

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 946

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/075 (2010.01)

C07D 311/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2018-320**
(22) Přihlášeno: **30.06.2018**
(40) Zveřejněno: **04.09.2019**
(Věstník č. 36/2019)
(47) Uděleno: **25.07.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **04.09.2019**
(Věstník č. 36/2019)

(56) Relevantní dokumenty:

JI-EUN L. et al.: „Effect of alpha-linolenic acid on oocyte maturation and embryo development in pigs,“ Development & Reproduction, vol. 21, no. 2, 2017, str. 205 - 213, ISSN 2465-9525; NGUYEN T. V. et al.: „Chlorogenic acid supplementation during in vitro maturation improves maturation, fertilization and developmental competence of porcine oocytes,“ Reproduction in Domestic Animals, vol. 52, no. 6, 2017, str. 969 - 975, ISSN 0936-6768; KHAN I. et al.: „Lupeol supplementation improves developmental competence of bovine embryos in vitro,“ Theriogenology, vol. 107, únor 2018, str. 203 - 210, ISSN 0093-691X.
KR 20160015109; CN 107142241; CN 107460161.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav živočišné výroby v.v.i., Praha 10,
Uhřetíněves, CZ

(72) Původce:

Ing. Kristýna Hošková, Ph.D., Praha 5, Smíchov,
CZ
Ing. Tereza Žalmová, Ph.D., Praha 6, Hradčany, CZ
Ing. Tomáš Kott, Ph.D., Poleň, CZ
prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc., Praha 10, Uhřetíněves,
CZ

(74) Zástupce:

Patentová kancelář VYNALEZY.cz, Mgr. Hana
JIRKALOVÁ, Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4,
Michle

(54) Název vynálezu:

**Způsob eliminace defektů zrání savčích
oocytů vyvolaných glyfosátem B**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu zdokonalené kultivace oocytů s ukončenou růstovou fází získaných od zvířat, která byla vystavena účinku glyfosátu, v podmínkách in vitro využívající kultivace s nepetalaktonem. Tato kultivace má velké využití při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat.

CZ 307946 B6

Způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem B

Oblast techniky

5

Řešení se týká zvýšení vývojové schopnosti savčích oocytů získaných od zvířat, která byla vystavena nepříznivým účinkům herbicidu glyfosátu. Tento způsob kultivace má velký význam zejména při asistované reprodukci hospodářských zvířat.

10

Dosavadní stav techniky

Narůstající znečištění životního prostředí má za následek poruchy plodnosti. K polutantům, které se na tom významně podílejí, patří i endokrinní disruptory čili látky schopné narušit hormonální rovnováhu organismu. Mezi nimi zaujímají významné místo i herbicidy používané v zemědělství včetně glyfosátu. Tyto látky jsou v životním prostředí velmi rozšířené a jejich negativní efekt se projevuje už ve velmi nízkých koncentracích. Je proto krajně obtížné, ne-li nemožné, zajistit, aby lidé či zvířata nebyli účinku těchto látek vystaveni.

V současné době se pro asistovanou reprodukci savců, např. pro klonování, in vitro oplození, transgenozu, včetně hospodářsky významných druhů, využívají oocyty dozrálé v podmínkách in vitro. Ty mohou pocházet od zvířat, jež byla vystavena účinkům látek znečišťujících životní prostředí. Kvalita takových oocytů je snížena a jejich schopnost dozrát v podmínkách in vitro bývá narušena. Platí to i při expozici zvířat glyfosátem, který se vyskytuje v krmivech a je s to následně narušit zrání oocytů in vitro. Proto se vyvíjejí systémy kultivace, které by riziko narušení in vitro zrání u oocytů ze zvířat exponovaných glyfosátem eliminovaly. Pro tyto kultivační systémy se hledají látky, které by u oocytů kultivovaných in vitro zabránily významným vývojovým defektům.

Pokud by se podařilo zajistit plnohodnotné zrání i u oocytů ze zvířat, která byla předtím v důsledku znečištění životního prostředí vystavena působení glyfosátu, zvýšilo by se využití šlechtitelského potenciálu samic a zefektivnily by se i postupy asistované reprodukce.

Podstata vynálezu

Uvedené problémy odstraňuje způsob kultivace in vitro oocytů hospodářských zvířat podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že oocyty s ukončeným růstem jsou během jejich zrání v podmínkách in vitro kultivovány s nepetalaktonem.

40

Způsob podle vynálezu je charakterizován tím, že se oocyty s ukončenou růstovou fází kultivují in vitro s nepetalaktonem po dobu, která je u daného druhu zvířat běžně nutná pro postup zrání oocytů do metafáze II.

