



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0610764-8 A2**

(22) Data de Depósito: 12/04/2006
(43) Data da Publicação: 09/11/2010
(RPI 2079)



(51) Int.Cl.:

C12N 15/09
A01K 67/02
A61K 45/00
A61P 15/00
A61P 15/08

(54) Título: **PROMOTOR E MÉTODO PARA A INTRODUÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR EM UM OÓCITO DE MAMÍFERO**

(30) Prioridade Unionista: 27/04/2005 JP 2005-129198

(73) Titular(es): JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY

(72) Inventor(es): HIDENORI AKUTSU, KENJI MIYADO, MAMI MIYADO

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT JP2006307772 de 12/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/117991 de 09/11/2006

(57) Resumo: PROMOTOR E METODO PARA A INTRODUÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR EM UM OÓCITO DE MAMÍFERO Pretende-se fornecer um método, pela introdução de uma substância extracelular, tais como um espermatozoide, um núcleo de célula, um ácido nucléico ou uma proteína em um óvulo de mamífero, para a introdução da substância extracelular no óvulo de mamífero, que é segura para o óvulo de mamífero, permite introdução eficiente e é tecnicamente fácil. Pelo tratamento do óvulo de mamífero com um a inibidor de polimerização de tubulina tal como a vinblastina, é promovida a fusão da membrana entre o óvulo e o espermatozoide e sem fazer um orifício na membrana da célula, o espermatozoide e o óvulo são fundidos e pode ser conseguida a fertilização. O método da invenção pode ser aplicado não apenas ao caso em que um espermatozoide é introduzido em um óvulo de mamífero, mas também em um caso em que uma substância extracelular, tais como um núcleo de célula, um ácido nucléico ou uma proteína é introduzido em um óvulo de mamífero.

“PROMOTOR E MÉTODO PARA A INTRODUÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR EM UM OÓCITO DE MAMÍFERO”

A presente invenção refere-se a um promotor para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina e método de introdução em um oócito de mamífero por utilização do promotor de introdução. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um método para a introdução de uma substância extracelular tais como um esperma, um núcleo de célula, um ácido nucléico e uma proteína, em um oócito de mamífero por utilização de um promotor para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo e um promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero a ser usado com o mesmo. Uma característica da invenção é fornecer um método para a promoção de fertilização de um oócito de mamífero, por promoção da introdução de um esperma em um oócito de mamífero, por melhoria da fertilidade de um oócito de mamífero por um tratamento com um promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo.

20 **Técnica Fundamental**

No campo de modificação de mamíferos que usa terapia gênica, tratamento para reprodução ou engenharia de desenvolvimento, a introdução de uma substância extracelular tais como um esperma, um núcleo de célula e ácido nucléico em um oócito de mamífero é conduzida para modificar as células germinativas. Como um método para a introdução de substâncias genéticas (ácido nucléico) em uma célula tal como um oócito de mamífero, um método de introdução que usa vetores tais como retrovírus é conhecido até agora (WO 97/18318). Como um método para a introdução de uma substância extracelular tais como um esperma e um núcleo de célula um

oócito de mamífero, geralmente é usado o método de ICSI (injeção intracitoplásmica de esperma), em que é feito um orifício em um oolema usando-se um capilar de vidro, infundindo assim uma substância extracelular. O método de ICSI também é um método corrente para a introdução de um
5 esperma em um oócito de mamíferos inclusive de um ser humano (Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 5-38345) e que é amplamente usado para tratamento de infertilidade humana.

No entanto, o Método de ICSI apresenta alguns problemas como um método para a introdução de uma substância extracelular em um
10 oócito de mamífero. Mais especificamente, o Método de ICSI tem os seguintes problemas: (1) é necessário treinamento técnico para introduzir uma substância extracelular em um oócito de mamífero sem falhar pelo Método de ICSI; (2) a taxa de sucesso da introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero pelo Método de ICSI é baixa; (3) como o Método de
15 ICSI é utilizado pela realização de um orifício em um oolema utilizando-se um capilar de vidro, pode ser concebível um efeito adverso sobre o desenvolvimento do embrião causado pela realização de um orifício. Até mesmo se os problemas foram ressaltados, o Método de ICSI está em uso pois não há alternativa para o Método de ICSI habitualmente.

Por outro lado, a introdução de um esperma em um oócito de mamífero é conduzida por fertilização e são propostos diversos métodos para promover a introdução de um esperma em um oócito de mamífero. Por exemplo, a tradução Japonesa Publicada da publicação de PCT internacional 8-503705 divulga um método para tratamento da infertilidade masculina de
25 mamíferos pela administração de um polipeptídeo timosina que melhora a fertilidade tal como timosina α_1 para promover a fertilização. O Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 9-28721 divulga um método para melhorar a fertilidade *in vitro* de esperma de gado, em que o esperma de gado é co-cultivado com uma célula epitelial de oviduto de gado, então cultivado

com um oócito de gado para ser submetido à fertilização *in vitro*.

