

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2005-332**
(22) Přihlášeno: **26.05.2005**
(40) Zveřejněno: **12.07.2006**
(Věstník č. 7/2006)
(47) Uděleno: **09.06.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.07.2006**
(Věstník č. 7/2006)

(11) Číslo dokumentu:

296 918

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/06 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Sengoku, K. et al.: "Embryo Development. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro." Mol. Reprod. Dev. 58:262-268, 2001; Petr, J. et al.: "Gamete Biology. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors." Mol. Reprod. Dev. 71: 115-122, 2005; Nakamura, Y. et al.: "Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation." Biology „of Reproduction 67, 1588-1592 (2002); Thaler, C.D. and Epel, D.: „Nitric Oxide in Oocyte Maturation, Ovulation, Fertilization, Cleavage and Implantation: A little dab'll do ya." Current Pharmaceutical Design, Vol 9, No 5, February 2003, pp. 399-409(11).

(73) Majitel patentu:

Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, CZ
Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha, CZ

(72) Původce:

Jílek František prof. MVDr. Ing. DrSc., Praha, CZ
Petr Jaroslav prof. Ing. DrSc., Praha, CZ
Jeřeta Michal Ing., Chýnov, CZ
Rozinek Jiří prof. Ing. CSc., Praha, CZ
Rajmon Radko MVDr. PhD., Velké Přílepy, CZ
Sedmíková Markéta Mgr. PhD., Praha, CZ
Chmelíková Eva Ing., Praha, CZ
Lánská Vilma Ing. PhD., Praha, CZ

(74) Zástupce:

Mgr. Hana Jirkalová, Těšnov 17, Praha 1, 11705

(54) Název vynálezu:

**Způsob partenogenetické aktivace zvířecích
oocytů donory oxidu dusnatého**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu zrychlené partenogenetické aktivace zvířecích oocytů in vitro donory oxidu dusnatého, kdy se na zvířecí oocyty opakovaně střídavě krátkodobě působí látkami, které obsahují či neobsahují donory oxidu dusnatého. Tato aktivace má velké využití při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

CZ 296918 B6

Způsob partenogenetické aktivace zvířecích oocytů donory oxidu dusnatého

Oblast techniky

5

Vynález se týká způsobu partenogenetické aktivace zvířecích oocytů donory oxidu dusnatého. Tato aktivace má velký význam zejména při klonování hospodářských zvířat

10 Dosavadní stav techniky

V současné době se aktivace zvířecích oocytů, což jsou samičí pohlavní buňky, provádí mnoha způsoby. Jedním ze způsobů je např. partenogenetická aktivace podle publikace Petr J. a kol. z roku 2005, při které se aktivace oocytů provádí látkami, které uvolňují molekulu oxidu dusnatého (tzv. donory NO). Tento způsob aktivace vyžaduje dlouhodobou kultivaci oocytů s donory NO, přinejmenším 10 hodin, což je dost nevyhovující zejména z provozního hlediska. Takto aktivované oocyty mají dále nízkou kvalitu, především nízkou vývojovou schopnost. Obecně je aktivace oocytů hospodářsky významných druhů savců využívána pro širokou škálu účelů, jako např. pro klonování metodou přenosu jader somatických buněk, tvorbu embryonálních kmenových buněk z partenogenetických embryí nebo pro tvorbu embryí intracytoplazmatickou injekcí spermií (ICSI). Je proto žádoucí, aby aktivace oocytů probíhala vždy co nejefektivněji.

Podstata vynálezu

25

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob partenogenetické aktivace zvířecích oocytů donory oxidu dusnatého podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že na zvířecí oocyty in vitro opakovaně střídavě krátkodobě působí látky obsahující či neobsahující donory oxidu dusnatého.

30

Způsob podle vynálezu se dále provádí tak, že na zvířecí oocyty in vitro opakovaně střídavě po dobu 5 až 30 minut působí látky obsahující či neobsahující donory oxidu dusnatého.

35

Způsob podle vynálezu se výhodně provádí tak, že na zvířecí oocyty in vitro 6x až 20x opakovaně střídavě po dobu 5 až 30 minut působí látky obsahující či neobsahující donory oxidu dusnatého.

Způsob partenogenetické aktivace zvířecích oocytů donory oxidu dusnatého podle vynálezu se konkrétně provádí tak, že se dozrálé zvířecí oocyty in vitro nacházející se ve stádiu zrání metafáze 11 zbaví kumulačních buněk opakovaným pipetováním úzkou skleněnou pipetou, propláchnou se kultivačním médiem (např. médium M199 obohacené o 10 % bovinního telecího séra) a pak jsou přeneseny do kultivačního média s přídavkem molekul uvolňujících oxid dusnatý (např. nitroprusid sodný nebo (±)-S-nitroso-N-acetylpenicilamin - SNAP) v koncentracích od 0,1 do 3 mM. V tomto médiu se oocyty kultivují po dobu 5 až 30 minut. Následně jsou oocyty opláchnuty v médiu, které neobsahuje látky uvolňující oxid dusnatý a jsou v tomto médiu kultivovány rovněž po dobu 5 až 30 minut. Tento postup se opakuje tak, aby celková doba pobytu oocytů v médiu obsahujícím molekuly uvolňující oxid dusnatý dosáhla 1 až 3 hodin. Pak jsou oocyty kultivovány běžným laboratorním postupem.

