với trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh với ít nhất một hóa chất trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng.

Hóa chất có thể là bất kỳ hợp chất, thuốc hoặc thuốc thử, hoạt chất sinh học hoặc hoạt chất có khả năng sinh học, chế phẩm dược, chất hoạt tính hóa học, chất điều trị hoặc các chất thử khác. Các chất bao gồm nhưng không giới hạn các dạng như phân tử không tải, phân tử phức, muối, ete, este, amit, ...

Ví dụ, hóa chất hoặc các hóa chất có thể được đặt trong môi trường ngâm có chứa trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh và (các) hợp chất có chứa guanidin sao cho (các) hóa chất trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin.

Các hợp chất có chứa guanidin là (các) hóa chất có liên kết cộng hóa trị hoặc (các) hóa chất không có liên kết cộng hóa trị trong các phương pháp theo sáng chế. Đã được biết rằng các hợp chất có chứa guanidin có khả năng tăng độ thấm của màng đệm của trứng từ động vật thuỷ sinh đẻ trứng và cho phép truyền các hóa chất vào phôi ngay cả khi các hợp chất có chứa guanidin không có liên kết cộng hóa trị đến hoặc liên hợp với hóa chất.

Hợp chất có chứa guanidin theo một số khía cạnh của sáng chế có thể là dendrime, ví dụ: octaguanidin dendrime chứa phần tử trung gian triazin, ví dụ như loại được mô tả trong Sáng chế Hoa Kỳ số 7,935,816, còn được gọi là "Vivo". Sáng chế Hoa Kỳ số 7,935,816 được đưa vào đây để tham khảo trong nội dung tương ứng. Theo một số phương án của sáng chế cho biết khi hợp chất có chứa guanidin là octaguanidin dendrime bao gồm phần tử trung gian triazin, hợp chất có chứa guanidin không có liên kết cộng hóa trị với hoặc liên hợp với (các) hóa chất quan trọng.

Môi trường ngâm theo các phương án là môi trường nước. Môi trường ngâm có thể là bất kỳ môi trường nào được biết đến với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực để sử dụng với trứng từ động vật thủy sinh. Các môi trường ngâm, ví dụ, có thể là môi trường nước có thể bao gồm nước ngọt, nước lợ, nước biển, dịch buồng trứng cá hoặc chất pha loãng thụ tinh có chứa muối, Tris (độ pH từ 7 đến 9), glycin, và/hoặc 0 đến 30% huyết thanh và chất ức chế protease như

aprotinin hoặc leupeptin.

Nồng độ của hợp chất có chứa guanidin trong môi trường ngâm là một lượng đủ để tăng độ thấm của màng đệm của trứng trong môi trường ngâm. Ví dụ, nồng độ của hợp chất có chứa guanidin có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 80.000 μM, tốt hơn là trong khoảng từ 20 đến 40.000 μM, và tốt hơn nữa là trong khoảng từ khoảng 40 đến khoảng 20.000 μM.

Việc phát hiện ra các hợp chất có chứa guanidin theo sáng chế có thể tăng độ thấm của màng đệm của trứng của các loài động vật thủy sinh cung cấp khả năng để truyền các hóa chất hiệu quả đến trứng và phôi động vật thủy sinh. Việc truyền các hóa chất còn cho phép sử dụng các động vật thủy sinh trong mô hình để sàng lọc thuốc hoặc hoạt chất sinh học hoặc khảo nghiệm để đánh giá độc tính của chất thử. Ví dụ, cá ngựa vằn đã được sử dụng trong các mô hình kiểu hình để sàng lọc thuốc hoặc hoạt chất sinh học. Theo đó, các phương pháp theo sáng chế ở đây có thể được sử dụng, ví dụ như trong các phương pháp sàng lọc thuốc hoặc hoạt chất sinh học, các khảo nghiệm để đánh giá an toàn hoặc độc tính của thuốc hoặc hoạt chất sinh học, và các phương pháp để đánh giá chất thử để phản ứng sinh học.

Hình 1 minh hoạ một ví dụ về việc áp dụng các hợp chất có chứa guanidin trong việc sàng lọc thuốc hoặc khảo nghiệm độc tính hóa chất. Như được minh hoạ, trứng đã thụ tinh được đặt trong bể dung dịch hóa chất. Một nhóm trứng được ngâm trong bể dung dịch hóa chất không có các hợp chất có chứa guanidin trong đó và một nhóm trứng được nhúng trong hóa chất có các hợp chất có chứa guanidin. Phản ứng điều trị hoặc độc tính của trứng được ngâm trong hợp chất với GCC có thể được theo dõi và/hoặc đánh giá.

Các khía cạnh theo sáng chế do đó bao gồm phương pháp sàng lọc chất thử như thuốc hoặc hoạt chất sinh học, ví dụ: kháng thể, protein, peptit, RNA hoặc DNA bao gồm trứng từ động vật thủy sinh đẻ trứng tiếp xúc với ít nhất một hóa chất trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng và xác định phản ứng, ví dụ, phản ứng sinh lý. Ví dụ, phương pháp sàng lọc có thể được sử dụng để đánh giá chất thử, đánh giá tác động của chất thử đối với phôi cá, đánh giá độc tính của chất thử, ...

Các phương pháp theo sáng chế bao gồm việc sử dụng các hợp chất có chứa guanidin trong việc khảo nghiệm an toàn và độc tính hợp chất, trong đó chất thử được tiếp xúc với trứng/(các) phôi từ động vật thuỷ sinh đẻ trứng trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng/(các) phôi và xác định phản ứng, ví dụ chữa bệnh hoặc phản ứng sinh lý (bất thường và tử

vong) và phản ứng với chất thử được theo dõi và đánh giá.

Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản liên quan đến trứng trong môi trường ngâm tiếp xúc với các hóa chất được chọn dẫn đến các cá thể vô sinh. Các phương pháp triệt sản bao gồm việc phá vỡ sự phát triển của tuyến sinh dục trong phôi. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp ngăn ngừa sự lai chéo giữa cá nuôi đã được thuần hoá, không phải các loài không tự nhiên hoặc biến đổi gen/động vật thủy sinh đẻ trứng khác và trữ lượng tự nhiên của chúng, cũng như việc hình thành các loài cá nuôi trồng thủy sản và động vật thủy sinh đẻ trứng khác trong tự nhiên. Ngoài ra, các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để ngăn ngừa sự ô nhiễm di truyền của quần thể tự nhiên bằng cá và các động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi khác.

Như được định nghĩa ở đây, các động vật thủy sinh đẻ trứng "vô sinh" được hiểu là làm cho một cá thể không thể sinh sản được. Động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản được xác định là những cá thể không thể đạt được sự trưởng thành về giới tính hoặc sinh sản khi đến tuổi trưởng thành.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, phương pháp bao gồm việc tiếp xúc của trứng với hóa chất có hiệu quả truyền trứng và làm cho (các) cá thể được sản xuất vô sinh. Theo một số khía cạnh, hóa chất được tiếp xúc với trứng trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin. Theo một số khía cạnh, hóa chất là Oligome Morpholino đối nghĩa.

Các phương pháp sản xuất cá và động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh khác bao gồm việc đưa hóa chất vào trứng của chúng để phá vỡ sự phát triển, di chuyển và cư trú của tế bào mầm phôi ban đầu (PGC) trong tuyến sinh dục của phôi, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc chức năng sinh dục không đầy đủ và phù hợp ở cấp độ tế bào hoặc mô, và cuối cùng là tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh khác.

PGC là tổ hợp tế bào trong phôi cá là tiền thân của các giao tử của cá và động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác. PGC được tạo ra trong giai đoạn rất sớm của sự phát triển phôi thai. Ở giai đoạn sau của sự phát triển phôi, PGC di chuyển qua phôi từ vị trí ban đầu đến vị trí tiền thân của tuyến sinh dục. Khi kết thúc quá trình di chuyển, các PGC xâm nhập vào các tuyến sinh dục đang phát triển, tạo thành mô và bắt đầu quá trình sinh trưởng, dẫn đến tuyến sinh dục trưởng thành ở cá và động vật thủy sinh đẻ trứng trưởng thành khác.

Các phương pháp theo sáng chế cho phép tạo ra các động vật thuỷ sinh đẻ

trứng không có khả năng sinh sản (vô sinh). Việc triệt sản sẽ làm phá vỡ sự phát triển của tuyến sinh dục ở các cá thể mà không ảnh hưởng bất lợi đến các đặc tính khác dẫn tới sản xuất các động vật thuỷ sinh đẻ trứng hoàn toàn bình thường nhưng không có khả năng sinh sản.

Do đó, theo các phương án khác nhau, sáng chế đề cập đến phương pháp để đưa hóa chất vào phôi một cách hiệu quả bằng việc tiếp xúc của trứng với các hóa chất thích hợp để phá vỡ sự phát triển, di chuyển và/hoặc sống sót của PGC trong số lượng lớn phôi, dẫn đến việc sản xuất cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng trưởng thành không có khả năng sinh sản với quy mô lớn. Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể ứng dụng cho phôi đơn lẻ trong việc sản xuất quy mô nhỏ cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng trưởng thành không có khả năng sinh sản.

Theo một số khía cạnh, tác nhân được truyền để làm cho (các) cá thể được tạo ra không có khả năng sinh sản được truyền vào trứng trong điều kiện hợp chất có chứa guanidin theo sáng chế. Hình 2 minh hoạ một ví dụ về ứng dụng các hợp chất có chứa guanidin trong sản xuất cá vô sinh. Tham chiếu hình 2, trứng đã thụ tinh được ngâm trong hóa chất có chứa (các) hợp chất có chứa guanidin hoặc không chứa bất kỳ GCC nào. Trứng được ngâm trong bể dung dịch trong 24 giờ và sau đó rửa sạch. Các trứng ngâm trong bể dung dịch với GCC tạo ra cá vô sinh do sự di chuyển sai của PGC, trong khi trứng ngâm trong bể dung dịch mà không có GCC tạo ra cá có khả năng sinh sản.

Các hóa chất sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm các hóa chất phá vỡ sự phát triển, di chuyển và/hoặc sự sống sót của PGC có khả năng xâm nhập vào màng đệm của trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh hoặc được cung cấp trong điều kiện hợp chất hỗ trợ trong sự xâm nhập của trứng. Theo một khía cạnh, hóa chất có thể là Oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng phá vỡ sự phát triển của PGC và có khả năng đi qua màng đệm của trứng. Do đó, theo một số phương án, Oligome Morpholino đối nghĩa hữu ích trong các phương pháp theo sáng chế là Oligome Morpholino đối nghĩa có hiệu quả để chuyển trứng và làm cho (các) cá thể được sản xuất không có khả năng sinh sản.

Oligome Morpholino đối nghĩa được sử dụng để biểu hiện gen im lặng tạm thời bằng cách chặn các việc dịch hoặc ghép nối RNA là bước thiết yếu để tạo ra mRNA. Oligome Morpholino đối nghĩa cụ thể có thể được xác định để tạm thời chặn hoặc ngăn chặn sự biểu hiện của các gen cần thiết cho sự phát triển của tế bào mầm phôi ban đầu bao gồm nhưng không giới hạn thụ thể *dead end (dnd)*, *nanos, vasa*, *gnrh* hoặc *fsh* dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và cuối cùng tạo ra cá và động

vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản.

Do đó, theo một khía cạnh của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản bao gồm việc tiếp xúc của trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh với Oligome Morpholino đối nghĩa có hiệu quả truyền trứng và làm cho (các) cá thể được sản xuất vô sinh. Việc tiếp xúc theo một số khía cạnh có thể bao gồm trong điều kiện hợp chất có guanidin theo sáng chế. Việc tiếp xúc bao gồm việc thâm chuyển màng đệm của trứng. Việc tiếp xúc có thể cùng thời điểm kích hoạt nước.