Além disso, a tradução Japonesa Publicada da publicação de PCT internacional 2001-506225 divulga um método de utilização de angiotensina II para promover a fertilização de um oócito de mamífero. O

5 Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. No. 6-189650 divulga um método para aumentar a taxa de concepção pela magnetização de um esperma e de um oócito e melhoria da atividade dos mesmos. Além disso, a tradução Japonesa Publicada da publicação de PCT internacional 2001-500102 divulga um método para melhorar a ligação de esperma-oócito e
10 para melhorar a fertilidade pela utilização de um polipeptídeo purificado por centrifugação de uma suspensão congelada e descongelada na presença de 10% até 12% de glicerol e que é um membro de um grupo de proteínas inclusive a prosaposina (SGP-1) e a saposina. Todos os métodos estão visando a obtenção de um efeito de ativação de um oócito e de esperma e
15 promovendo a fertilização do mesmo durante a fertilização do oócito de mamífero.

Por outro lado, em uma célula de eucariotes tais como animais, plantas e fungos, é sabido que há uma organela denominada microtúbulos, que é difundida na célula e consiste de fibras tubulares de proteína que têm
20 um diâmetro de aproximadamente 25 nm. As funções das organelas são de faixa extremamente ampla e envolvida na formação de aparelhagem mitótica, na formação e na manutenção da morfologia da célula, no movimento flagelar/ciliar, na colocação de organelas intracelulares, transporte de material, secreção hormonal e fluidez da membrana citoplásmica.
25 Especialmente, os microtúbulos estão presentes como as principais moléculas constituintes dos áxons e de dendritos em neurônios e contribuem para o transporte de materiais como caminhos para as proteínas motoras. Os microtúbulos são geralmente formados por polimerização regular de um hétero-dímero que consiste de uma molécula de α -tubulina e de uma molécula

de β -tubulina e expansão e contração repetidamente causadas pela polimerização/despolimerização juntamente com a progressão do ciclo da célula.

Além disso, a polimerização/despolimerização dos
 5 microtúbulos também é controlada pelas Proteínas Associadas a Microtúbulo (MAPs, proteína τ) e uma proteína quinase e uma proteína fosfatase que contém a proteínas de ligação de microtúbulo como um substrato principal estão envolvidas no mecanismo de controle de microtúbulos. Por estes fatos, é sabido que os compostos que agem sobre o sistema de microtúbulo
 10 apresentam várias atividades vitais tal como inibição da divisão da célula.

Como descrito acima, microtúbulos são os principais componentes de fibras de eixo mitótico que direcionam os cromossomos dispostos sobre a placa equatorial na ocasião da mitose para os pontos polares e representam um papel indispensável em muitas ações celulares inclusive a
 15 manutenção do formato, da motilidade e da adesão das células e do transporte dentro das células, durante a divisão de fase (Shiff, P.B. e Horwitz, S.B., 1981, "Molecular Actions and Targets for Anticancer Chemotherapeutic Agents" seção de "Tubulin: a target for chemotherapeutic agents", pp 483-507, Academic Press, NY, USA; Glotz, J.S. e outros, 1992, Proc. Natl. Acad.
 20 Sci., USA, 89:7026-7030; Rowinsky, E.K. e outros, 1990, Nature, 82:1247-1259). Além disso, os microtúbulos representam um papel importante nas interações entre os fatores de crescimento e os receptores na superfície das células e no controle dos sinais derivados destas interações. A relação entre a fertilização e o citoesqueleto também foi apresentadas (Molecular
 25 Reproduction and Development, 56:89-98,2000).

A tubulina é o principal componente de microtúbulos e uma proteína indispensável para divisão da célula/crescimento da célula, que é um chamado elemento citoesquelético. Portanto a inibição da polimerização ou a despolimerização das tubulinas tem uma relação importante com divisão da

célula/crescimento da célula. Por tais funções da tubulina, a tubulina também é conhecida como um alvo de um agente anticâncer, de um agente antifungal e de herbicidas. Além disso, a tubulina foi profundamente envolvida tanto na fundação como na aplicação na ciência da vida.