Způsob podle vynálezu je dále charakterizován tím, že se na oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností během jejich zrání in vitro působí v in vitro kultuře nepetalaktonem v koncentracích od 50 do 100 μM , přičemž tato kultivace trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace in vitro pro postup zrání oocytů do stádia metafáze II.

50

Způsob zvýšení ochrany oocytů proti efektům glyfosátu podle vynálezu se konkrétně výhodně provádí tak, že se nezralé savčí oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností in vitro kultivují v médiu s nepetalaktonem v koncentraci 75 μM . Kultivace trvá dobu, která je u daného druhu potřebná pro dozrání oocytů s ukončenou růstovou fází a plnou

vývojovou schopností v podmínkách in vitro, tj. u prasete asi 44 až 48 hodin, u skotu 22 až 24 hodin, načež se získá nejméně 75 % kvalitních oocytů pro jejich další použití.

5 Způsobem podle vynálezu jsou oocyty vystaveny působení nepetalaktonu, což má pozitivní vliv na kvalitu zrání oocytů, především pak na integritu dělicího vřeténka a euploidní stav chromozomů dozrálého oocytu. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože experimenty původců prokázaly, že kultivace s nepetalaktonem má příznivý efekt na zrání oocytů od zvířat, jež byla předtím vystavena účinku glyfosátu. Pokud není použit způsob podle vynálezu, pak většina kultivovaných oocytů ze zvířat, jež byla předtím vystavena účinkům glyfosátu, má narušené dělicí vřeténko a při vydělení prvního pólového tělíska dochází k aneuploidiím. Takové oocyty 10 jsou pro většinu biotechnologií nepoužitelné. Způsobem podle vynálezu je dosaženo úplného zrání oocytů do metafáze II u více než 75 % oocytů. Tyto oocyty lze použít pro další reprodukční biotechnologie, protože jsou s to se vyvíjet v kvalitní embrya.

15 Výsledkem způsobu kultivace podle vynálezu je podstatné zvýšení podílu oocytů, jež dokončí zrání a jsou využitelné pro další reprodukční biotechnologie. Ve srovnání s tradičními postupy kultivace je nárůst podílu dozrálých oocytů zhruba dvoj- až trojnásobný, což má velký hospodářský význam. Způsob kultivace in vitro oocytů od zvířat, jež byla předtím vystavena účinku glyfosátu, podle vynálezu, lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích 20 hospodářských zvířat, např. pro klonování či ICSI.

Způsob zvýšení vývojové schopnosti oocytů od zvířat vystavených před kultivací glyfosátu jejich kultivací in vitro s nepetalaktonem podle vynálezu byl původci úspěšně ověřen v laboratořích a stájích u přihlašovatele, kterým je Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., v Praze, CZ.

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

30 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Při klasické kultivaci prasečích oocytů od prasnic, jež byly předtím vystaveny účinkům glyfosátu, 35 dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stádia metafáze II u 38 % oocytů.

Způsobem podle vynálezu jsou prasečí oocyty s ukončenou růstovou fází kultivovány 44 hodin v kultivačním médiu s přídavkem 75 μ M nepetalaktonu. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II s četností přes 75 %. Takto získané 40 oocyty lze podrobit standardní partenogenetické aktivaci a navodit u nich vývoj do stádia blastocysty. Takto získané savčí partenogenetické zárodky ve vývojovém stádiu blastocysty lze využít například pro tvorbu embryonálních kmenových buněk.

Příklad 2

45 Při tradiční kultivaci oocytů skotu s ukončeným růstem od krav, jež byly předtím vystaveny účinkům glyfosátu, dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stádia metafáze II u 41 % oocytů.

50 Způsobem podle vynálezu jsou oocyty skotu s ukončenou růstovou fází od krav, jež byly předtím vystaveny účinku glyfosátu, kultivovány 24 hodin v kultivačním médiu se 75 μ M nepetalaktonu. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II s četností přes 80 %. Takto získané oocyty lze podrobit standardnímu oplození in vitro. Úspěšně oplozené oocyty se dále vyvíjejí v embrya vhodná pro přenos náhradní matce.

55

Průmyslová využitelnost

- 5 Nový způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem se týká zdokonaleného kultivačního postupu oocytů in vitro, jenž využívá účinků nepetalaktonu, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat.

10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných glyfosátem, **vyznačující se tím**, že během zrání těchto oocytů v podmínkách in vitro jsou oocyty vystaveny působení nepetalaktonu.
- 15 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se na oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností od zvířat, jež byla předtím vystavena účinkům glyfosátu, během jejich zrání in vitro působí nepetalaktonem v koncentracích od 50 do 100 μM , přičemž tato
- 20 kultivace trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace in vitro pro postup zrání oocytů do stádia metafáze II, tj. u prasete 44 až 48 hodin a u skotu 22 až 24 hodin, načež se získá nejméně 75 % kvalitních oocytů.