Theo khía cạnh của sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh khác bằng việc truyền Oligome Morpholino vào trứng hiệu quả để phá vỡ sự phát triển, di chuyển và cư trú của tế bào mầm phôi ban đầu (PGC) trong tuyến sinh dục của phôi, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc chức năng sinh dục không đầy đủ và phù hợp ở cấp độ tế bào hoặc mô, và cuối cùng là tạo ra cá vô sinh.

Dead end (*dnd*) là thành phần đặc trưng của động vật có xương sống của chất nguyên sinh phôi và hạt tế bào phôi rất cần thiết cho sự phát triển của tế bào phôi. Gen *dnd* được biểu hiện cụ thể trong chất nguyên sinh phôi và hạt tế bào mầm phôi ban đầu. Vì *dnd* được coi là cần thiết cho việc di chuyển và sự sống sót bình thường của PGC, phôi không có protein này phát triển để trở thành cá trưởng thành vô sinh.

Các phương pháp theo sáng chế rất hữu ích cho việc sản xuất cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản khác để nuôi trồng thủy sản, thị trường cá cảnh, và kiểm soát các loài xâm lấn. Một mặt, các phương pháp bao gồm việc phá vỡ sự phát triển của tuyến sinh dục thông qua việc truyền Oligome Morpholino đối nghĩa chống lại *dead end* mRNA (*dnd*-MO) hoặc các gen khác cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục bao gồm nhưng không giới hạn thụ thể *nanos*, *vasa, gnrh* hoặc *fsh*, đến trứng đã thụ tinh. Hoạt động của *dnd*-MO hoặc Oligome Morpholino đối nghĩa khác chống lại các gen cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và cá trưởng thành không có khả năng sinh sản.

Theo các phương án, *dnd*-MO có thể tạm thời ức chế sự biểu hiện của Dead end protein, điều này rất cần thiết cho việc phát triển tế bào phôi.

Sáng chế đề cập đến chuỗi Oligome Morpholino đối nghĩa cụ thể để sử dụng trong các phương pháp ngăn chặn việc biểu hiện gen *dead end* trong cá.

Hình 3 là sơ đồ sản xuất cá vô sinh bằng cách truyền Oligome Morpholino đối nghĩa cụ thể chống lại *dead end* mRNAs của cá để phá vỡ sự phát triển tế bào mầm phôi ban đầu (PGC), dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển, và cuối cùng tạo ra cá vô sinh. Khi cá không được xử lý với Oligome Morpholino, chúng có thể trở thành cá thể bố mẹ.

Tham chiếu hình 3, trứng cá (ví dụ từ cá hồi, cá vược hoặc cá rô phi) được tiếp xúc với Oligome Morpholino chống lại gen *dead end* của các loài cá liên quan. Hình 3 minh họa việc truyền Oligome Morpholino chống lại gen *dead end* trong quá trình kích hoạt nước và nước cứng. Ngoài ra, trứng có thể không được xử lý. Minh họa, nơi mà trứng được tiếp xúc với các Oligome Morpholino, các oligome có tác dụng ức chế hoặc ngăn chặn sự dịch mã của Dead end protein, dẫn đến phá vỡ sự phát triển PCG. Do đó, cá trưởng thành không có khả năng sinh sản, vì không có sự phát triển của tuyến sinh dục. Khi phát triển bình thường PGC được cho phép, cá sẽ có tuyến sinh dục phát triển bình thường và cá có thể được sử dụng như cá thể bố mẹ.

Do đó, theo các phương án, Oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng phá huỷ một cách có hiệu quả ít nhất một gen *dead end*, ví dụ ít nhất một gen *dead end* của họ cá hồi gen *dead end*, gen *dead end* họ cá vược hoặc gen *dead end* họ cá rô phi.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến Oligome Morpholino đối nghĩa cụ thể có khả năng ngăn chặn tạm thời và có hiệu quả việc dịch mã *dead end*, gen cần thiết cho sự sống sót của tế bào phôi, và cụ thể phá vỡ sự phát triển của tuyến sinh dục dẫn đến việc sản xuất cá vô sinh, ví dụ, họ cá hồi (cá hồi và cá hồi chấm), họ cá vược (cá vược) và họ cá rô phi (cá rô phi và cá rô phi cảnh).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc xác định các chuỗi ngắn của Oligome Morpholino mà có thể dễ dàng lấy ra bởi trứng để đạt được tế bào đích. Các chuỗi ngắn tốt hơn là 12 bazơ hoặc 18 bazơ thay vì 25 bazơ, như được trình bày trong Công bố đơn WO 2015/073819, được kết hợp dưới đây để tham khảo. Chuỗi Oligome Morpholino đã được thấy là có hiệu quả ngăn chặn tạm thời sự biểu hiện của các gen cụ thể cần thiết cho sự phát triển của tế bào phôi ở các loài nước lạnh như cá hồi Đại Tây Dương. Nhiệt độ ấp trứng thấp được cho là làm cho các Oligome Morpholino ngắn ổn định hơn so với mRNA đích để chặn tạm thời sự biểu hiện của các gen cụ thể.

Sáng chế còn đề cập đến Oligome Morpholino cụ thể, 5'-ACGCTCCTCCAT-3' (SEQ ID NO: 1) và các biến thể của nó, ví dụ 5'-ACTTGAACGCTCCTCCAT-3'

(SEQ ID NO: 2), có khả năng ngăn chặn tạm thời và hiệu quả sự biểu hiện gen *dead end* của họ cá hồi, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc chức năng sinh dục không đầy đủ và phù hợp, và cuối cùng là tạo ra thế hệ cá hồi vô sinh. Theo đó, các phương pháp theo sáng chế có thể ứng dụng cho tất cả các loài cá hồi, bao gồm, nhưng không giới hạn, cá hồi Đại Tây Dương, cá hồi coho, cá hồi chinook, cá hồi chum, cá hồi sockeye, cá hồi hồng và cá hồi masu, cá hồi cầu vồng, cá hồi chấm hồng và cá hồi chấm nâu, cá hồi nước ngọt thông thường và cá hồi nước ngọt Bắc Cực và Cá hồi chấm hồng Bắc Cực và các loài khác.

Các Oligome Morpholino có thể là các biến thể của các chuỗi được liệt kê. Các biến thể bao gồm nhưng không giới hạn axit nucleic biến tính khác và các Oligome Morpholino khác bao gồm toàn bộ hoặc một phần chuỗi được liệt kê ở trên. Cụ thể bao gồm oligome đối nghĩa chứa, bao gồm, một hoặc nhiều SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO: 2. Cũng bao gồm các biến thể của các oligome đối nghĩa khác, bao gồm các biến thể oligome có 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, hoặc 99% (bao gồm tất cả các số nguyên ở giữa) chuỗi nhận dạng hoặc chuỗi đơn đến một SEQ ID NO:1 và SEQ ID NO: 2. bất kỳ, và/hoặc các biến thể khác từ chuỗi bằng khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 nucleotit, tốt hơn các biến thể có hiệu quả trong tái sản xuất cá vô sinh khi tiếp xúc với trứng cá.

Theo khía cạnh khác của sáng chế bao gồm Oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm SEQ ID NO: 1 và các biến thể của chúng. Theo khía cạnh khác của sáng chế bao gồm trứng đã được chuyển nhiễm của động vật thủy sinh đẻ trứng bao gồm Oligome Morpholino đối nghĩa bao gồm chuỗi nucleotit SEQ ID NO: 1 hoặc các biến thể của chúng.

Các biến thể có hiệu quả trong sản xuất cá vô sinh khi tiếp xúc với trứng cá như đã được sử dụng trong nội dung có nghĩa là việc sử dụng các biến thể trong các phương pháp theo sáng chế sẽ tạo ra cá vô sinh. Theo các phương án, các biến thể sẽ phá vỡ hiệu quả biểu hiện gen *dead end* quan trọng.

Theo các phương án của phương pháp theo sáng chế, trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh (một hoặc nhiều trứng) được ngâm trong môi trường ngâm bao gồm Oligome Morpholino đối nghĩa hiệu quả biểu hiện gen dead end *của cá quan trọng. Việc ngâm tốt hơn tại thời điểm bắt đầu kích hoạt nước của trứng. Nồng độ Oligome Morpholino đối nghĩa trong môi trường ngâm cần đủ để cho phép Oligome Morpholino đối nghĩa đi qua màng đệm của trứng cá, hiệu quả chuyển nhiễm trứng. Theo các phương án, nồng độ thông thường khoảng từ 1 đến khoảng 200 µM, tốt hơn là khoảng từ 10 đến khoảng 100 µM, và tốt hơn nữa là khoảng từ 20 đến*

khoảng 60 µM.

Các môi trường ngâm theo ví dụ, thường là môi trường nước, có thể bao gồm nước ngọt, nước lợ, nước biển, dịch buồng trứng cá hoặc chất pha loãng thụ tinh có chứa muối, Tris (độ pH từ 7 đến 9), Glycin, và/hoặc từ 0 đến 30% huyết thanh và chất ức chế protease như aprotinin hoặc leupeptin.

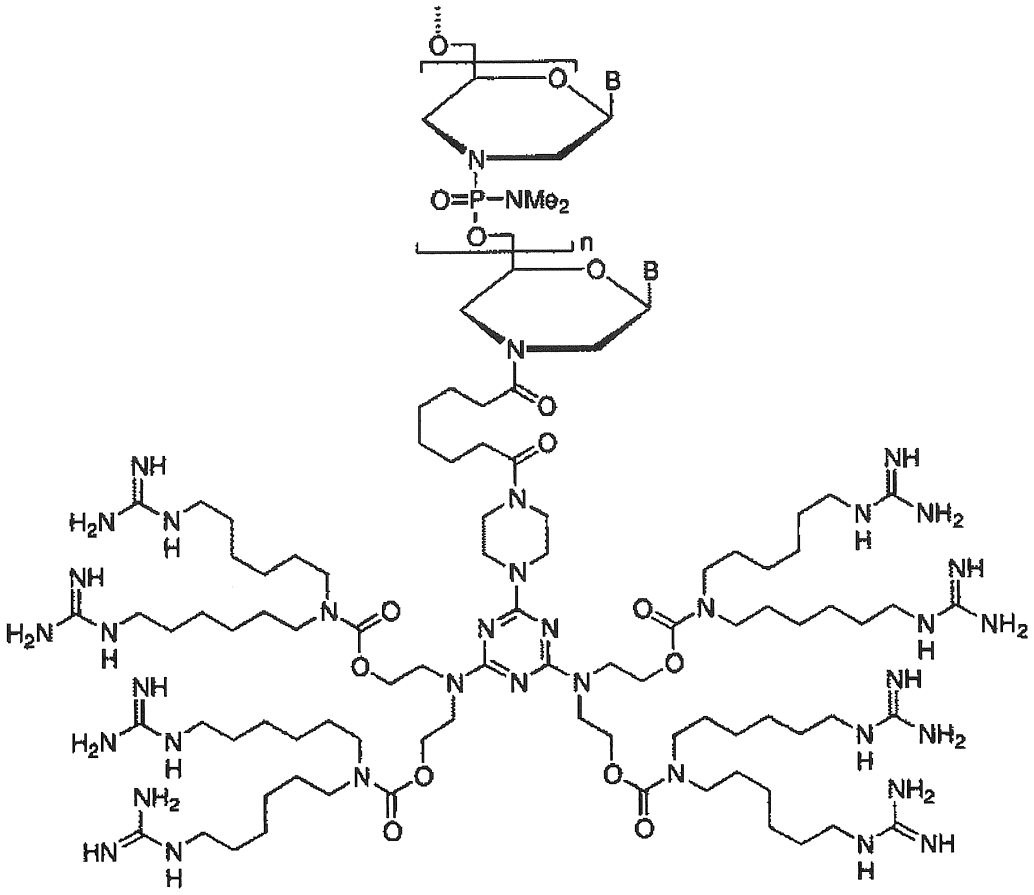
Theo sáng chế, môi trường ngâm còn có thể bao gồm hợp chất có chứa guanidin như được đề cập chi tiết ở trên có khả năng tăng độ thấm của màng đệm của trứng.