5 São conhecidos até agora alguns inibidores de polimerização da tubulina. O alcalóide vinca é um inibidor bem conhecido de polimerização da tubulina usado para tratamento de cânceres (Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto N°. 5-192174). O alcalóide vinca é um termo genérico usado para se referir a uma espécie de agentes anticâncer, cujo componente é
10 extraído de plantas. O alcalóide vinca se liga a uma proteína denominada tubulina que está envolvida no movimento d acetato de etila e na manutenção do formato da célula e inibe microtúbulos, sendo que inibe a divisão da célula.

Exemplos representativos de alcalóide vinca incluem a
15 vinblastina e a vincristina (J. Med. Chem. 34:1998,1991). A vinblastina é um alcalóide indol que tem uma atividade antitumor entre os alcalóides contidos no *Catharanthus roseus*, que age sobre os microtúbulos ou sobre a tubulina que é um componente proteína de microtúbulos, para interromper a mitose d acetato de etila no estágio da metáfase, inibindo desse modo a divisão da
20 célula. A vincristina é atualmente usada para o tratamento de leucemia, linfoma maligno, tumor pediátrico etc. ao passo que a vinblastina é usada para o tratamento do câncer da célula não pequena. Nestes últimos anos, a vinblastina é preparada por um método de síntese (Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto N°.2003-64084).

25 São conhecidos muitos outros inibidores de polimerização da tubulina tais como a rizoxina (Tetrahedron Lett., 34:1035, 1993), a combretastatina (Biochemistry, 28:6984, 1989; Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto N°.6-207264), a 2-estirilquinazolina-4 (3H)-ona (SQO) (J. Med. Chem., 33:1721,1990), a halistatina 1, 2 (Pedidos de Patente

Japonesa Depositados em Aberto Nº. 6-279450; Nº. 6-279451) e pironetina ou seus derivados (Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº.11-1434) e tem sido pesquisado o uso dos mesmos para droga antitumor e similares.

5 Documento da Patente 1: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 5-38345

Documento da Patente 2: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 5-192174

10 Documento da Patente 3: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 6-189650

Documento da Patente 4: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 6-207264

Documento da Patente 5: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 6-279450

15 Documento da Patente 6: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 6-279451

Documento da Patente 7: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 9-28721

20 Documento da Patente 8: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº. 11-1434

Documento da Patente 9: Pedido de Patente Japonesa Depositado em Aberto Nº.2003-64084

Documento da Patente 10: Tradução Japonesa Publicada da publicação de PCT internacional 8-503705

25 Documento da Patente 11: Tradução Japonesa Publicada da publicação de PCT internacional 2001-500102

Documento da Patente 12: Tradução Japonesa Publicada da publicação de PCT internacional 2001-506225

Documento da Patente 13: WO 97/18318

Documento sem ser da Patente 1: Shiff, P.B. e Horwitz, S.B., 1981, "Tubulin: a target for chemotherapeutic agents" seção sobre "Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents", pp 483-507, Academic Press, NY, USA

5 Documento Sem ser da Patente 2: Glotz, J.S. e outros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:7026-7030

Documento Sem ser da Patente 3: Rowinsky, E.K. e outros, 1990, Nature, 82:1247-1259

10 Documento Sem ser da Patente 4: Molecular Reproduction and Development, 56:89-98,2000

Documento Sem ser da Patente 5: J. Med. Chem. 34:1998,1991

Documento Sem ser da Patente 6: Tetrahedron Lett., 34:1035, 1993

15 Documento Sem ser da Patente 7: Biochemistry, 28:6984, 1989

Documento Sem ser da Patente 8: J. Med. Chem., 33:1721,1990

Divulgação da Invenção

20 Objetivo a ser resolvido pela presente invenção

Um objetivo da presente invenção é fornecer um método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero, permitindo uma introdução segura e eficaz em um oócito de mamífero quando se introduz uma substância extracelular tais como um espermatozoide, núcleo de
25 célula, ácido nucléico e proteína em um oócito de mamífero, o que é tecnicamente fácil. Um outro objetivo da presente invenção é fornecer um método para a introdução de um espermatozoide em um oócito de mamífero, o que é tecnicamente fácil e causa menos danos ao oócito de mamífero quando se introduz um espermatozoide em um oócito de mamífero.

Meios para resolver o objetivo

Os presentes inventores conduziram um estudo intensivo sobre um método para a introdução de uma substância extracelular tal como um esperma em um oócito de mamífero e descobriram que, pelo tratamento de um oócito de mamífero com um inibidor de polimerização de tubulina tal como a vinblastina, é promovida uma fusão da membrana entre o oócito e o esperma, desse modo pode ser conseguida a fertilização pela fusão do esperma e do oócito sem fazer um orifício em um oolema. A presente invenção foi realizada dessa maneira.

