

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **228227**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413124**

(51) Int.Cl.
C12N 1/36 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **14.07.2015**

(54) **Sposób eliminacji endogennych pierwotnych komórek płciowych zarodków kurzych z użyciem emulsji treosulfanu, jako metody częściowej sterylizacji zarodków kurzych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
16.01.2017 BUP 02/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.02.2018 WUP 02/18

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet
TECHNOLOGICZNO-PRZYRODNICZY
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY, Bydgoszcz, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PAWEŁ ŁAKOTA, Twardowo, PL
IZABELA KOZŁOWSKA, Wójcina, PL
MAREK BEDNARCZYK, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Jankowski

PL 228227 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób eliminacji endogennych pierwotnych komórek płciowych (ang. primordial germ cells – PGCs) zarodków kurzych z użyciem emulsji treosulfanu, jako metody częściowej sterylizacji embrionów. Wysterylizowane zarodki kurze mogą przede wszystkim posłużyć jako biorcy egzogennych pierwotnych komórek płciowych – niezmienionych bądź genetycznie modyfikowanych, co doprowadzi do uzyskania chimer płciowych, które mogą znaleźć zastosowanie w badaniach transgenicznym (np. w biotechnologii medycznej i farmaceutycznej – do testowania działania *in vivo* konstruktów genowych z promotorami tkankowo specyficznymi wbudowanymi w egzogenne PGCs oraz do otrzymywania białek terapeutycznych *in vivo* w komórkach wydzielniczych kury, w bio-konserwacji zagrożonych gatunków ptaków (np. do sztucznej generacji zagrożonych gatunków przez wprowadzenie ich PGCs do wysterylizowanych zarodków kurzych i tym samym „produkcji” osobników tych gatunków przez kury), oraz w hodowli zwierząt i przemyśle mięsny (np. do zmiany proporcji płci poprzez wcześniejsze seksowanie egzogennych PGCs), a także jako narzędzie do zrozumienia złożonych mechanizmów rozwoju zarodkowego ptaków.

Wynalazek dotyczy sposobu częściowej sterylizacji zarodków kurzych z wykorzystaniem emulsji treosulfanu, co wpisuje się w nauki biotechnologii rolniczej, zaś zastosowanie wynalazku odnosi się do dziedzin takich jak biotechnologia medyczna, farmakologia, nauki biologiczne i zachowanie bioróżnorodności, oraz hodowla i produkcja zwierzęca.

Zlokalizowane w rozwijającym się kurzym embrionie pierwotne komórki płciowe, to jedyny rodzaj komórek zdolny do przekazywania informacji zapisanych w materiale genetycznym na następne pokolenia. Mogą być one izolowane, hodowane w warunkach *in vitro* oraz podlegać genetycznym modyfikacjom przy zachowaniu potencjału do tworzenia linii płciowych. Wykazano między innymi, że PGCs mogą być izolowane z zarodka dawcy, przenoszone do zarodka biorcy i tworzyć w nim w pełni sprawne komórki płciowe. Zjawisko to znalazło zastosowanie w produkcji ptaków transgenicznym z wykorzystaniem chimer płciowych, a dodatkowe modyfikacje genetyczne kurzych PGCs mogą wpłynąć na poprawę produkcji drobiarskiej, a nawet oferować doskonale narzędzie do produkcji białek terapeutycznych dla ludzi. Jednym z najważniejszych czynników determinujących efektywność uzyskiwania chimer oraz transgenicznego potomstwa, jest stosunek wprowadzonych PGCs (populacja egzogenna) do całkowitej liczby PGCs w gonadach biorców (populacja endogenna). Stosunek ten można modyfikować przez eliminację PGCs w gonadach zarodków biorców oraz jednocześnie zwiększenie liczby i potencjału integracyjnego sztucznie wprowadzanych PGCs.