Mặc dù thời gian yêu cầu để ngâm trướng đã thụ tinh để đạt được việc cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng khác không có khả năng sinh sản sẽ phụ thuộc vào các loài cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng khác, thông thường cá hoặc trứng khác sẽ được ngâm trong môi trường ngâm chứa Oligome Morpholino và, tuỳ chọn, hợp chất có chứa guanidin trong khoảng 2 đến khoảng 96 giờ, tốt hơn là trong khoảng 4 đến khoảng 72 giờ, và tốt hơn nữa là từ khoảng 5 đến khoảng 48 giờ.

Theo một khía cạnh của sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất cá và động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh được nuôi khác bằng việc truyền guanidin dendrime vào trứng cá hoặc phôi để phá vỡ sự phát triển, di chuyển và cư trú của tế bào mầm phôi ban đầu (PGC) trong tuyến sinh dục của phôi, dẫn đến tuyến sinh dục không phát triển và/hoặc chức năng sinh dục không hoàn toàn và phù hợp ở cấp độ tế bào hoặc mô, và cuối cùng là tạo ra cá và động vật thủy sinh đẻ trứng vô sinh khác.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến guanidin dendrime bao gồm phần tử trung gian triazin, ví dụ octaguanidin dendrime với phần tử trung gian triazin, cũng được gọi là "Vivo". Hợp chất này đã được mô tả trong sáng chế Hoa Kỳ số 7,935,816. Sáng chế Hoa Kỳ số 7,935,816 cho biết được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo tương ứng.

Hợp chất vận chuyển dendrime octaguanidin minh hoạ với morpholino như chất đại diện được thể hiện trong hợp chất sau đây:



Guanidin dendrime cụ thể hữu ích với Oligome Morpholino theo sáng chế là 2-[(4-nitrophenyl)oxycacbonylhexametylencacbonylpiperazinyl]-4,6-bis{di-[di(trifloaxetamidohexyl)aminocacbonyloxyethyl]amino}triazin.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng octaguanidin dendrime với phần tử trung gian triazin. Guanidin dendrime có hiệu quả đối với vận chuyển của Oligome Morpholino, hoặc có liên kết cộng hóa trị với Oligome Morpholino hoặc không có liên kết cộng hóa trị với Oligome Morpholino.

Theo khía cạnh khác của sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, phương pháp đã đề cập bao gồm việc tiếp xúc ngay lập tức sau khi thụ tinh của trứng đã thụ tinh với Oligome Morpholino đối nghĩa có hiệu quả để chuyển trứng và làm cho (các) cá thể được tạo ra từ đó vô sinh.

Oligome Morpholino chọn lọc có thể phá vỡ sự phát triển, di chuyển và sống sót của PGC trong số lượng lớn phôi, dẫn đến việc sản xuất cá và các động vật thuỷ

sinh đẻ trứng trưởng thành khác không có khả năng sinh sản với quy mô lớn. Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể ứng dụng cho phôi đơn lẻ trong việc sản xuất quy mô nhỏ cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng trưởng thành không có khả năng sinh sản.

Theo một phương án đề cập đến phương pháp sản xuất động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, bao gồm ngâm trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh trong môi trường ngâm bao gồm guanidin dendrime, ví dụ Vivo, và Oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng phá huỷ hiệu quả sự biểu hiện của gen *dead end* hoặc các gen khác như thụ thể *nanos, vasa*, *gnrh* hoặc *fsh* cần thiết cho sự phát triển của tuyến sinh dục của cá và các động vật thuỷ sinh đẻ trứng khác. Tốt hơn, guanidin dendrime là octaguanidin dendrime với phần tử trung gian triazin, ví dụ Vivo. Oligome Morpholino đối nghĩa có thể ví dụ là SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2.

Theo các khía cạnh cụ thể của phương án theo sáng chế, trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh (một hoặc nhiều) được ngâm trong môi trường ngâm bao gồm guanidin dendrime và Oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng phá vỡ hiệu quả sự biểu hiện của gen *dead end* hoặc các gen khác cần thiết cho sự phát triển của tuyến sinh dục của cá và các động vật thuỷ sinh đẻ trứng khác. Nồng độ Oligome Morpholino đối nghĩa trong môi trường ngâm cần đủ để cho phép Oligome Morpholino đối nghĩa đi qua màng đệm của trứng. Theo các phương án, nồng độ thông thường từ khoảng 1 đến khoảng 200 μM, tốt hơn là từ khoảng 10 đến khoảng 100 μM, và tốt hơn nữa là từ khoảng 20 đến khoảng 60 μM.

Tất cả các khía cạnh theo sáng chế bao gồm việc truyền hoặc sử dụng hợp chất có chứa guanidin có hiệu quả để tăng độ thấm của màng đệm của trứng của động vật thuỷ sinh. Theo các khía cạnh, hợp chất có chứa guanidin hoặc có liên kết cộng hoá trị hoặc không có liên kết cộng hoá trị với bất kỳ hóa chất nào có thể chuyển màng đệm của trứng.

Có thể nhận thấy rằng việc tiếp xúc của trứng và/hoặc phôi với các hóa chất và hợp chất theo sáng chế có thể được thực hiện bằng bất kỳ cách thức phù hợp nào, ví dụ ngâm tiếp xúc, hoặc thay thế bằng tiếp xúc không ngâm, mặc dù nó được nhận thấy rằng việc ngâm tiếp xúc là kỹ thuật hiệu quả phù hợp với các hoạt động quy mô lớn để sản xuất cá và động vật thủy sinh vô sinh. Kỹ thuật tiếp xúc không ngâm có thể được sử dụng trong thực tế theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn phương pháp phun hoặc nhỏ giọt để tiếp xúc, kỹ thuật truyền khô, trong đó trứng được tiếp xúc với chất mang hoặc hoặc bề mặt phủ với hoặc hỗ trợ bất kỳ các hóa chất hoặc hợp chất theo sáng chế có hiệu quả sản xuất cá vô sinh, hoặc các kỹ thuật khác từ đó

trứng và/hoặc phôi được tiếp xúc với hóa chất hoặc hợp chất theo sáng chế. Việc tiếp xúc tốt hơn bao gồm tiếp xúc không tiêm.

Sáng chế cũng đề cập đến một khía cạnh để đưa hóa chất vào trứng từ cá hoặc động vật thủy sinh đẻ trứng khác bằng việc tiếp xúc của trứng với hóa chất trong quá trình nước hoạt chất và nước cứng của trứng đã thụ tinh (Hình 3). Trong suốt giai đoạn này, trứng tích cực lấy nước (ví dụ, lên đến 14,83 ± 2,05 microlit mỗi trứng cá hồi Đại Tây Dương). Lực hấp thụ nước chủ động này có thể được sử dụng để truyền các hóa chất, ví dụ như Oligome Morpholino vào trứng.

Sáng chế theo một số khía cạnh mô tả các phương pháp đưa hóa chất hiệu quả vào trứng của các động vật thủy sinh đẻ trứng bằng việc tiếp xúc của trứng với các hóa chất trong nhóm trong suốt cửa sổ thời điểm bắt đầu kích hoạt nước và nước cứng. Theo các phương án khác nhau, việc tiếp xúc bao gồm ngâm trứng trong môi trường ngâm chưa một hoặc nhiều (các) hóa chất trong nhóm. Như được sử dụng tại đây, kích hoạt nước và nước cứng của trứng đã thụ tinh bắt đầu ở lần tiếp xúc đầu tiên của trứng mới được thụ tinh với nước đến khi kết thúc nước cứng.

Theo đó, theo các phương án khác nhau của sáng chế đề cập đến việc tiếp xúc của trứng đã thụ tinh ngay lập tức khi bắt đầu kích hoạt nước với hóa chất trong môi trường ngâm. Hóa chất được sử dụng trong môi trường ngâm có thế góp phần làm cho động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, và môt trường ngâm trong các phương án cụ thể có thể bao gồm chất thêm hoặc chất khác có lợi cho động vật thuỷ sinh đẻ trứng nở từ trứng đã tiếp xúc với môi trường ngâm, ví dụ các chất như DNA/RNA, hoocmon, chất kích thích tăng trưởng, kháng nguyên bảo vệ, chất dinh dưỡng, ...

Theo các khía cạnh cụ thể của phương án theo sáng chế, trứng đã thụ tinh hoặc không thụ tinh (một hoặc nhiều) được ngâm trong môi trường nước, do đó bắt đầu kích hoạt nước, bao gồm Oligome Morpholino đối nghĩa hoặc hợp chất có chứa guanidin và Oligome Morpholino đối nghĩa có khả năng phá vỡ hiệu quả sự biểu hiện của gen *dead end* hoặc các gen khác cần thiết cho sự phát triển của tuyến sinh dục của cá hoặc các động vật thuỷ sinh đẻ trứng khác. Ngâm vẫn tiếp tục cho đến khi màng đệm hoàn thành quá trình làm cứng. Nồng độ Oligome Morpholino đối nghĩa trong bể dung dịch cần đủ để cho phép Oligome Morpholino đối nghĩa đi qua màng đệm của trứng. Theo các phương án, nồng độ thông thường từ khoảng 1 đến khoảng 200 μM, tốt hơn là từ khoảng 10 đến khoảng 100 μM, và tốt hơn nữa là từ khoảng 20 đến khoảng 60 μM.

Các phương pháp theo sáng chế ứng dụng cho động vật thuỷ sinh đẻ trứng.

Như được sử dụng tại đây, động vật thuỷ sinh đẻ trứng bao gồm các loại đẻ trứng của động vật trên mặt nước bao gồm tất cả các loài cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng khác như động vật giáp xác và/hoặc nhuyễn thể.

Theo đó, động vật thuỷ sinh đẻ trứng bao gồm tất cả các loài cá, bao gồm nhưng không giới hạn cá hồi, cá hồi Đại Tây Dương, cá hồi coho, cá hồi chinook, cá hồi chum, cá hồi sockeye, cá hồi hồng và cá hồi masu, cá hồi chấm, cá hồi cầu vồng, cá hồi chấm hồng và cá hồi chấm nâu, cá hồi nước ngọt thông thường, cá hồi nước ngọt Bắc Cực và Cá hồi chấm hồng Bắc Cực, cá vược, cá vược lai, cá vược vằn, cá vược trắng, cá vược vằn trắng lai, cá vược vàng, cá rô, cá rô trắng, cá rô vàng, cá rô châu Âu, cá vược rô lai, cá rô phi sông Nil, cá rô phi xanh, cá rô phi xanh sông Nil lai, cá rô phi Mozambique, cá ngựa vằn, các loài cá chép, cá vền, cá vền biển, cá tráp, các loài cá da trơn, và cá tuyết.

Các phương pháp theo sáng chế được ứng dụng thêm với động vật thuỷ sinh đẻ trứng như động vật giáp xác và/hoặc nhuyễn thể. Động vật thuỷ sinh đẻ trứng có thể bao gồm nhưng không giới hạn tôm, tôm thương phẩm, tôm hùm, tôm sông, cua, sò, mực, bạch tuộc và những loài tương tự.

