

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-579**
(22) Přihlášeno: **27.07.2010**
(40) Zveřejněno: **20.07.2011**
(Věstník č. 29/2011)
(47) Uděleno: **08.06.2011**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **20.07.2011**
(Věstník č. 29/2011)

(11) Číslo dokumentu:

302 580

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/075 (2010.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Caliendo G. et al.: "Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide...", J. Med. Chem., Vol. 53, 6275-6286, 5.12.2010; Yang G.: "Hydrogen sulfide in cell survival: a double-edged sword", Expert Review of Clinical Pharmacology, Vol. 4(1), 33-47, January 2011; Miller D.L. and Roth M.B.: "Hydrogen sulfide increases thermotolerance and lifespan in Caenorhabditis elegans", PNAS, Vol. 104, 20618-20622, 2007; Kimura Hideo: "Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor", Bioch. Biophys. Res. Communications, Vol. 267(1), 129-133, 2000; Martín-Romero F.J. et al.: "Contribution of culture media to oxidative stress and its effect on human oocytes", Reprod.Biomed.Online. Vol. 17(5), 652-661, 2008; Martín-Romero F.J. et al.: "Store-Operated Calcium Entry in Human Oocytes and Sensitivity to Oxidative Stress", Biol. Reprod., Vol. 78(2), 2307-315, 2008.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha 10 -
Uhřetěves, CZ
Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 6, CZ

(72) Původce:

Petr Jaroslav Prof. Ing. DrSc., Praha - Uhřetěves, CZ
Jílek František Prof. MVDr. Ing. DrSc., Praha 6 -
Dejvice, CZ
Rajmon Radko Doc. MVDr. PhDr., Velké Přílepy, CZ
Chmelíková Eva Doc. Ing. Ph.D., Praha 12 - Kamýk, CZ
Krejčová Miroslava Ing., Milevsko, CZ
Krejčová Tereza Ing., Praha 12 - Modřany, CZ
Tůmová Lenka Ing., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:

Ministerstvo zemědělství ČR, Mgr. Hana Jirkalová,
Těšnov 17, Praha 1, 11705

(54) Název vynálezu:

**Kultivační medium na prodloužení životnosti
savčích oocytů in vitro a způsob tohoto
prodloužení**

(57) Anotace:

Řešení se týká kultivačního media a způsobu na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro, které jsou charakterizovány tím, že kultivační medium pro kultivaci odebraných savčích oocytů v podmínkách in vitro obsahuje přísávek sulfanu. To má velký význam při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

CZ 302580 B6

Kultivační medium na prodloužení životnosti savčích oocytů *in vitro* a způsob tohoto prodloužení

5 Oblast techniky

Vynález se týká kultivačního media na prodloužení životnosti savčích oocytů *in vitro*, zejména při použití subtoxických koncentrací sulfanu (sirovodík, H_2S) pro přípravu kultivačního media na prodloužení životnosti odebraných savčích oocytů uchovávaných pro reprodukci po delší dobu v podmínkách *in vitro*. Dále se vynález týká způsobu tohoto prodloužení životnosti oocytů *in vitro*.

15 Dosavadní stav techniky

Je známo, že oocyty savců (samičí pohlavní buňky) mají po vyjmutí z těla samice omezenou životnost a při následné kultivaci v podmínkách *in vitro* po dokončení zrání podléhají spontánně řadě procesů, jež je znehodnocují pro další využití v reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat (klonování, *in vitro* oplození, transgenóza) i v humánní medicíně (asistovaná reprodukce). Nejvýznamnější z procesů je fragmentace oocytů, jež je projevem apoptózy, a lýza oocytů, jež je důsledkem nekrózy. Proto jsou hledána ošetření, která by těmto procesům zabránila. Možnosti potlačit apoptózu a nekrózu oocytů jsou zatím ale velmi omezené a tím stále dochází k velkým ztrátám při používání současných reprodukčních technik.

25 Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje kultivační medium na prodloužení životnosti savčích oocytů *in vitro*, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že kultivační medium pro kultivaci odebraných savčích oocytů v podmínkách *in vitro* obsahuje přídavek sulfanu.

Způsob prodloužení životnosti savčích oocytů *in vitro* kultivačním médiem podle vynálezu je také podstatou vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se odebrané dozrálé savčí oocyty *in vitro* kultivují před oplodněním v kultivačním médiu se subtoxickými koncentracemi sulfanu po dobu 3 až 5 dnů, poté jsou oocyty opláchnuty kultivačním médiem, případně jsou přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního media se subtoxickými koncentracemi sulfanu pro kultivaci dalších 1 až 3 dnů.

Způsob podle vynálezu je dále charakterizován tím, že se odebrané dozrálé savčí oocyty kultivují *in vitro* po dobu až 5 dnů s látkou uvolňující subtoxické koncentrace sulfanu, poté jsou po případném opláchnutí kultivačním médiem oocyty přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního media, kde jsou dále kultivovány a pak jsou použity pro reprodukční biotechnologie (např. partenogenetickou aktivaci, oplození *in vitro*, pro přípravu cytoplasm k přenosu jader somatických buněk, tj. klonování).