Mais especificamente, com um método convencional para a introdução de uma substância extracelular tal como um esperma em um oócito de mamífero, foi usado o Método de ICSI em que é feito um orifício em um oolema com um capilar de vidro. O Método de ICSI é tecnicamente difícil e a taxa de sucesso do mesmo é baixa. Além disso, há um efeito adverso sobre o desenvolvimento do embrião provocado pelo fato de se fazer um orifício no oolema com um capilar de vidro. Portanto, os presentes inventores conduziram um estudo intensivo sobre um método para a introdução de um esperma que é tecnicamente fácil e causa menos danos no oócito e focalizado no desenvolvimento de um promotor para a introdução de um esperma para um oócito de mamífero, que promove a fusão da membrana entre um oócito e um esperma.

A fusão de membrana citoplásmica é indispensável para que a fusão de um esperma e um oócito forneçam um oócito fertilizado. Os detalhes em relação a um mecanismo molecular para o controle da fusão da membrana durante a fertilização são desconhecidos, entretanto, verificou-se que os microtúbulos que têm a tubulina como uma unidade constituinte representam um papel importante nos recentes estudos dos inventores. Dado este fator, os efeitos de promotor da polimerização da tubulina e de inibidor em relação à fusão da membrana durante a fertilização foram investigados e foi descoberto

que o inibidor de polimerização da tubulina, vinblastina, tem um efeito promotor sobre a fusão do espermatozócito a um oolema. Então, foi descoberto que este tratamento químico permite que o espermatozócito seja introduzido em um oócito sem realizar um orifício em um oolema.

5 Isto é, para investigar um mecanismo em que o tratamento com a vinblastina promove a fusão da membrana, foi examinada a localização das proteínas da membrana em um oócito de camundongo que foi fertilizado *in vitro* depois do tratamento com a vinblastina. Os resultados revelaram que a localização de uma proteína CD9 de quatro transmembranas, que se acredita
10 controle a fusão da membrana, fosse diferente daquela de um tipo selvagem. O estudo até agora revelou que é essencial que uma área em que não esteja presente a CD9 em um oolema é formada transientemente pelo espermatozócito para que ocorra a fusão da membrana de fertilização. Foi descoberto que uma área circular em que a CD9 não está presente é formada antes da ligação do
15 espermatozócito por tratamento com vinblastina. Além disso, somente um espermatozócito fundido ao centro de uma área em que a CD9 não está presente.

A presente invenção foi completada à base de descobertas descritas acima e um método da presente invenção pode ser aplicado não apenas ao caso da introdução de um espermatozócito em um oócito de mamífero, mas
20 também ao caso da introdução de uma substância extracelular tais como um núcleo de célula, ácido nucléico e proteína em um oócito de mamífero. Ou seja, a presente invenção refere-se a um método para a introdução de uma substância extracelular tais como um espermatozócito, um núcleo de célula, ácido nucléico e proteína em um oócito de mamífero pela utilização de um
25 promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo e a um promotor para a introdução de uma substância extracelular a um oócito de mamífero para o mesmo. Além disso, um aspecto da presente invenção é fornecer um método para promover a fertilização de

um oócito de mamífero, pela promoção de um espermatozoide em um oócito de mamífero, por melhoria da fertilidade de um oócito de mamífero por um tratamento com um promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo.

Especificamente, a presente invenção compreende: (1) um promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero usado para a introdução de uma substância extracelular que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo em um oócito de mamífero; (2) o promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com (1), em que o inibidor de polimerização de tubulina é a vinblastina; (3) o promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com (1) ou (2), em que a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero é a introdução de um espermatozoide no oócito de mamífero; (4) o promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com (3), em que a introdução de um espermatozoide no oócito de mamífero é promovida pela melhoria da fertilidade do oócito de mamífero; (5) o promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com qualquer um de (1) a (4), em que o mamífero é um ser humano e (6) o promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com qualquer um de (1) a (4), em que o mamífero é selecionado do grupo que consiste de um camundongo, um rato, gado, porco, cavalo, ovelha e macaco.

Além disso, a presente invenção compreende: (7) um método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero, em que o oócito de mamífero é tratado com um promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo, quando se

introduz a substância extracelular no oócito de mamífero; (8) o método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com (7), em que o oócito de mamífero é tratado com vinblastina, quando se introduz a substância extracelular no oócito de mamífero; (9) o método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com (7) ou (8), em que a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero é a introdução de um esperma em um oócito de mamífero; (10) o método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com (9), em que a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero é conseguida por fusão de esperma-oócito fora do corpo de um mamífero; (11) o método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com (9) ou (10), em que a introdução do esperma em um oócito de mamífero é promovida pela melhoria da fertilidade do oócito de mamífero e (12) o método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com (11), em que a melhoria da fertilidade do oócito de mamífero é a promoção da fusão do esperma a um oolema.