Những thuận lợi và đặc điểm theo sáng chế được minh họa rõ hơn bằng các ví dụ sau đây, không được hiểu là bất kỳ cách nào hạn chế phạm vi của sáng chế mà là minh họa cho các phương án cụ thể của sáng chế trong các ứng dụng cụ thể của nó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Cá ngựa vằn được lựa chọn để minh hoạ ban đầu về các phương pháp theo sáng chế, do thời gian phát triển ngắn và một số lượng lớn các phôi được tạo ra cho mỗi lần giao phối, dễ dàng thu được hàng ngày hoặc hàng tuần. Thêm vào đó, phôi cá ngựa vằn rõ ràng, dễ quan sát bằng mắt, và cứng cáp. Việc phát triển thông thường của PGC và các tuyến sinh dục với phôi có cơ chế bảo tồn tiến hóa được tìm thấy trong tất cả các loài cá. Theo đó, các phương pháp theo sáng chế được ứng dụng cho tất cả các loài cá bao gồm nhưng không giới hạn cá ngựa vằn, các loài cá chép, các loài cá hồi chấm, các loài cá hồi, cá vền (bao gồm cả cá vền biển và cá cảnh), cá vược (bao gồm cá chẽm biển và nước ngọt và cá vược lai, ...), cá rô (cá rô vàng, cá rô trắng ...), các loài cá da trơn, cá tuyết và các nhóm chính khác là tiêu biểu cho việc nuôi trồng.

Như được mô tả ở đây, các phương pháp thông thường ứng dụng cho cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi khác, vì sản xuất các loài nuôi vô sinh như mong muốn. Theo đó, các phương pháp theo sáng chế ứng dụng cho bất kỳ loài cá

và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi nào, cụ thể đối với các loài nuôi trồng thương mại quan trọng.

Ví dụ 1

Sáng chế đề cập đến hóa chất cụ thể, ví dụ hợp chất có chứa guanidin, có khả năng tăng độ thấm của màng đệm, cho phép các hóa chất như các phân tử chuyển vào màng đệm và đạt tới trứng và phôi.

Trứng cá ngựa vằn được ủ trong dung dịch có chứa 1 µM của 10, 20 hoặc 40 KD floescein-dextran với 0 hoặc 40 mM arginin, guanidin-HCl hoặc guanidin-thioxyanat trong 24 giờ.

Kết quả ảnh huỳnh quang chỉ ra rằng arginin, guanidin-HCl và guanidin-thioxyanat làm tăng sự hấp thu của floescein-dextran trong trứng được xử lý bằng 40 mM arginin, guanidin-HCl hoặc guanidin-thioxyanat (trứng đã qua xử lý) trong sự hấp thu trứng được ủ trong các dung dịch chỉ có chứa floescein-dextran nhưng không có hợp chất có chứa guanidin (trứng không được xử lý). Tham chiếu hình 4, trứng đã qua xử lý hấp thu nhiều floescein-dextran hơn trứng không được xử lý được chỉ ra bằng màu xanh huỳnh quang đậm hơn trong trứng đã qua xử lý. Do đó, arginin, guanidin-HCl và guanidin-thioxyanat làm tăng độ thấm của màng đệm.

Thêm vào đó, cả ba kích thước khác nhau (phân tử nặng 10, 20 và 40 KD) của floescein-dextran được hấp thu bởi trứng đã qua xử lý. Theo đó, các phương pháp theo sáng chế ứng dụng cho tất cả động vật thủy sinh đẻ trứng và ứng dụng để chuyển trứng với các phân tử có kích thước khác nhau, bao gồm cả các phân tử nhỏ hơn và lớn hơn.

Ví dụ 2

40 trứng cá ngựa vằn được chuyển vào mỗi khoang của tấm có 48 khoang chứa 300 µl hệ thống bể nước sạch. Sau khi phân trứng, hệ thống nước trong mỗi khoang được thay bằng 300 µl nước chứa 10 hoặc 100 µM poly-arginin (9-arginin polyme). Sau 18 giờ ủ trứng được kiểm tra bằng kính hiển vi huỳnh quang Axioplan 2 (ZEISS, Thornwood, NY, USA). Kính hiển vi được trang bị máy ảnh kỹ thuật số DP70 (Olympus, Center Valley, PA, USA).

Hình 5 minh họa các ảnh hiển vi thu được trong nghiên cứu. Minh hoạ các kết quả ảnh chụp sáng, poly-arginin/9 me (100 µM) nồng độ cao đã tạo ra các tập hợp không đặc chủng tổng hợp trong vòng 1 giờ ủ, mà không thấy trong nhóm được xử lý với 10 µM poly-arginin/9 me. Sau 18 giờ ủ, poly-arginin/9 me (100 µM) nồng độ

cao được tạo ra bởi sự phân tách màng đệm không thấy được trong nhóm được xử lý với 10 µM poly-arginin/9 me.

Ví dụ 3

40 trứng cá ngựa vằn được chuyển vào mỗi khoang của tấm có 48 khoang chứa 300 µl hệ thống bể nước sạch. Sau khi phân trứng, hệ thống nước trong mỗi khoang được thay bằng 300 µl nước chứa 0 hoặc 40 µM poly-arginin (9-arginin polyme) và 1 µM của 10 KD floescein-dextran. Sau 4 giờ ủ trứng được kiểm tra bằng kính hiển vi MZ12 (Leica, Buffalo Grove, USA), hoặc kính hiển vi huỳnh quang Axioplan 2 (ZEISS, Thornwood, NY, USA). Cả hai kính hiển vi được trang bị máy ảnh kỹ thuật số DP70 (Olympus, Center Valley, PA, USA).

Hình 6A-6D minh họa các bức ảnh hiển vi thu được trong nghiên cứu. Tham chiếu hình, poly-arginine làm tăng độ thấm của màng đệm. Trứng cá ngựa vằn được ủ trong các dung dịch chứa 1 µM của 10 KD floescein-dextran với 0 hoặc 40 µM poly-arginin tham chiếu hình 6A và hình 6B. Các kết quả ảnh chụp sáng cho thấy poly-arginin (Hình 6A) đã tạo ra các tập hợp không đặc chủng mà không thấy trong bộ điều khiển (Hình 6B). Hình 6C và hình 6D minh họa các kết quả chụp huỳnh quang cho thấy rằng poly-arginin tăng cường sự hấp thu của floescein-dextran như được chỉ ra bởi màu xanh huỳnh quang đậm hơn trong trứng đã qua xử lý với poly-arginin (Hình 6C) so với trứng kiểm soát (Hình 6D).

Ví dụ 4

Dendrimeric octaguanidin với phần tử trung gian triazin còn được gọi là Vivo, được liên hợp tới cá ngựa vằn có chứa *dnd*-MO, được sử dụng trong việc ngâm chứa phôi cá ngựa vằn trong nước. Khả năng của các phương pháp theo sáng chế để gây ra vô sinh trong cá ngựa vằn đã được kiểm tra bằng cách truyền những chất sau:

A: *dnd*-MO-Vivo 60 µM trong 0,5 giờ, 40 µM trong 2 giờ, 20 µM trong 3 giờ, 10 µM trong 4,5 giờ và 5 µM trong 14 giờ, bắt đầu truyền tại thời điểm bắt đầu kích hoạt nước và nước cứng (ngay sau khi thụ tinh);

B: dung dịch chỉ chứa nước để kiểm soát;

C: *dnd*-MO-Vivo 60 µM trong 0,5 giờ, 40 µM trong 2 giờ, 20 µM trong 3 giờ, 10 µM trong 4,5 giờ và 5 µM trong 14 giờ, bắt đầu truyền tại thời điểm một tiếng sau khi thụ tinh.

Trong cá ngựa vằn, sự kích thích vô sinh chỉ có thể đạt được khi *dnd*-MO-Vivo được truyền ngay lập tức khi bắt đầu kích hoạt nước và nước cứng. Nếu *dnd*-MO-Vivo được truyền 1 giờ sau khi kích hoạt nước chỉ đạt khoảng 44 đến 59% cá được xử lý vô sinh (Bảng 1).

BẢNG 1

	A1	A2	B1	B2	C1	C2
phôi tồn tại đến 2 dpf (ngày sau thụ tinh)	41	40	52	50	45	47
thu được cá trưởng thành	28	32	39	43	34	29
tỉ lệ cá trưởng thành sống	50%	57%	69%	76%	60%	51%
số lượng cá đực	0	0	16	15	12	9
số lượng cá cái	0	0	23	28	7	3
số lượng cá vô sinh	28	32	0	0	15	17
% cá vô sinh	100%	100%	0%	0%	44%	59%
Trung bình % cá vô sinh		100%		0%		52%

Ví dụ 5

Dendrimeric octaguanidin với phần tử trung gian triazin, còn được gọi là Vivo, được liên hợp tới cá hồi có chứa *dnd*-MO, 5'-CTGACTTGAACGCTCCTCCATTATC-3' (SEQ ID NO. 3) và được sử dụng trong việc ngâm chứa phôi cá hồi cầu vồng trong nước, hoặc trứng không được thụ tinh trong dịch buồng trứng hoặc chất pha loãng thụ tinh. Khả năng của các phương pháp theo sáng chế để gây ra vô sinh trong cá hồi cầu vồng đã được kiểm tra bằng cách truyền những chất sau:

I: Cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo 10 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng đã thụ tinh tại thời điểm bắt đầu kích hoạt nước (trong vòng 1 phút)

II: Cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo 10 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng không được thụ tinh với môi trường ngâm của dịch buồng trứng. Việc thụ tinh được thực hiện sau 48 giờ ủ.

III: Cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo 10 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng không được thụ tinh với chất pha loãng thụ tinh chứa muối, Tris (độ pH 8,0), Glyxin, và 5% huyết thanh cá. Việc thụ tinh được thực hiện sau 48 giờ ủ.

IV: Nước hoặc môi trường ngâm không có *dnd*-MO-Vivo như chất kiểm soát.

Hình 7A-7G minh họa việc xử lý cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo dẫn đến cá hồi cầu vồng vô sinh. (Hình 7A) tinh hoàn phát triển tốt của cá đực không được xử lý từ bước IV; (Hình 7B) buồng trứng phát triển tốt của cá cái không được xử lý từ bước IV; (Hình 7C) tinh hoàn của cá hồi đã được xử lý với cá hồi có chứa 10 µM *dnd*-MO-Vivo được xử lý từ các bước I, II và III, phát triển thành mô mỏng giống như sợi; (Hình 7D) hình ảnh hiển vi của các tuyến sinh dục bị cắt; (Hình 7E) sự hình thành tinh trùng hoạt tính của tinh hoàn của cá đực kiểm soát không được xử lý (bước IV); (Hình 7F) buồng trứng phát triển tốt của cá cái kiểm soát không được xử lý với noãn bào (bước IV) ở các giai đoạn phát triển khác nhau; (Hình 7G) các thí nghiệm mô học của mô sinh dục cho thấy tinh hoàn của cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo được xử lý (bước I, II và III) dường như kém phát triển không có cấu trúc sinh dục hoàn thiện hoặc tế bào mầm phôi.

Ví dụ 6

Cá hồi có chứa *dnd*-MO (xem ví dụ 5) hoặc dendrimeric octaguanidin với phần tử trung gian triazin còn được gọi là Vivo, được liên hợp tới cá hồi có chứa *dnd*-MO, dẫn đến cá hồi dnd-*MO, được sử dụng để gây ra vô sinh ở cá hồi Đại Tây Dương và đã được kiểm tra bằng cách truyền các chất sau đây:*

I: Cá hồi có chứa *dnd*MO-Vivo 10 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng đã thụ tinh tại thời điểm bắt đầu kích hoạt nước (trong vòng 1 phút)

II: Cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo 10 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng không được thụ tinh với môi trường ngâm của dịch buồng trứng. Trứng đã thụ tinh sau 48 giờ ủ.