Podstata použití sulfanu pro přípravu kultivačního media na prodloužení životnosti savčích oocytů *in vitro* podle vynálezu dále spočívá v tom, že se dozrálé savčí oocyty kultivují až po dobu 5 dnů se subtoxickými koncentracemi sulfanu. Poté jsou oocyty opláchnuty v kultivačním médiu bez sulfanu a použity pro reprodukční biotechnologie (např. partenogenetickou aktivaci, oplození *in vitro*, pro přípravu cytoplasm k přenosu jader somatických buněk, tj. klonování).

Použití sulfanu pro přípravu kultivačního media podle vynálezu na prodloužení životnosti odebraných savčích oocytů uchovávaných pro reprodukci po delší dobu v podmínkách *in vitro* se výhodně provádí tak, že se savčí oocyty dozrálé do stadia metafáze II zbaví kumulárních buněk opakovaným pipetováním úzkou skleněnou pipetou, propláchnou se kultivačním médiem (např.

medium M199, které je na bázi earleových solí, a je obohacené o 10 % hmotn. bovinního telecího séra) a pak jsou přeneseny do kultivačního media s přidavkem molekul uvolňujících do media subtoxické koncentrace sulfanu (např. Na_2S nebo NaHS). V tomto mediu se oocyty kultivují po dobu 3 dnů. Pro další kultivaci je výhodné, aby po 3 dnech kultivace byly oocyty opláchnuty v čerstvě připraveném mediu obohaceném o látky uvolňující subtoxické koncentrace sulfanu a následně byly kultivovány v čerstvě připraveném mediu obohaceném o látky uvolňující subtoxické koncentrace sulfanu. Po ukončení kultivace s cílem prodloužit životaschopnost oocytů jsou oocyty před dalším použitím propláchnuty v mediu bez sulfanu a kultivovány běžným laboratorním postupem.

Původci vynálezu ověřili, že použitím látek uvolňujících subtoxické koncentrace sulfanu pro přípravu kultivačního media podle vynálezu jsou u oocytů kultivovaných po dlouhou dobu v podmínkách *in vitro* potlačeny procesy fragmentace a lýzy. Například při kultivaci v mediu s 1 milimol siričiku sodného (Na_2S) po dobu tří dnů nedochází u oocytů prasete vůbec k fragmentaci ani lýze, zatímco při kultivaci standardním způsobem dosahuje za stejnou dobu podíl fragmentovaných oocytů zhruba 25 % a podíl lyzovaných oocytů zhruba 10 %. Výsledkem kultivace oocytů v přítomnosti inhibitorů draslíkových kanálů závislých na ATP je tedy eliminace nežádoucích procesů fragmentace a lýzy oocytů. Podíl oocytů, které si uchovávají životaschopnost, je podstatně vyšší.

Při oplození oocytů *in vitro* hospodářských zvířat (ať již metodou kultivace oocytů se spermii nebo metodou mikroinjekce spermií do cytoplasmy oocyty) jsou získávány zralé oocyty buď odběrem z těla samice nebo po kultivaci v podmínkách *in vitro*. Pokud se ale z jakéhokoli důvodu nezdaří tyto oocyty okamžitě oplodnit (např. při zpoždění dodávky spermatu vybraného plemene, např. plemenného kance, býka, hřebce), odebrané oocyty rychle ztrácejí na své kvalitě, procházejí procesem stárnutí, což snižuje pravděpodobnost úspěšného oplození i úspěšného a zdravého vývoje zárodku. Následující nežádoucí škody v reprodukci savců jsou velké.

Rovněž při oplození oocytů člověka při léčbě neplodnosti metodami asistované reprodukce (ať již metodou kultivace oocytů se spermii; nebo metodou mikroinjekce spermií do cytoplasmy oocyty) jsou získávány zralé oocyty buď odběrem z těla budoucí matky, nebo jsou tyto oocyty získány po dozrání v podmínkách *in vitro*. Pokud se ale z jakéhokoli důvodu nezdaří tyto oocyty okamžitě oplodnit (např. při potížích s odběrem spermatu potenciálního otce), oocyty rychle ztrácejí na kvalitě, procházejí procesem stárnutí, což snižuje pravděpodobnost úspěšného oplození a tím i úspěšného a zdravého vývoje zárodku. Negativní následky jsou pak velmi citelné.

Z uvedeného jasně vyplývá, že použití látek uvolňujících subtoxické koncentrace sulfanu pro přípravu kultivačního media na prodloužení kultivace oocytů za současného použití subtoxických koncentrací sulfanu podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat (např. klonování, *in vitro* oplodnění; IVF, ICSI, transgenozí).