Breve Descrição das Figuras

20 [Fig. 1]

É uma figura que apresenta o resultado do número de esperma fundido com um oócito como um resultado da fertilização *in vitro* de esperma de camundongo e de oócito não fertilizado de camundongo isento de zona pelúcida que foi tratado com vinblastina, um inibidor de polimerização de tubulina, em um exemplo da presente invenção.

25 [Fig. 2]

É uma figura que apresenta o resultado da razão de oócitos fertilizados que resultaram de uma fertilização *in vitro* de esperma de camundongo e um oócito de camundongo não fertilizado com zona pelúcida

que foi tratado com vinblastina, um inibidor de polimerização de tubulina, em um exemplo da presente invenção.

Melhor Modo de Realização da Invenção

Um método da presente invenção inclui o tratamento do oócito
5 de mamífero com um promotor para a introdução de uma substância
extracelular para o oócito de mamífero que contém um inibidor de
polimerização de tubulina como um ingrediente ativo e a introdução da
substância extracelular no oócito de mamífero quando se introduz uma
substância extracelular tal como esperma em um oócito de mamífero. Como
10 um inibidor de polimerização de tubulina usada como um ingrediente ativo do
promotor para a introdução de uma substância extracelular para o oócito de
mamífero da presente invenção, pode ser usado um inibidor de polimerização
de tubulina que é publicamente conhecido como um inibidor para a
polimerização da tubulina. O inibidor de polimerização de tubulina inclui
15 alcalóide vinca e exemplos típicos de alcalóide vinca incluem vinblastina e
vincristina. Como um ingrediente ativo mais preferível ainda do promotor
para a introdução de uma substância extracelular para o oócito de mamífero
da presente invenção, pode ser exemplificada a vinblastina.

Um oócito de mamífero de interesse na presente invenção
20 inclui, mas não especialmente limitado a, um oócito de um ser humano, de
camundongo, de rato, de gado, de porco, de cavalo e de macaco. Um método
de introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de
acordo com a presente invenção pode ser aplicado a substâncias extracelulares
tais como um esperma, um núcleo de célula, um ácido nucléico e uma
25 proteína. No entanto, o método para a introdução de uma substância
extracelular de acordo com a presente invenção pode ser especialmente
aplicado à introdução de um esperma em um oócito de mamífero, desse modo
pode ser fornecido com um método eficaz de fertilização de um oócito de
mamífero.

Na presente invenção, o tratamento de um oócito de mamífero com o promotor para a introdução de uma substância extracelular para o oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ativo, pode ser realizado por: coleta de um oócito, cultura em um meio adequado (por exemplo, meio TYH) seguida por cultura no meio ao qual foi adicionado um inibidor de polimerização de tubulina durante algumas horas.

Embora a invenção seja descrita com mais detalhe a seguir por meio de exemplos, o âmbito técnica da presente invenção não é limitado aos mesmos.

10 EXEMPLO 1

(Aumento na eficiência de fertilização por tratamento com vinblastina)

Para examinar a influência de um inibidor de polimerização de tubulina sobre a fertilização de um oócito não fertilizado de camundongo, foi usada vinblastina como um inibidor de polimerização de tubulina para tratar um oócito não fertilizado de camundongo. Então foi investigada a fertilidade do mesmo.

(Materiais e condições experimentais)

1. Composição do meio (g/L) (meio TYH)

NaCl	6,976
KCl	0,356
CaCl ₂	0,190
KH ₂ PO ₄	0,162
MgSO ₄ •7H ₂ O	2,930
NaHCO ₃	2,106
Glicose	1,000
Piruvato de sódio	0,550
penicilina G	0,750
Estreptomicina	0,050
Albumina de soro bovino F-V	4,000
Vermelho fenol a 1%	1,0 ml

2. Solução ácida de Tyrode (g/L)

NaCl	8,00
KCl	0,20
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,24
Mg Cl ₂ •6H ₂ O	0,10
Glicose	1,00

Ajustar o pH até 2,5 com HCl e esterilizado com filtro.

3. Temperatura de Cultivo: 37 °C

(Operação de experimento)

1. Coleta de Oócito

5 (1) Camundongos com oito semanas de idade ou mais velhos foram adquiridos e tornados adaptados para crescer em ambiente durante 1 semana antes do uso.

PMS (Serotropina exclusive para animal, fabricada por ASUKA Pharmaceutical) foi injetada em uma quantidade de 0,11 ml na
10 cavidade abdominal do camundongo a 8:00 pm.