III: Cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo 10 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng không được thụ tinh với môi trường ngâm chứa muối, Tris (độ pH 8,0), Glyxin, và 5% huyết thanh cá. Việc thụ tinh được thực hiện sau 48 giờ ủ.

IV: Cá hồi có chứa *dnd*-MO 20 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng không được thụ tinh với môi trường ngâm của dịch buồng trứng. Trứng đã thụ tinh sau 48 giờ ủ.

V: Cá hồi có chứa *dnd*-MO 20 µM trong 48 giờ, truyền vào trứng không được thụ tinh với môi trường ngâm chứa muối, Tris (độ pH 8,0), Glyxin, và 5% huyết thanh cá. Trứng đã thụ tinh sau 48 giờ ủ.

VI: Nước hoặc môi trường ngâm không có cá hồi có chứa *dnd*-MO-Vivo cũng như *dnd*-MO như chất kiểm soát.

Hình 8A-8D minh hoạ cá hồi có chứa *dnd*-MO hoặc *dnd*-MO-Vivo ngăn chặn sự phát triển tuyến sinh dục ở cá hồi Đại Tây Dương. Trong cá hồi Đại Tây Dương 10 tháng tuổi, (Hình 8A) tinh hoàn phát triển của cá đực không được xử lý (bước VI); (Hình 8B) buồng trứng đang phát triển của cá cái không được xử lý (bước VI); (Hình 8C) các tuyến sinh dục của cá đã xử lý bằng *dnd*-MO-Vivo hoặc *dnd*-MO đã phát triển thành mô mỏng giống như sợi; (Hình 8D) hình ảnh hiển vi của các tuyến sinh dục bị cắt bỏ từ (Hình 8A), (Hình 8B) và (Hình 8C).

Mặc dù việc bộc lộ đã được đề cập liên quan đến các khía cạnh, các đặc trưng và các phương án minh hoạ cụ thể, nó sẽ được đánh giá rằng lợi ích của việc bộc lộ không hạn chế, mà mở rộng đến và bao gồm nhiều biến thể, sửa đổi và các phương án thay thế khác, sẽ đề cập đến những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực theo sáng chế, dựa trên mô tả ở đây. Tương tự như vậy, sáng chế với yêu cầu bảo hộ như sau đây nhằm được hiểu và giải thích theo nghĩa rộng, bao gồm tất cả các biến thể, sửa đổi và các phương án thay thế, theo tinh thần và phạm vi của nó.

Ứng dụng công nghiệp

Sáng chế đề cập đến phương pháp đưa hóa chất vào trứng/phôi của các động vật thuỷ sinh sử dụng hợp chất có chứa guanidin để tăng độ thấm của màng đệm của trứng. Việc truyền thuốc thử hoặc hoạt chất có khả năng sinh học vào trứng/phôi của các động vật thuỷ sinh như cá ngựa vằn, cung cấp cơ hội sàng lọc và đánh giá hoạt động và/hoặc độc tính của các chất thử.

Các phương pháp và các hợp chất theo sáng chế còn đề cập đến việc sản xuất cá và động vật thuỷ sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản. Triệt sản (gây ra vô sinh) ở cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi làm tăng tỷ lệ phát triển của chúng bằng cách chuyển đổi năng lượng từ thức ăn để tăng trưởng cơ, thay vì phát triển tuyến sinh dục. Ngoài ra, nếu thoát khỏi nơi nuôi trồng thủy sản ra môi trường, cá và động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi vô sinh, bao gồm các loài đã được thuần hoá, không phải các loài không tự nhiên hoặc biến đổi gen, sẽ không thể tái sinh sản hoặc giao phối với các loài tự nhiên. Điều này sẽ giúp ngăn chặn sinh học và ngăn ngừa sự ô nhiễm di truyền của các loài tự nhiên và/hoặc sự thành lập của cá nuôi, các loài không tự nhiên hoặc biến đổi gen cá và các động vật thủy sinh đẻ trứng được nuôi trong môi trường tự nhiên.

YÊU CẦU BẢO HỘ

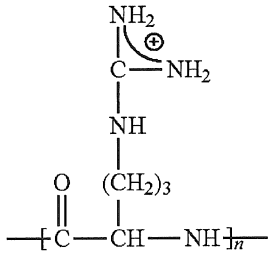
1. Phương pháp đưa ít nhất một chất vào trứng từ động vật thủy sinh đẻ trứng, phương pháp này bao gồm bước cho trứng tiếp xúc với ít nhất một chất với sự có mặt của hợp chất chứa guanidin hữu hiệu để gia tăng tính thấm của màng đệm của trứng, trong đó trứng được cho tiếp xúc với ít nhất một chất trong môi trường ngâm chứa ít nhất một chất và hợp chất chứa guanidin và trong đó hợp chất chứa guanidin

(a) bao gồm arginin hoặc muối của nó; hoặc

(b) là guanidin hoặc muối của nó được chọn từ nhóm gồm guanidin-HCl, guanidin-thioxyanat, guanidin-axetat, guanidin-cacbonat, guanidin-nitrat, guanidin-sulfat, guanidin-bicacbonat, và guanidin-hydrobromua; hoặc

(c) bao gồm dime, trime hoặc polyme của guanidin hoặc arginin được chọn từ các hợp chất có công thức chung từ (I) đến (IV),

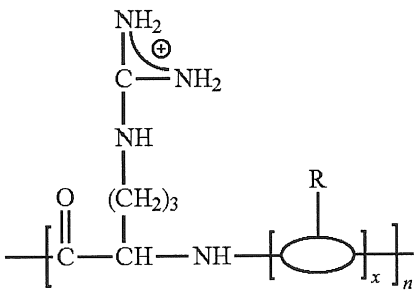
trong đó hợp chất có công thức chung (I) được chọn từ dime arginin và poly-arginin liền kề, có công thức:



(I)

trong đó: n≥2;

trong đó hợp chất có công thức chung (II) được chọn từ dime của hợp chất arginin-đoạn liên kết và hợp chất poly-arginin-đoạn liên kết được đặt cách nhau, có công thức:



(II)

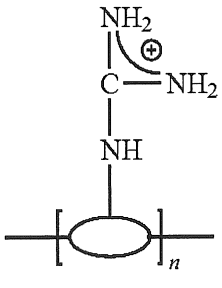
trong đó: n≥2;

o là đoạn liên kết chính có thể thay đổi và là axit amin, nucleotit, phosphoramidat, glycol, polyetylen glycol, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

X≥2; và

R là các nhóm có thể thay đổi và là nguyên tử hydro, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc mạch thẳng hoặc mạch nhánh C_1-C_4 alkyl thấp hoặc gốc C_1-C_4 alkenyl, tùy ý được thế bằng một hoặc hai gốc được chọn từ: hydroxyl, amino, dimetylamino, metoxy, etoxy, carboxyl, carboxamit, N-metylcarboxamit hoặc SO_3H, hoặc muối của nó;

trong đó hợp chất có công thức chung (III) được chọn từ dime của hợp chất guanidin-đoạn liên kết và hợp chất poly-guanidin-đoạn liên kết liền kề, có công thức:

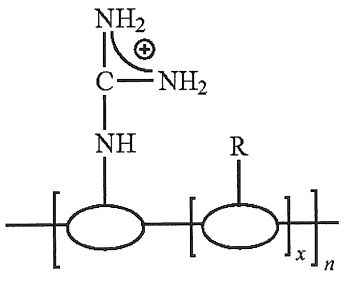


(III)

trong đó: n≥2; và

o là đoạn liên kết chính có thể thay đổi và là axit amin, nucleotit, phosphoramidat, glycol, polyetylen glycol, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh; và

trong đó hợp chất có công thức chung (IV) được chọn từ dime của hợp chất guanidin-đoạn liên kết và hợp chất poly-guanidin-đoạn liên kết được đặt cách nhau, có công thức:



(IV)

trong đó: n≥2;

o là đoạn liên kết chính có thể thay đổi và là axit amin, nucleotit, phosphoramidat, glycol, polyetylen glycol, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

X≥2; và

R là các nhóm có thể thay đổi và là nguyên tử hydro, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc gốc C_1-C_4 alkenyl, tùy ý được thế bằng một hoặc hai gốc được chọn từ: hydroxyl, amino, dimetylamino, metoxy, etoxy, carboxyl, carboxamit, N-metylcarboxamit hoặc SO_3H, hoặc muối của nó.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó nồng độ của hợp chất chứa guanidin trong môi trường ngâm nằm trong khoảng từ 1 đến 80,000 μM.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất chứa guanidin bao gồm arginin hoặc muối của nó.

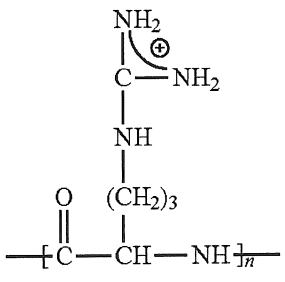
4. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất chứa guanidin là arginin.

5. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất chứa guanidin là guanidin.

6. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất chứa guanidin là guanidin-HCl, guanidin-thioxyanat, guanidin-axetat, guanidin-cacbonat, guanidin-nitrat, guanidin-sulfat, guanidin-bicacbonat, hoặc guanidin-hydrobromua.

7. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất chứa guanidin bao gồm dime, trime hoặc polyme của guanidin hoặc arginin được chọn từ các hợp chất có công thức chung từ (I) đến (IV),

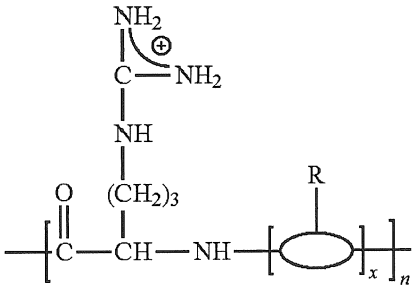
trong đó hợp chất có công thức chung (I) được chọn từ dime arginin và poly-arginin liền kề, có công thức:



(I)

trong đó: n≥2;

trong đó hợp chất có công thức chung (II) được chọn từ dime của hợp chất arginin-đoạn liên kết và hợp chất poly-arginin-đoạn liên kết được đặt cách nhau, có công thức:



(II)

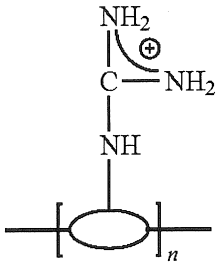
trong đó: n≥2;

o là đoạn liên kết chính có thể thay đổi và là axit amin, nucleotit, phosphoramidat, glycol, polyetylen glycol, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

X≥2; và

R là các nhóm có thể thay đổi và là nguyên tử hydro, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc gốc C_1-C_4 alkenyl, tùy ý được thế bằng một hoặc hai gốc được chọn từ: hydroxyl, amino, dimetylamino, metoxy, etoxy, carboxyl, carboxamit, N-metylcarboxamit hoặc SO_3H, hoặc muối của nó;

trong đó hợp chất có công thức chung (III) được chọn từ dime của hợp chất guanidin-đoạn liên kết và hợp chất poly-guanidin-đoạn liên kết liền kề, có công thức:



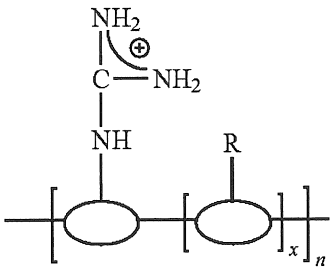
(III)

trong đó: n≥2; và

o là đoạn liên kết chính có thể thay đổi và là axit amin, nucleotit, phosphoramidat,

glycol, polyetylen glycol, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh; và

trong đó hợp chất có công thức chung (IV) được chọn từ dime của hợp chất guanidin-đoạn liên kết và hợp chất poly-guanidin-đoạn liên kết được đặt cách nhau, có công thức:



(IV)

trong đó: n≥2;

o là đoạn liên kết chính có thể thay đổi và là axit amin, nucleotit, phosphoramidat, glycol, polyetylen glycol, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

X≥2; và

R là các nhóm có thể thay đổi và là nguyên tử hydro, nitro, amino, xyano, phenyl, xyclohexyl, benzyl, hoặc C_1-C_4 alkyl thấp mạch thẳng hoặc mạch nhánh hoặc gốc C_1-C_4 alkenyl, tùy ý được thế bằng một hoặc hai gốc được chọn từ: hydroxyl, amino, dimetylamino, metoxy, etoxy, carboxyl, carboxamit, N-metylcarboxamit hoặc SO_3H, hoặc muối của nó.

8. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất chứa guanidin là poly-arginin/9 me.

9. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một chất được chọn từ nhóm gồm kháng thể, protein, peptit, ARN, và ADN.

10. Phương pháp theo điểm 1, trong đó ít nhất một chất là oligome Morpholino đối nghĩa hữu hiệu để ngăn chặn sự biểu hiện của gen cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

11. Phương pháp theo điểm 10, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ngăn chặn sự biểu hiện của gen thụ thể dead end, nanos, vasa, gnrh hoặc fsh ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

12. Phương pháp theo điểm 11, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ngăn chặn sự biểu hiện của gen dead end ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

13. Phương pháp theo điểm 1 để sản xuất động vật thủy sinh đẻ trứng không có khả năng sinh sản, trong đó chất đã nêu là oligome Morpholino đối nghĩa hữu hiệu để chuyển nhiễm trứng và khiến cho các cá thể được tạo ra từ nó không có khả năng sinh sản.

14. Phương pháp theo điểm 13, trong đó trứng đã được thụ tinh hoặc trứng chưa được thụ tinh của cá được chọn từ nhóm gồm cá hồi, cá vược, và cá rô phi.

15. Phương pháp theo điểm 13, trong đó trứng đã nêu là trứng đã được thụ tinh và phương pháp này bao gồm bước cho trứng đã được thụ tinh tiếp xúc ngay sau khi thụ tinh và bao gồm giai đoạn hoạt hóa nước và làm cứng nước với oligome Morpholino đối nghĩa hữu hiệu để chuyển nhiễm trứng và khiến cho các cá thể được tạo ra từ nó không có khả năng sinh sản.

16. Phương pháp theo điểm 13, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa là oligome với trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc biến thể của nó.

17. Phương pháp theo điểm 16, trong đó trứng đã được thụ tinh hoặc trứng chưa được thụ tinh của cá được chọn từ nhóm gồm cá hồi, cá vược, và cá rô phi.

18. Phương pháp theo điểm 17, trong đó trứng là trứng đã được thụ tinh, phương pháp này bao gồm bước cho trứng đã được thụ tinh tiếp xúc ngay sau khi thụ tinh và bao gồm giai đoạn hoạt hóa nước và làm cứng nước với oligome Morpholino đối nghĩa hữu hiệu để chuyển nhiễm trứng và khiến cho các cá thể được tạo ra từ nó không có khả năng sinh sản.

19. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất chứa guanidin được liên kết cộng hóa trị với chất này.

20. Trứng đã được chuyển nhiễm của động vật thủy sinh đẻ trứng thu được bằng phương pháp theo điểm 1, trứng này chứa một lượng được thấm qua màng đệm của ít nhất một chất và một lượng được thấm qua màng đệm của hợp chất chứa guanidin.

21. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 20, trong đó ít nhất một chất bao gồm oligome Morpholino đối nghĩa hữu hiệu để ngăn chặn sự biểu hiện của gen cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

22. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 21 trong đó oligome Morpholino đối

nghĩa ngăn chặn sự biểu hiện của gen thụ thể dead end, nanos, vasa, gnrh orfsh ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

23. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 22, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ngăn chặn sự biểu hiện của gen dead end ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

24. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 23, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa là oligome với trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc biến thể của nó.

25. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 21, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa khiến cho cá thể được tạo ra từ trứng này không có khả năng sinh sản.

26. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 23, trong đó hợp chất chứa guanidin là poly-arginin/9 me.

27. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 20, trong đó hợp chất chứa guanidin được liên kết cộng hóa trị với ít nhất một chất.

28. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 27 trong đó ít nhất một chất đã nêu chứa oligome Morpholino đối nghĩa hữu hiệu để ngăn chặn sự biểu hiện của gen cần thiết cho sự phát triển tuyến sinh dục ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

29. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 28, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ngăn chặn sự biểu hiện của gen thụ thể dead end, nanos, vasa, gnrh hoặc fsh ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

30. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 29, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa ngăn chặn sự biểu hiện của gen dead end ở động vật thủy sinh đẻ trứng.

31. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 30, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa là oligome với trình tự nucleotit SEQ ID NO: 1 hoặc SEQ ID NO: 2 hoặc biến thể của nó.

32. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 30, trong đó hợp chất chứa guanidin là poly-arginin/9 me.

33. Trứng đã được chuyển nhiễm theo điểm 27, trong đó oligome Morpholino đối nghĩa khiến cho cá thể được tạo ra từ trứng này không có khả năng sinh sản.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> UNIVERSITY OF MARYLAND BALTIMORE COUNTY

<120> PHƯƠNG PHÁP ĐƯA HÓA CHẤT VÀO TRỨNG CỦA CÁC ĐỘNG VẬT THUỶ SINH ĐẺ TRỨNG, TRỨNG ĐÃ ĐƯỢC CHUYỂN NHIỄM CỦA ĐỘNG VẬT THỦY SINH THU ĐƯỢC TỪ PHƯƠNG PHÁP NÀY

<130> 4451-268-PCT

<140> Chưa chuyển nhượng
<141> 2016-05-17

<150> US 62/163,511
<151> 2015-05-19

<150> US 62/274,958
<151> 2016-01-05

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 12
<212> ADN
<213> Cá hồi Đại Tây Dương

<400> 1
acgctcctcc at
12

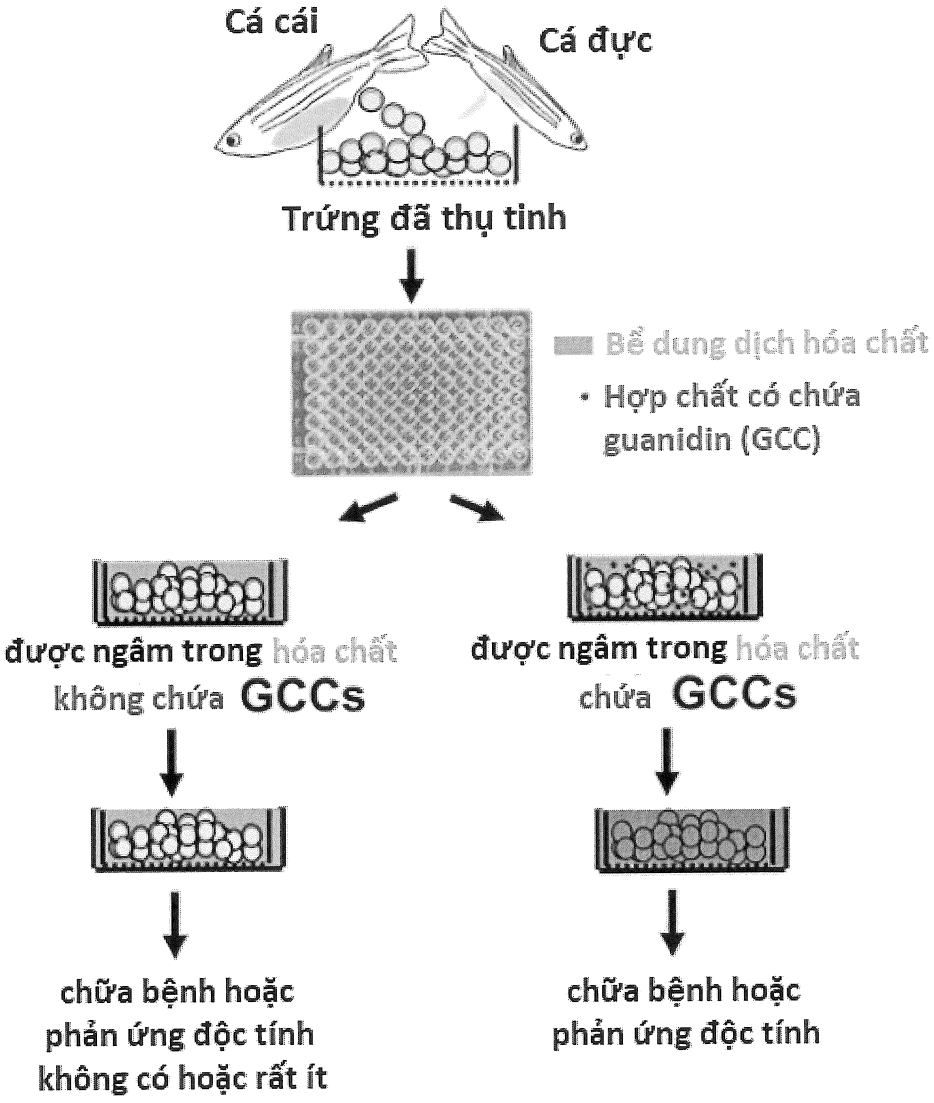
<210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> Cá hồi Đại Tây Dương