Při klonování savců obecně dochází ke vnášení jaderné dědičné informace somatické buňky do cytoplasmy oocyty, jež bylo vlastní jaderné dědičné informace zbaveno (bylo enukleováno). Kvalita použitého oocyty významně ovlivňuje úspěšnost celého postupu pro klonování. Při náročném postupu přenosu jsou oocyty připravené pro klonování uchovávány v podmínkách *in vitro*. Přitom v nich ale samovolně probíhají procesy stárnutí, které poškozují odebraný oocyt. Pro následný vývoj embrya klonu je nezbytná aktivace takto vzniklé buňky. Pro takové dočasné uchovávání oocytů před enukleací nebo i pro uchovávání enukleovaných oocytů před vlastním přenosem jádra somatické buňky lze s výhodou použít media obohaceného o sulfan. Původci vynálezu bylo zjištěno, že takto použité oocyty nebo cytoplasty (oocyty zbavené enukleací jaderné dědičné informace) jsou opět kvalitnější a embrya klonů, která jsou z nich vytvořena přenosem jader somatických buněk, jsou životaschopnější, než při dosud používaných postupech. To má pro budoucí vývoj v této oblasti dalekosáhlé možnosti využití.

Následující příklady provedení použití látek uvolňujících sulfan pro přípravu kultivačního media podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly. Kultivační medium a způsob podle vynálezu byly úspěšně ověřeny původci v prostorách Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. a v České zemědělské univerzitě v Praze, CZ.

5

Příklady provedení vynálezu

10 Příklad 1

Dozrálé prasečí oocyty (600 oocytů) ve stádiu metafáze II byly po dozrání v podmínkách *in vitro* kultivovány před oplozením v mediu obohaceném o 1 mM Na₂S. V tomto kultivačním mediu podle vynálezu byly kultivovány až do chvíle, kdy bylo vše připraveno k jejich oplození. Pak byly oocyty opláchnuty mediem bez sulfanu a následně podrobeny obvyklým procedurám potřebným k oplození *in vitro*. Takto ošetřené oocyty měly vyšší kvalitu než oocyty, které by byly před oplozením kultivovány podle dosavadních postupů bez látek uvolňujících subtoxické koncentrace sulfanu, a i vzniklá embrya byla životaschopnější. Úspěšnost reprodukce s oocytami kultivovanými v mediu podle vynálezu byla při opakovaných pokusech v průměru 80 % (u reprodukce podle dosavadního způsobu zacházení s oocytami bývá cca 45 %).

15

Při ověřování použití látek uvolňujících subtoxické koncentrace sulfanu pro přípravu kultivačního media podle vynálezu na prodloužení životnosti odebraných oocytů *in vitro* u telat, hříbat, jehňat a kůzlat bylo původci vynálezu potvrzeno zvýšení životaschopnosti oocytů v průměru o 30 % oproti současně používaným způsobům reprodukce hospodářských zvířat.

25

Příklad 2

Dozrálé prasečí oocyty (40 oocytů) ve stádiu metafáze II byly po dozrání v podmínkách *in vitro* kultivovány v mediu obohaceném o 2 mM NaHS. V tomto mediu byly drženy až do chvíle, kdy z nich byly enukleací připraveny cytoplasty pro následný přenos jader somatických buněk. Po přenosu jader do cytoplastů z takto ošetřených oocytů byl pozorován vývoj do stádia blastocytu v 18 % případů. Pokud byly oocyty nechány před přípravou cytoplastu stejně dlouhou dobu bez látky uvolňující subtoxické koncentrace sulfanu, jejich kvalita se zhoršila natolik, že je nebylo možné pro klonování použít v důsledku vysoké náchylnosti k fragmentaci (zániku programované smrti – apoptózou).

35

40 Průmyslová využitelnost

Řešení se týká prodlouženého uchovávání savčích oocytů v podmínkách *in vitro* v mediu obsahujícím subtoxické koncentrace sulfanu, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

45

Vysvětlení zkratk použitých v textu

IVF *in vitro* oplodnění (*in vitro* fertilization)

ICSI intracytoplazmatická injekce spermie (intra cytoplasmic sperm injection)

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Kultivační medium na prodloužení životnosti savčích oocytů *in vitro*, **vyznačující se tím**, že kultivační medium pro kultivaci odebraných savčích oocytů v podmínkách *in vitro* obsahuje přídavek sulfanu.
- 10 2. Způsob prodloužení životnosti savčích oocytů *in vitro* kultivačním médiem podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se odebrané dozrálé savčí oocyty *in vitro* kultivují před oplodněním v kultivačním mediu se subtoxickými koncentracemi sulfanu po dobu 3 až 5 dnů, poté jsou oocyty opláchnuty kultivačním médiem, případně jsou přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního media se subtoxickými koncentracemi sulfanu pro kultivaci dalších 1 až 3 dnů.
- 15 3. Způsob podle nároků 1 a 2, **vyznačující se tím**, že jsou odebrané dozrálé savčí oocyty kultivovány *in vitro* po dobu až 5 dnů s látkou uvolňující subtoxické koncentrace sulfanu, poté jsou po případném opláchnutí kultivačním médiem oocyty přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního media, kde jsou dále kultivovány.

20

Konec dokumentu

25