(2) 48 horas mais tarde, HCG (Gonadotropina exclusive para animal, fabricada por ASUKA Pharmaceutical) foi injetada em uma quantidade de 0,11 ml na cavidade abdominal.

(3) Os camundongos foram eutanasiados no dia seguinte (14 a
15 16 horas depois da injeção de HCG) e a ampola do oviduto foi removida. Um oócito circundado por células cumulus foi coletado e cultivado em uma gota (100 µL) de meio de TYH.

(4) AS células cumulus foram removidas por tratamento com hialuronidase (300 µg/mL), então o oócito foi cultivado em meio TYH
20 durante 3 horas. No caso de se conduzir a remoção da zona pelúcida, a zona pelúcida do oócito foi removida por tratamento com uma solução ácida de Tyrode seguido por cultura do oócito em meio TYH durante 3 horas.

2. Tratamento com um inibidor de polimerização de tubulina

O oócito não fertilizado coletado foi tratado por utilização de
25 vinblastina (VB) como um inibidor de polimerização de tubulina. Como controles, foram usados um oócito tratado com paclitaxel (Pac; Nome de Marca: taxol), um promotor de polimerização de tubulina e um oócito não tratado (controle). O tratamento com vinblastina (VB) foi conduzido por cultura do oócito em solução de vinblastina a 20 µM (meio TYH) durante 1

hora, enquanto foi conduzido tratamento com paclitaxel (Pac) por cultura do oócito em 10 μ M de solução de paclitaxel (Pac) (em meio TYH) similarmente durante hora.

3. Fertilização *in vitro*

O oócito não fertilizado de camundongo foi tratado com vinblastina (VB), um inibidor de polimerização de tubulina e a fertilização *in vitro* foi conduzida com espermatozoides de camundongo. Como controles, foram usados um oócito não fertilizado tratado com paclitaxel (Pac; Nome de Marca: taxol), um promotor de polimerização de tubulina e um oócito não tratado (controle).

(Resultados)

(No caso em que foram usados oócitos isentos de zona pelúcida):

Para avaliar quantitativamente a eficiência da fusão de espermatozoides-oócito, oócitos não fertilizados de camundongo isentos de zona pelúcida foram tratados com vinblastina (VB), um inibidor de polimerização de tubulina ou paclitaxel (Pac), promotor de polimerização de tubulina ou deixado não tratado (controle). Então os oócitos foram fertilizados *in vitro* com espermatozoides de camundongo, respectivamente. Os resultados são apresentados na Fig. 1. A figura apresenta os resultados da fertilização *in vitro* (oócitos isentos de zona pelúcida, 1 hora depois da inseminação). Na figura, as barras brancas apresentam o número de espermatozoides fundidos. Quando se compara o número de espermatozoides que fundiu com os oócitos 1 hora depois da inseminação, o oócito tratado com a VB (vinblastina)- apresentou o maior número. Por outro lado, um grande número de espermatozoides aderiu à superfície do oócito tratado com paclitaxel (Pac) e não fundiu com o mesmo, porque o oócito tratado com paclitaxel tornou o espermatozoides difícil de ser fundido.

(No caso em que são usados oócitos com zona pelúcida):

Os oócitos não fertilizados de camundongo um instante depois da ovulação, que não tinha sido submetido a tratamento especial tal como

remoção da zona pelúcida, foram tratados com vinblastina, um inibidor de polimerização de tubulina e fertilizado *in vitro* com espermatozoides de camundongo. Os resultados são apresentados na Fig. 2. Foi conduzido um experimento que usa anticorpo CD9 anti-camundongo que tem um efeito inibidor sobre a fusão simultaneamente com este experimento. No caso de camundongo, aproximadamente 20% dos oócitos não podem ser fertilizados em consequência da imaturidade e da super-maturidade. No entanto, depois da investigação da fertilização que usa os oócitos no estágio de 2 células, a eficiência da fertilização dos oócitos tratados com vinblastina aumentou uns 20% em comparação àquela do oócito não tratado. Como será descrito a seguir, até mesmo um oócito imaturo podia ser fundido com espermatozoides quando tratado com vinblastina. Desse modo, acredita-se que isto seja o resultado da maior eficiência de fusão de espermatozoides-oócito devido ao tratamento com vinblastina. O resultado experimental revela que oócitos imaturos ou super-maduros se tornam possíveis para fundir com o espermatozoides por tratamento com vinblastina. Além disso, a eficiência de fusão dos oócitos que foram tratados com anticorpo CD9 anti-camundongo que tem um efeito inibidor, também foi aumentada pelo tratamento com vinblastina.