Obecnie znana jest metoda eliminacji PGCs z gonad zarodków kurzych przy użyciu emulsji busulfanu. Jest to środek bardzo toksyczny (również dla ludzi) o właściwościach alkilujących wywołujący w komórkach płciowych uszkodzenie DNA i proces apoptozy. Oprócz swych właściwości sterylizujących na zarodki kurze, traktowanie busulfanem może powodować wiele efektów ubocznych, takich jak teratogenność, niepłodność oraz śmierć. Efektywność sterylizacji busulfanem jest wysoka, ale bardzo zróżnicowana ze względu na trudność podania stałej dawki cytostatyku do zarodka. Szczególnym utrudnieniem jest fakt, iż busulfan nie rozpuszcza się w wodzie oraz w środkach na bazie wody, co wymaga przeprowadzenia pracochłonnej, kosztocłonnej, i trudnej emulsyfikacji z postaci stałego proszku do emulsji w specjalnych buforach oraz mikrofiltrach- ciągle jednak są to mikrodrobiny nierozpuszczalne w wodzie. Istnieje również uzasadnione ryzyko, iż resztki busulfanu pozostające w embrionie mogą spowodować apoptozę egzogennych PGCs, co znacznie utrudnia uzyskanie chimer płciowych, gdyż większość wprowadzonych PGCs w wyniku działania resztek cytostatyku ulega zniszczeniu. Wspomniana nierozpuszczalność busulfanu przysparza także wielu problemów natury technicznej, jak zapychanie mikroigieł iniekcyjnych i mechaniczne uszkodzenie komórek tarczki zarodkowej przez mikrodrobiny treosulfanu.

Strukturalny analog busulfanu-treosulfan wydaje się być jego doskonałą alternatywą w chemio-sterylizacji zarodków kurzych ze względu na niską toksyczność, dobrą rozpuszczalność w wodzie oraz przede wszystkim ze względu na wysoką skuteczność w eliminacji endogennych PGCs. Treosulfan został zsyntetyzowany w latach sześćdziesiątych i znalazł zastosowanie jako lek o właściwościach antynowotworowych. W przeciwieństwie do busulfanu jego toksyczność jest umiarkowana. Wykazuje on właściwości alkilujące – uszkodza DNA i hamuje podziały szybko namnażających się komórek. Dowiedzono również, iż hamuje proces spermatogenezy u osobników męskich oraz zaburza cykl u osobników żeńskich.

Do tej pory nie zbadano treosulfanu pod kątem możliwości zastosowania go do eliminacji endogennych PGCs u zwierząt (a tym bardziej u kur). Poniżej po raz pierwszy przedstawiono takie zastosowanie.

Istotą sposobu wg wynalazku jest zastosowanie po raz pierwszy substancji, wcześniej wykorzystywanej wyłącznie jako lek w terapiach nowotworowych u ludzi oraz użycie modelu wysterylizowanego zarodka o wysokim potencjale transmisji germinacyjnej do badań transgenicznych celem produkcji ludzkich leków terapeutycznych w jajowodzie kury. Sposób pozwala na otrzymanie częściowo wysterylizowanych zarodków kurzych przy użyciu emulsji cytostatyku treosulfanu, poprzez zastosowanie kolejno po sobie procedur i czynników prowadzących do eliminacji endogennych pierwotnych komórek płciowych z gonad zarodków kurzych, poprzez sporządzenie roztworu treosulfanu z wykorzystaniem Aqua pro injectione, sporządzenie emulsji roztworu treosulfanu w oleju sezamowym, inkubację emulsji w temperaturze 37–39°C, następnie wprowadzenie emulsji cytostatyku do jamy podzarodkowej lub kuli żółtkowej, zapłodnionych jaj kurzych a następnie inkubacji jaj przez okres 3–3,5 dób w temperaturze 37,8°C i wilgotności 62–65%, następnie otrzymane zarodki służą do produkcji chimer płciowych metodą wprowadzania egzogennych PGCs do krwiobiegu zarodków kurzych w 3–3,5 dobie rozwoju.

Emulsja cytostatyku treosulfanu wprowadzana jest do zapłodnionych jaj kurzych celem eliminacji endogennych PGCs, na dwa sposoby. Sposób pierwszy (A) polega na iniekcji pod tarczkę zarodkową do jamy podzarodkowej, natomiast sposób drugi (B) na wstrzyknięciu do kuli żółtkowej.