<400> 2
acttgaacgc tcctccat
18

<210> 3
<211> 25
<212> ADN
<213> Cá hồi Đại Tây Dương

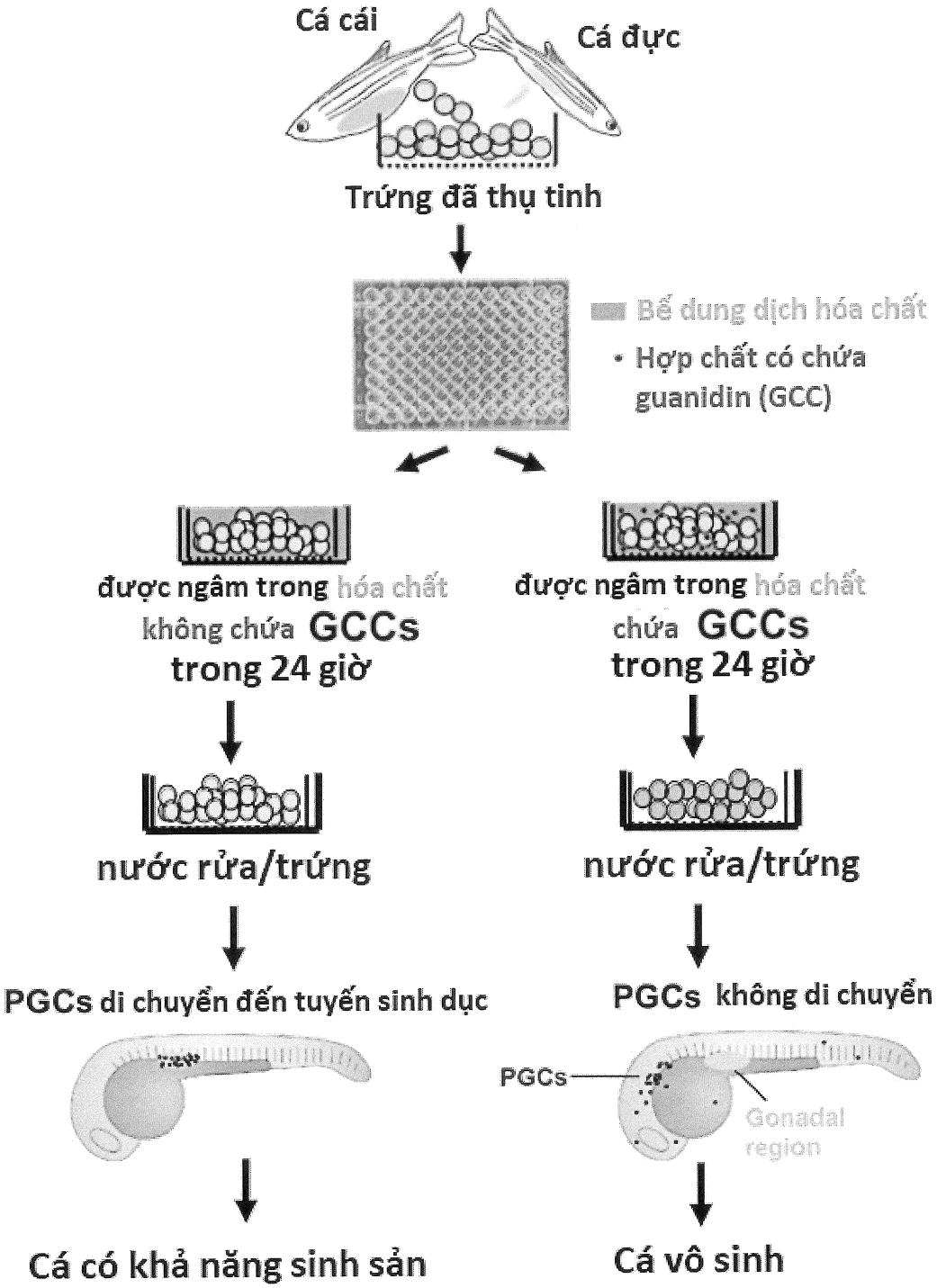
<400> 3
ctgacttgaa cgctcctcca ttatc
25

1/8


Cá cái
Cá đực
Trứng đã thụ tinh
Bể dung dịch hóa chất
• Hợp chất có chứa guanidin (GCC)
được ngâm trong hóa chất không chứa GCCs
được ngâm trong hóa chất chứa GCCs
chữa bệnh hoặc phản ứng độc tính không có hoặc rất ít
chữa bệnh hoặc phản ứng độc tính

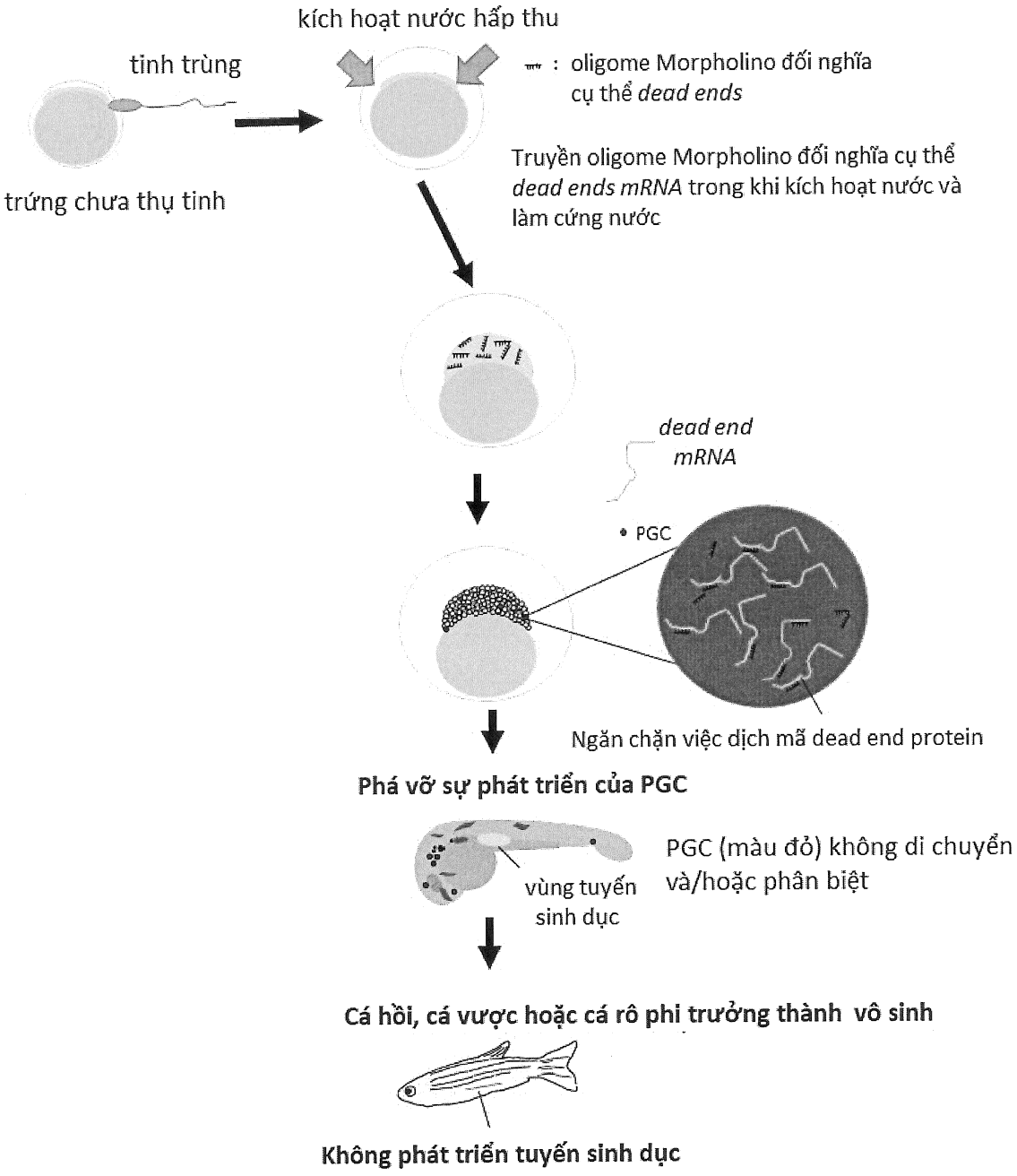
Hình 1

2/8


Cá cái
Cá đực
Trứng đã thụ tinh
Bể dung dịch hóa chất
• Hợp chất có chứa guanidin (GCC)
được ngâm trong hóa chất không chứa GCCs trong 24 giờ
được ngâm trong hóa chất chứa GCCs trong 24 giờ
nước rửa/trứng
nước rửa/trứng
PGCs di chuyển đến tuyến sinh dục
PGCs không di chuyển
PGCs
Gonadal region
Cá có khả năng sinh sản
Cá vô sinh

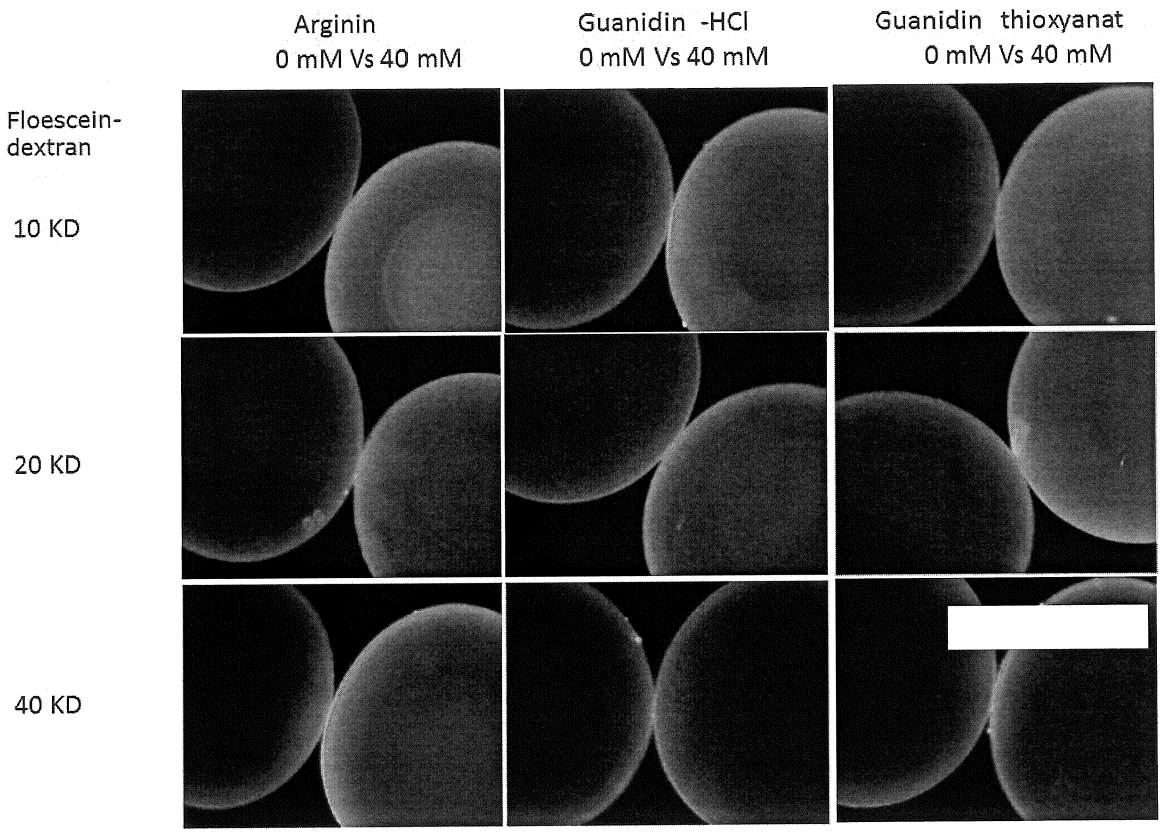
Hình 2

3/8

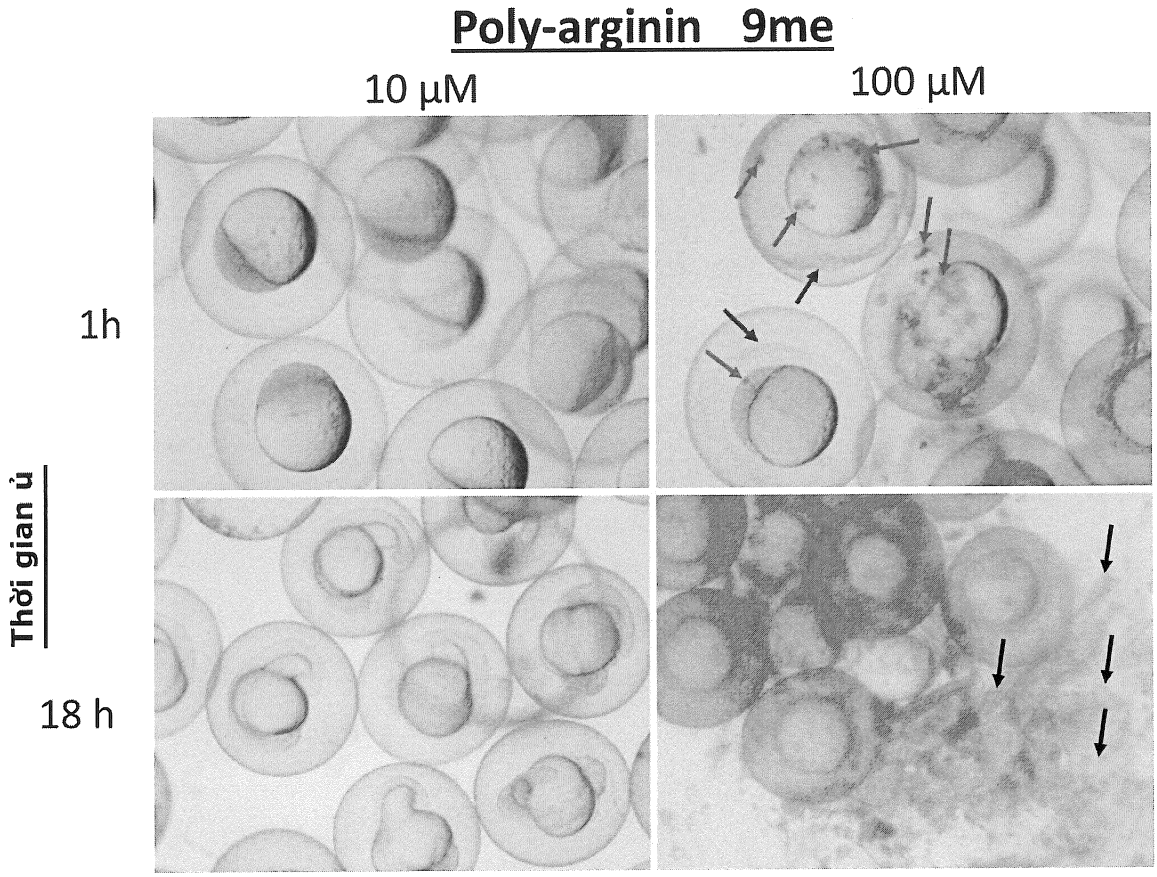

kích hoạt nước hấp thu
tinh trùng
: oligome Morpholino đối nghĩa cụ thể *dead ends*
trứng chưa thụ tinh
Truyền oligome Morpholino đối nghĩa cụ thể *dead ends mRNA* trong khi kích hoạt nước và làm cứng nước
dead end mRNA
PGC
Ngăn chặn việc dịch mã dead end protein
Phá vỡ sự phát triển của PGC
vùng tuyến sinh dục
PGC (màu đỏ) không di chuyển và/hoặc phân biệt
Cá hồi, cá vược hoặc cá rô phi trưởng thành vô sinh
Không phát triển tuyến sinh dục