(Aumento da eficiência de fertilização pelo tratamento com vinblastina)

Depois do tratamento dos oócitos não fertilizados de camundongo com vinblastina, um inibidor de polimerização de tubulina, os oócitos foram fertilizados *in vitro* com espermatozoides de camundongo. Os resultados revelaram que a eficiência de fertilização dos mesmos aumentou 20% em comparação a um grupo não tratado. No caso do camundongo, aproximadamente 20% dos oócitos não podem ser fundidos com espermatozoides em virtude da imaturidade. No entanto, até mesmo oócitos imaturos podiam se fundir com espermatozoides quando tratados com vinblastina.

(Tratamento com paclitaxel)

Quando um oócito não fertilizado de camundongo foi tratado

com paclitaxel (Pac), promotor de polimerização de tubulina, foi inibida a fusão de espermamembrana do oócito. Foram observados alguns microvilos deformados quanto a morfologia da membrana do oócito foi examinada com um microscópio eletrônico.

5 (Formação de área de fusão do espermatozoides por tratamento com vinblastina)

Foi investigado o mecanismo pelo qual a fusão da membrana foi promovida por tratamento com vinblastina. Depois do tratamento com vinblastina, foi examinada a localização das proteínas da membrana em um oócito de camundongo fertilizado *in vitro*. Quando tratado com vinblastina,
10 um inibidor de polimerização de tubulina, foram formadas áreas circulares onde a localização de CD9 sobre a membrana do oócito não varia. O número de áreas circulares diferia dependendo dos oócitos e estava na faixa de 1 a 6. Além disso, foi confirmado que um espermatozoides foi fundido ao centro de áreas circulares. Isto demonstra que a despolimerização da tubulina é necessária
15 para a fusão do espermatozoides.

A saber, os resultados revelaram que a localização de uma proteína CD9 de quatro transmembrana, que se acredita controle a fusão da membrana, era diferente daquela do tipo selvagem. O estudo até agora revelou que é essencial que uma área em que a CD9 não está presente é
20 formada transientemente pelo espermatozoides sobre um oolema para a ocorrência da fusão da membrana de fertilização. Foi descoberto que é formada uma área circular em que a CD9 não está presente por tratamento com vinblastina antes da ligação de com espermatozoides. Além disso, apenas um espermatozoides fundido ao centro de uma área onde a CD9 não está presente. Além disso, foi confirmado
25 que, na fertilização de um oócito com uma membrana semi-permeável, o número de espermatozoides a ser introduzido no oócito é limitado a um em virtude do seu mecanismo de bloqueio da poliespermia. Por estes resultados, tornou-se aparente que, pelo tratamento da área específica da membrana do oócito com vinblastina, a introdução de espermatozoides em um oócito se torna possível sem a

utilização de um capilar de vidro.

Aplicabilidade Industrial

A presente invenção pode fornecer um método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero, que
5 permite uma introdução segura e eficaz em um oócito de mamífero quando se introduz uma substância extracelular tais como um esperma, um núcleo de célula, ácido nucléico e proteína em um oócito de mamífero, que é tecnicamente fácil. Especificamente, um método da presente invenção pode ser aplicado com um método de introdução de um esperma em um oócito de
10 mamífero e fornecer um método tecnicamente fácil sem utilizar um dispositivo especial tal como aquele usado no Método de ICSI convencional e permite que o esperma seja introduzido em um oócito de mamífero causando menos danos para o oócito de mamífero, porque não é necessário que se faça um orifício no oolema com um capilar de vidro como no Método de ICSI.
15 Portanto, pode-se esperar que a presente invenção possa contribuir para o desenvolvimento no campo da modificação de mamíferos que usa terapia gênica, tratamento em reprodução ou engenharia de desenvolvimento, como um meio útil para a introdução de uma substância extracelular tais como um esperma, um núcleo de célula, ácido nucléico e proteína em um oócito de
20 mamífero, para fertilização ou modificação de células germinativas.

REIVINDICAÇÕES

1. Promotor para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero, caracterizado pelo fato de que é usado para a introdução de uma substância extracelular que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo em um oócito de mamífero.

2. Promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor de polimerização de tubulina é a vinblastina.

3. Promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero é a introdução de um espermatozoide no oócito de mamífero.

4. Promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a introdução de um espermatozoide no oócito de mamífero é promovida pela melhoria da fertilidade do oócito de mamífero.

5. Promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um ser humano.

6. Promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o mamífero é selecionado do grupo que consiste de um camundongo, um rato, gado, porco, cavalo, ovelha e macaco.

7. Método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero, caracterizado pelo fato de que o oócito de mamífero é tratado com um promotor para a introdução de uma substância extracelular para um oócito de mamífero que contém um inibidor de polimerização de tubulina como um ingrediente ativo, quando se introduz a

substância extracelular no oócito de mamífero.