Procedurę sterylizacji rozpoczyna się od przygotowania jaj i rozcieńczeń treosulfanu. Zapłodnione jaja kurze inkubuje się w temperaturze pokojowej przez 2–3 dni w celu ustabilizowania się pozycji tarczki zarodkowej. W zależności od sposobu wprowadzenia emulsji treosulfanu jaja przechowuje się na dwa sposoby w pierwszym A – tępym końcem do góry, w sposobie drugim B w pozycji horyzontalnej. Po tym czasie, jaja czyści się, dezynfekuje roztworem penicyliny i streptomycyny w wodzie destylowanej w proporcjach 1:10) a następnie skorupy otwiera się w zależności od metody wprowadzania emulsji cytostatyku – A przy pomocy szlifierki kątovej nawiercając się otwór w szczytowej części tępego końca jaja o średnicy ok. 1 cm celem uwidocznienia tarczki zarodkowej (należy uważać, aby nie uszkodzić wewnętrznej błony witelinowej); lub B poprzez nakłucie skorupki ostrego końca jaja przy pomocy igły korzystnie 0,9 x 40 mm. Następnie przygotowuje się rozcieńczenia treosulfanu (1000 mg; Ovostat®; Medac). W tym celu tworzy się sterylny stock o koncentracji 100 mg/ml poprzez dodanie do oryginalnie zapakowanego treosulfanu dziesięciu mililitrów sterylnej Aqua pro injectione i intensywnie mieszamy przez 20–30 min w temperaturze 35–40°C, aż do całkowitego rozpuszczenia cytostatyku. Uzyskany w ten sposób roztwór rozcieńcza się od 200–400 krotnie sterylnym olejem sezamowym, a otrzymaną emulsję podgrzewa się do temperatury 37–39°C.

Właściwą procedurę sterylizacji przeprowadza się poprzez wstrzyknięcie emulsji 200–400 krotnie rozcieńczonego treosulfanu następującymi metodami: A – pod tarczkę zarodkową do jamy podzarodkowej w ilości 1–2 µl emulsji/jajo, przy użyciu szklanych mikrokapilar i zestawu do mikromanipulacji wyposażonego w mikropompę iniekcyjną; B – do kuli żółtkowej za pomocą strzykawki i igły 0,6 x 25 mm i objętości 40–60 µl emulsji/jajo. Wprowadzony cytostatyk hamuje namnażanie się PGCs i doprowadza do ich apoptozy poprzez uszkodzenie DNA spowodowane procesem alkilacji.

Otwory iniekcyjne w skorupkach zakleja się parafilmem, a jaja kieruje się do 3–3,5 dniowej inkubacji w aparacie wylęgowym, w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62–65%. Po tym czasie zarodki pozbawione endogennych PGCs przeznaczone są do produkcji chimer płciowych metodą iniekcji pierwotnych komórek płciowych pobranych od zarodków dawców i wprowadzonych do krwiobiegu 3–3,5 dobowych, częściowo wysterylizowanych zarodków biorców.

Sposób według wynalazku umożliwia wykorzystanie substancji czynnej w postaci treosulfanu do eliminacji endogennych PGCs zarodków kurzych. W znanych do tej pory sposobach chemicznej sterylizacji zarodków kurzych (busulfan) nie uzyskano dotychczas ich wysokiej sterylności przy zachowaniu zadowalającej przeżywalności zarodków.

Sposób umożliwia rutynowe sterylizowanie zarodków kurzych w kierunku uzyskania zarodków biorców do produkcji kurcząt chimer i prowadzenia intensywnych testów, np.: badania zachowania się egzogennych PGCs poddanych allo- i kseno-transplantacjom, procedurom seksowania, a także innym zabiegom, w tym przede wszystkim śledzenia w budowywania się egzogennych PGCs poddanych manipulacjom genetycznym.

Zaletami przedstawionego rozwiązania w stosunku do rozwiązań istniejących są powtarzalność wykonania, łatwość przeprowadzenia procedury (nawet jeżeli nie mamy do dyspozycji sprzętu w postaci mikromanipulatora wykorzystanego w sposobie A, możemy przeprowadzić zabieg sterylizacji

sposobem B, gdzie emulsję treosulfanu wstrzykuje się do jaja za pomocą igły i strzykawki), redukcja kosztów (np. związanych z zakupem odczynników i sprzętu do rozpuszczania innych cytostatyków), większe bezpieczeństwo stosowania (treosulfan wykazuje znacznie mniejszą toksyczność w porównaniu do metod wykorzystujących np. busulfan), mniejsza czaso- oraz pracochłonność (nie wymaga zastosowania specjalnych filtrów do przeprowadzenia rozproszonej emulsyfikacji, gdyż treosulfan z łatwością rozpuszcza się w roztworach na bazie wody), a także innowacyjność – wskazuje na nowy model badawczy, np. do testowania w warunkach *in vivo*, potencjału do wbudowywania się egzogennych PGCs modyfikowanych różnymi metodami genetycznymi.