Hình 3

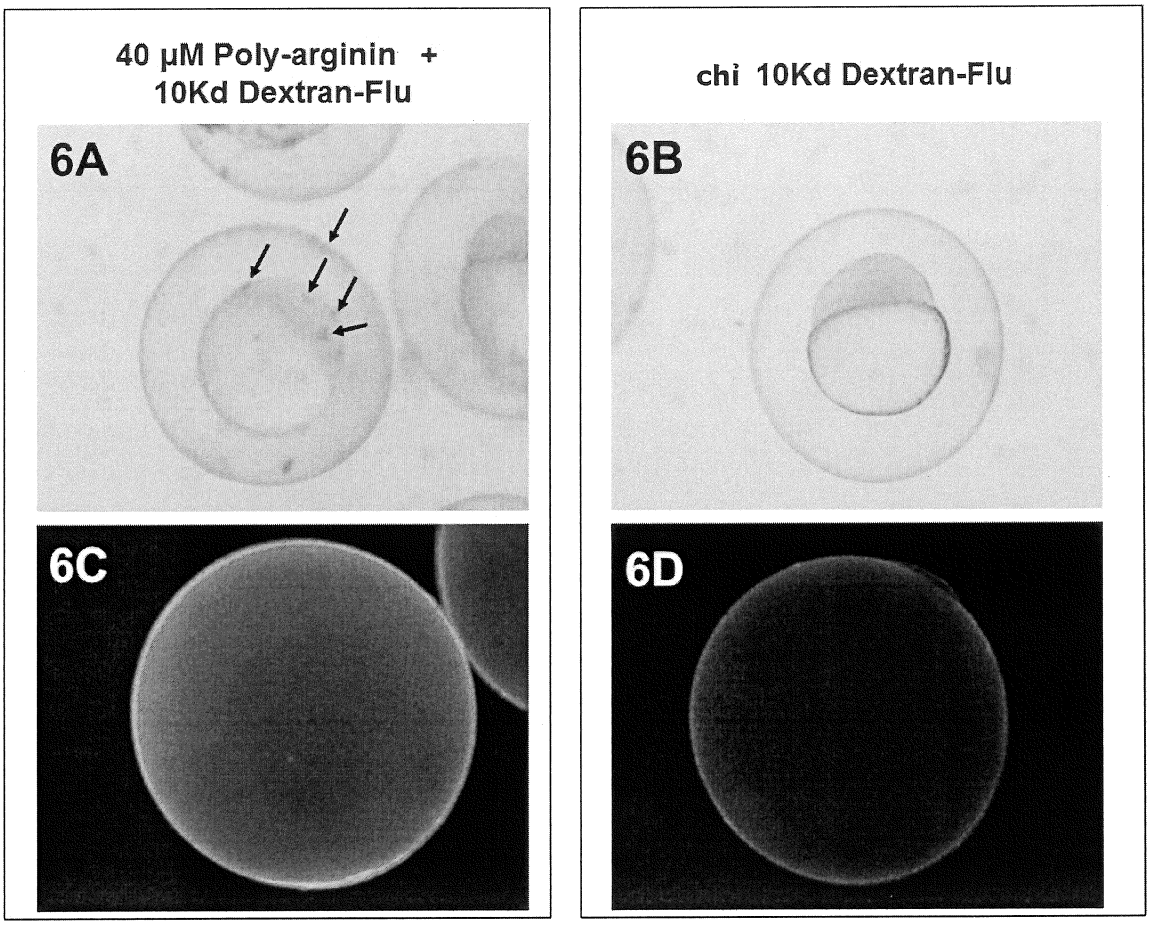
4/8



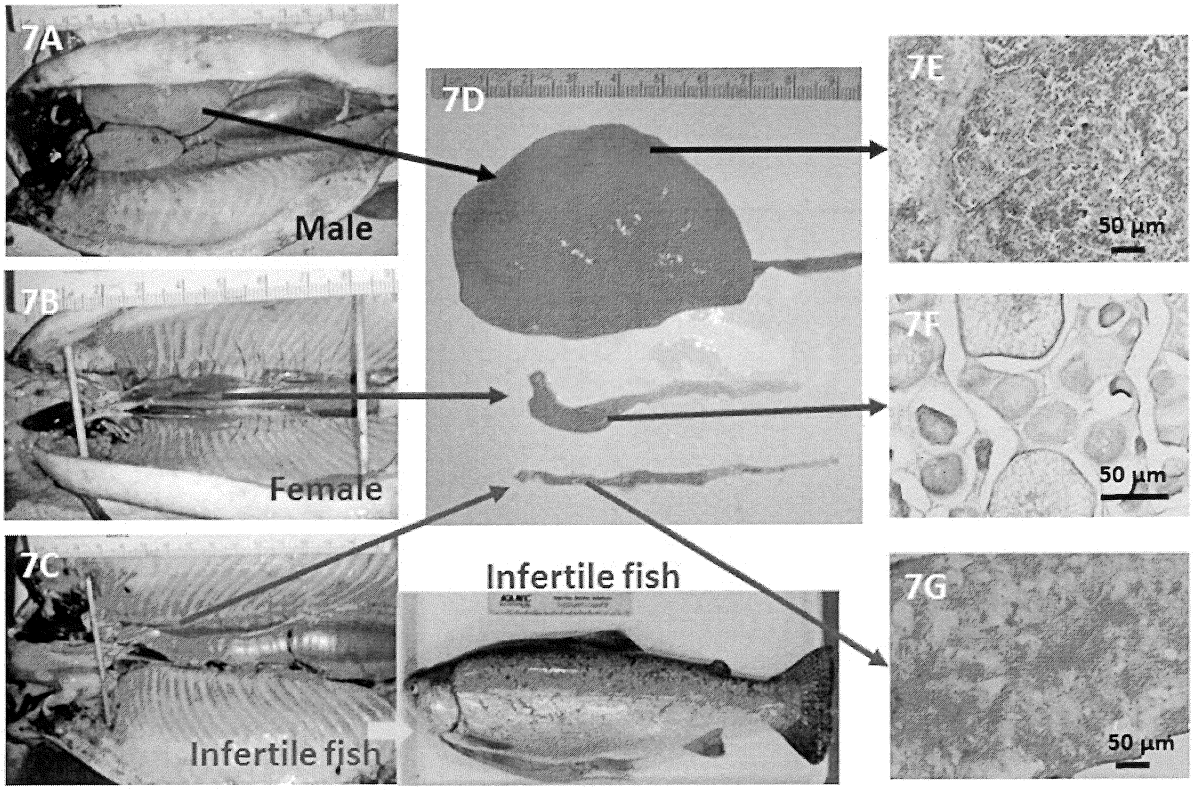
Hình 4



Hình 5


40 µM Poly-arginin +
10Kd Dextran-Flu
6A
chi 10Kd Dextran-Flu
6B
6C
6D

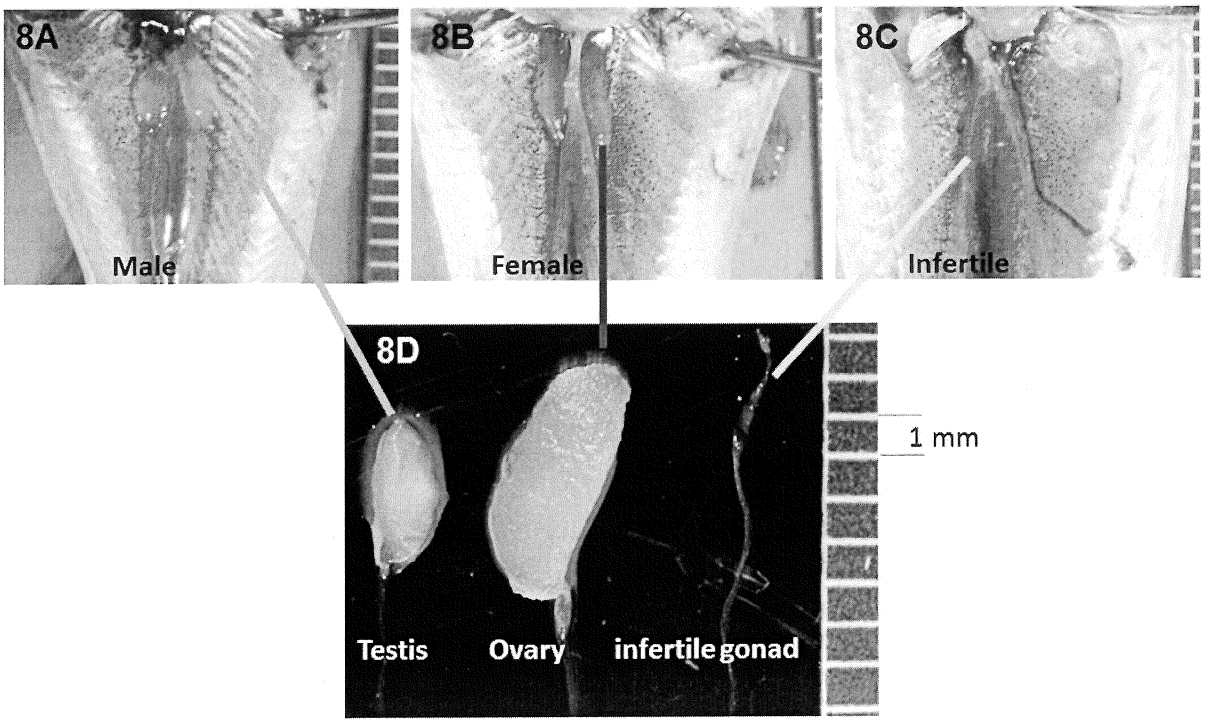
Hình 6A-6D



Trong đó: *Male: cá đực* *Female: cá cái*

Infertile fish: cá vô sinh

Hình 7A-7G



Trong đó:

Male: cá đực

Female: cá cái

Infertile fish: cá vô sinh

Testis: tinh hoàn

Ovary: buồng trứng

Infertile gonad: tuyến sinh dục không có khả năng sinh sản

Hình 8A-8D