8. Método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o oócito de mamífero é tratado com vinblastina, quando se
5 introduz a substância extracelular no oócito de mamífero.

9. Método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero é a introdução de um esperma no oócito de mamífero.

10 10. Método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero é conseguida pela fusão *in vitro* de esperma-oócito.

15 11. Método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 9 ou 10, caracterizado pelo fato de que a introdução de um esperma em um oócito de mamífero é promovida pela melhoria da fertilidade do oócito de mamífero.

20 12. Método para a introdução de uma substância extracelular em um oócito de mamífero de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a melhoria da fertilidade do oócito de mamífero é a promoção da fusão do esperma a um oolema.

Fig. 1

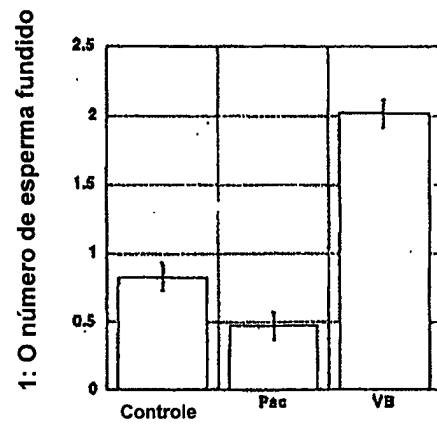
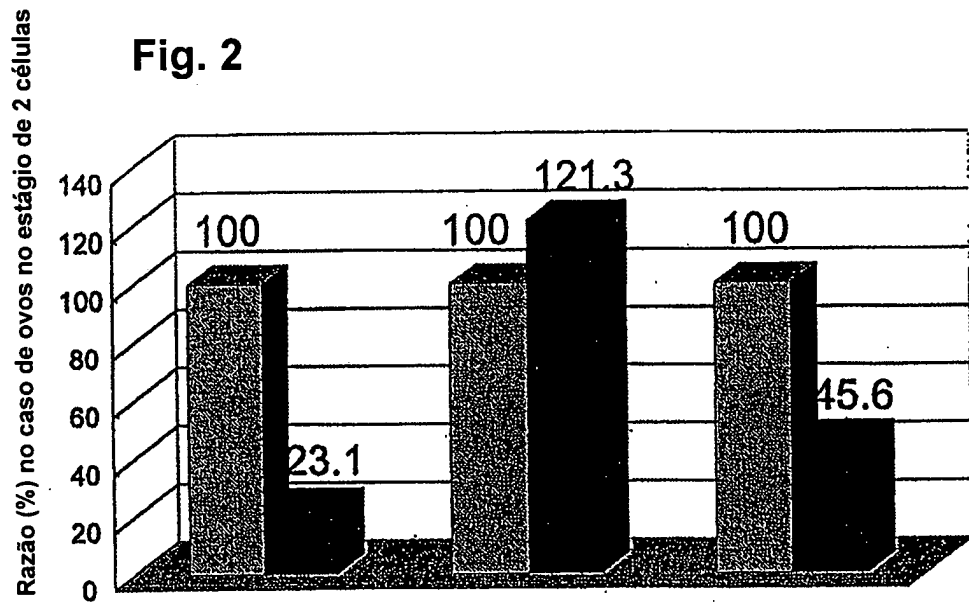


Fig. 2



3: Controle IgG	+	-	+	-	+	-
4: Anticorpo Anti-CD9	-	+	-	-	-	+
Vinblastina(20 mM)	-	-	-	+	-	+

RESUMO

“PROMOTOR E MÉTODO PARA A INTRODUÇÃO DE UMA
SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR EM UM OÓCITO DE MAMÍFERO”

Pretende-se fornecer um método, pela introdução de uma
5 substância extracelular, tais como um esperma, um núcleo de célula, um ácido
nucléico ou uma proteína em um óvulo de mamífero, para a introdução da
substância extracelular no óvulo de mamífero, que é segura para o óvulo de
mamífero, permite introdução eficiente e é tecnicamente fácil. Pelo
tratamento do óvulo de mamífero com um a inibidor de polimerização de
10 tubulina tal como a vinblastina, é promovida a fusão da membrana entre o
óvulo e o esperma e sem fazer um orifício na membrana da célula, o esperma
e o óvulo são fundidos e pode ser conseguida a fertilização. O método da
invenção pode ser aplicado não apenas ao caso em que um esperma é
introduzido em um óvulo de mamífero, mas também em um caso em que uma
15 substância extracelular, tais como um núcleo de célula, um ácido nucléico ou
uma proteína é introduzido em um óvulo de mamífero.