Dodatkową zaletą metody jest bardzo wysoka przeżywalność zarodków mimo wysokiej ingerencji w integralność tarczki zarodkowej – szczególnie w przypadku sposobu A (do ok. 25% niższa przeżywalność zarodków niż w przypadku grupy kontrolnej), wysoki stopień eliminacji endogennych PGCs (nawet 10 razy mniej niż w grupie kontrolnej), zwiększony potencjał transmisji germinacyjnej w przypadku badań transgenicznych oraz brak wpływu na wystąpienie anomalii rozwojowych w dalszych etapach rozwoju zarodkowego. Ponadto zaletą jest to, iż materiałem wyjściowym do sterylizacji są zapłodnione jaja kurze, a nie same zarodki co wpływa na etykę pracy.

Sposób wg wynalazku przedstawiono szczegółowo w przykładach realizacji

Przykład 1

Wykorzystanie wynalazku jako modelu *in vivo* do produkcji kurzych chimer płciowych i śledzenia migracji egzogennych PGCs znakowanych fluorochromem PKH26 wprowadzonych do częściowo sterylizowanych zarodków. W tym celu pozyskano częściowo wysterylizowane 3–3,5 dobowe zarodki metodą opisaną powyżej. Równolegle pozyskano PGCs z gonad zarodków dawców w 5,5–6 dobie ich rozwoju. Wyizolowane komórki, w celu możliwości obserwacji ich migracji w rozwijających się chimerach, wyznakowano za pomocą fluorochromu PKH26 według metody opisanej przez producenta. Wyznakowane PGCs iniekowano do krwiobiegu częściowo wysterylizowanych zarodków biorców w ilości 1–2 μ l zawiesiny komórek (liczba PGCs w tej ilości to 400–800 sztuk) na jeden zarodek (kontrolę stanowiły zarodki biorcy niesterylizowane treosulfanem). Zainfekowane zarodki zabezpieczono zaklejając ponownie otwór w jaju parafilmem i przeznaczono do dalszej inkubacji w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62–65% przez kolejne 3–4 doby. Po tym czasie 6–7 dniowe zarodki skierowano do izolacji gonad. Wyizolowane z nich gonady umieszczono w kropli PBS na szkiełku podstawowym i obserwowano pod mikroskopem odwróconym z lampą fluorescencyjną (fotografia 2) w celu detekcji wprowadzonych wyznakowanych PKH26 PGCs (zakres długości fal: 551–567 nm).

Przykład 2

Roztwór treosulfanu w ilości 1 μ l sporządza się z wykorzystaniem Aqua pro injectione o koncentracji 100 mg/ml, a następnie sporządza się emulsję roztworu treosulfanu w sterylnym oleju sezamowym 200x, którą następnie inkubuje się w temperaturze 37°C, przy czym zapłodnione jaja kurze po inkubacji dezynfekuje się roztworem penicyliny i streptomycyny w wodzie destylowanej w proporcjach 1:10, kolejno w skorupie jaja wykonuje się w szczytowej części tępego końca jaja otwór za pomocą igły o wymiarach 0,6 x 25 mm w objętości 40–60 μ l, **a następnie poprzez otwór, roztwór wprowadza się do kuli żółtkowej** zapłodnionych jaj kurzych, następnie otwór zakleja się parafilmem, a jajo poddaje się inkubacji przez 3 doby w temperaturze 37,8°C i wilgotności 62%.

Przykład 3

Roztwór treosulfanu w ilości 2 μ l sporządza się z wykorzystaniem Aqua pro injectione, o koncentracji 100 mg/ml a następnie sporządza się emulsję roztworu treosulfanu w sterylnym oleju sezamowym 400x, którą następnie inkubuje się w temperaturze 39°C, przy czym zapłodnione jaja kurze po inkubacji dezynfekuje się roztworem penicyliny i streptomycyny w wodzie destylowanej w proporcjach 1:10, kolejno w skorupie jaja wykonuje się otwór w szczytowej części tępego końca o średnicy 1 cm, bez przecinania wewnętrznej błony witelinowej, **a następnie poprzez otwór, roztwór wprowadza się do jamy podzarodkowej**, następnie otwór zakleja się parafilmem 2x2 cm, a jajo poddaje się inkubacji przez 3–3,5 doby w temperaturze 37,8°C i wilgotności 65%.