Způsobem podle vynálezu jsou oocyty in vitro vystaveny jen po krátkou dobu, výhodně cca 5 až 30 minut a opakovaně asi 6x až 20x, donoru oxidu dusnatého a mezi tím jsou vždy kultivovány látkami bez donoru oxidu dusnatého. Tento donor působí tedy na oocyty opakovaně v poměrně krátkých obdobích, tzv. pulzech, proto původci vynálezu nazývají svůj nový způsob aktivace oocytů jako, "pulzační aktivace". Při způsobu podle vynálezu jsou oocyty vystaveny účinku

donoru oxidu dusnatého celkově nejvýše po dobu 3 hodin a proto jsou mnohem méně zatíženy přítomností tohoto donoru. Výsledkem zrychleného šetrného způsobu aktivace podle vynálezu je aktivace vyššího podílu oocytů a partenogenetický vývoj takto aktivovaných oocytů je podstatně vyšší, než při dosud používaných způsobech, což má velký hospodářský význam. Způsob „pulzační“ aktivace oocytů podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat (např. klonování, ICSI) i v asistované reprodukci v humánní medicíně, kdy při současném snižování porodnosti tato metoda zvláště nabývá na významu.

Následující příklady provedení způsobů podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení vynálezu

15

Příklad 1

Při klasickém dvouhodinovém kontinuálním ošetření prasečích oocytů 2 mM SNAP dochází k partenogenetické aktivaci u 11 % oocytů. Podle nového postupu jsou dozrálé prasečí oocyty in vitro ve stádiu metafáze II kultivovány 6x po 20 minut v médiu obsahujícím 2 mM SNAP a mezitím jsou 6x kultivovány po 20 minut v médiu bez SNAP. V následujících hodinách je partenogeneticky aktivováno 77 % oocytů. Při klasickém kontinuálním způsobu se partenogenetická embrya nevyvíjejí za stádium 4 buněk. Při pulzačním způsobu aktivace látkami uvolňujícími oxid dusnatý pokračuje vývoj až do stádia blastocyty. Takto získané zvířecí partenogenetické zárodky ve vývojovém stádiu blastocyty lze využít například pro tvorbu embryonálních kmenových buněk.

Příklad 2

30

U některých živočišných druhů (např. kůň) provází oplození v podmínkách in vitro problémy s penetrací spermie do vajíčka. Tento problém se obchází tzv. intracytoplazmatickou injekcí spermie, při kterém je spermie vpravena do vajíčka mikroinjekcí. Tento postup nachází uplatnění i v humánní medicíně při Léčbě neplodnosti nebo při záchraně druhů savců ohrožených vyhoubením. Mikroinjekce spermie ale nemusí navodit podmínky aktivace nezbytné pro zahájení vývoje vzniklého zárodku. Také v tomto případě se může uplatnit, "pulzační aktivace" oocytu látkami uvolňujícími oxid dusnatý. Po mikroinjekci spermie je vajíčko kultivováno 9x po 20 minut v médiu obsahujícím 2 mM SNAP a mezitím jsou 9x kultivovány po 20 minut v médiu bez SNAP. V následujících hodinách nastane u značného podílu takto ošetřených vajíček aktivace a zárodek pokračuje ve vývoji až do stádia blastocyty, kdy je schopen přenosu do dělohy náhradní matky.

Příklad 3

Při klonování savců dochází ke vnášení jaderné dědičné informace somatické buňky do cytoplasmu vajíčka, jež bylo vlastní jaderné dědičné informace zbaveno (bylo enukleováno). Pro následný vývoj embrya klonu je nezbytná aktivace takto vzniklé buňky. Adekvátní aktivací stimul je nezbytný především v případě využití tzv. honolulské techniky, kde je jádro somatické buňky vneseno do cytoplasmu enukleovaného vajíčka mikroinjekcí. Pro aktivaci takto vzniklého zárodku klonu lze využít, "pulzační aktivace" oocytu látkami uvolňujícími oxid dusnatý. Po vnesení jádra somatické buňky mikroinjekcí do enukleovaného oocytu je vzniklý zárodek kultivován 9x po 20 minut v médiu obsahujícím 2 mM SNAP a mezitím je 9x kultivován po 20 minut v médiu bez SNAP. V následujících hodinách nastane u značného podílu takto ošetřených zárodků

aktivace a zárodek pokračuje ve vývoji až do stádia blastocyty, kdy je schopen přenosu do dělohy náhradní matky.

5 Průmyslová využitelnost

Řešení se týká zrychlené partenogenetické aktivace zvířecích oocytů in vitro donory oxidu dusnatého, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

10

15 **P A T E N T O V É N Á R O K Y**

1. Způsob partenogenetické aktivace zvířecích oocytů donory oxidu dusnatého, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že se na zvířecí oocyty opakovaně střídavě krátkodobě působí in vitro látkami obsahujícími a neobsahujícími donory oxidu dusnatého.

20

2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se na zvířecí oocyty opakovaně střídavě po dobu 5 až 30 minut působí in vitro látkami obsahujícími a neobsahujícími donory oxidu dusnatého.

25 3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se na zvířecí oocyty 6x až 20x opakovaně střídavě po dobu 5 až 30 minut působí in vitro látkami obsahujícími a neobsahujícími donory oxidu dusnatého.

30

Konec dokumentu