Preparaty wykazały sygnały fluorescencji pochodzącej od sztucznie wprowadzonych znakowanych PGCs. Zarodki z grupy kontrolnej nie różniły się pod względem obecności widocznych, egzogennych PGCs od grupy doświadczalnej, co świadczy na korzyść prezentowanej metody sterylizacji, gdyż uzyskane zarodki chimery płciowe oprócz zredukowanej liczby endogennych PGCs przyjęły poprawnie (tak samo jak zarodki kontrolne) egzogenne znakowane PGCs.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób eliminacji endogennych pierwotnych komórek płciowych zarodków kurzych z użyciem emulsji treosulfanu, jako metody częściowej sterylizacji zarodków kurzych, **znamienny tym**, że roztwór treosulfanu sporządza się z wykorzystaniem Aqua pro injectione, a następnie sporządza się emulsję roztworu treosulfanu w sterylnym oleju sezamowym, którą następnie inkubuje się w temperaturze 37–39°C, przy czym zapłodnione jaja kurze po inkubacji dezynfekuje się roztworem penicyliny i streptomycyny w wodzie destylowanej w proporcjach 1:10, kolejno w skorupie jaja wykonuje się w szczytowej części tępego końca jaja otwór za pomocą igły, a następnie poprzez otwór, roztwór wprowadza się do kuli żółtkowej zapłodnionych jaj kurzych, następnie otwór zakleja się parafilmem, a jajo poddaje się inkubacji przez 3–3,5 doby w temperaturze 37,8°C i wilgotności 62–65%.
2. Sposób eliminacji endogennych pierwotnych komórek płciowych zarodków kurzych z użyciem emulsji treosulfanu, jako metody częściowej sterylizacji zarodków kurzych, **znamienny tym**, że roztwór treosulfanu sporządza się z wykorzystaniem Aqua pro injectione, a następnie sporządza się emulsję roztworu treosulfanu w sterylnym oleju sezamowym, którą następnie inkubuje się w temperaturze 37–39°C, przy czym zapłodnione jaja kurze po inkubacji dezynfekuje się roztworem penicyliny i streptomycyny w wodzie destylowanej w proporcjach 1:10, kolejno w skorupie jaja wykonuje się otwór w szczytowej części tępego końca o średnicy 1 cm, bez przecinania wewnętrznej błony witelinowej, a następnie poprzez otwór, roztwór wprowadza się do jamy podzarodkowej, następnie otwór zakleja się parafilmem, a jajo poddaje się inkubacji przez 3–3,5 doby w temperaturze 37,8°C i wilgotności 62–65%.
3. Sposób według zastrz. 1, 2, **znamienny tym**, że roztwór treosulfanu z wykorzystaniem Aqua pro injectione ma koncentrację 100 mg/ml.
4. Sposób według zastrz. 1, 2, **znamienny tym**, że emulsję roztworu treosulfanu rozcieńcza się olejem sezamowym korzystnie 200–400x.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zapłodnione jaja kurze inkubuje się przed sterylizacją w temperaturze pokojowej przez 2–3 dni w pozycji tępym końcem do góry.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że zapłodnione jaja kurze inkubuje się w pozycji horyzontalnej.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że otwór w skorupie jaj wykonuje się w ostrym końcu jaja przy pomocy igły o wymiarach najkorzystniej 0,9 x 40 mm.
8. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że emulsję treosulfanu wprowadza się przy użyciu mikromanipulatora i mikropompy pod tarczkę zarodkową do jamy podzarodkowej zapłodnionego jaja kurzego w ilości 1–2 µl.
9. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że emulsję treosulfanu wprowadza się do kuli żółtkowej zapłodnionego jaja kurzego za pomocą strzykawki i igły o wymiarach najkorzystniej 0,6 x 25 mm w objętości 40–60 µl.
10. Sposób według zastrzeżeń 1, **znamienny tym**, że jaja podczas wprowadzania emulsji treosulfanu utrzymuje się w pozycji tępym końcem do góry, do momentu przeniesienia ich do inkubatora.
11. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że otwory w zainfekowanych emulsją treosulfanu jajach zakleja się parafilmem o wymiarach najkorzystniej 2x2 cm.

Rysunek

Na załączonym materiale ilustracyjnym przedstawiono gonady wysterylizowanych zarodków biorców z widocznymi PGCs^{PKH26[+]}.

