

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2017-366

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/075 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **23.06.2017**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **02.01.2019**
(Věstník č. 1/2019)

(71) Přihlašovatel:
Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha
10, CZ

(72) Původce:
Ing. Tomáš Kott, Ph.D., Poleň, CZ
prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc., Praha 10 -
Uhřetěves, CZ

(74) Zástupce:
PATENTOVÁ KANCELÁŘ, Mgr. Hana Jirkalová,
Michelská 18/12a, 140 00 Praha 4

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob eliminace defektů zrání savčích
oocytů vyvolaných bisfenolem A nebo
bisfenolem S**

(57) Anotace:
Způsob zdokonalené kultivace oocytů s ukončenou
růstovou fází získaných od zvířat, která byla
vystavena účinku bisfenolu A nebo bisfenolu S,
v podmínkách in vitro využívající kultivace
s inhibitory SERCA. Tato kultivace má velké
využití při reprodukčních biotechnologiích
hospodářských zvířat.

CZ 2017 - 366 A3

Způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných bisfenolem A nebo bisfenolem SOblast techniky

5

Řešení se týká zvýšení vývojové schopnosti savčích oocytů získaných od zvířat, která byla vystavena nepříznivým účinkům endokrinních disruptorů bisfenolu A nebo bisfenolu S. 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 bisfenoly, především pak bisfenol A a bisfenol S, používané hojně do nejrůznějších plastů, ale i dalších produktů (nejrůznější druhy papíru včetně recyklovaných papírů). Endokrinní disruptory včetně bisfenolu A a bisfenolu S 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 (klonování, in vitro oplození, transgenóza) včetně hospodářsky významných druhů využívají oocyty dozrálé v podmínkách in vitro. Ty mohou pocházet od zvířat, jež byla vystavena účinkům endokrinních disruptorů. Kvalita takových oocytů je snížena a jejich schopnost dozrát v podmínkách in vitro bývá narušena. Platí to i při expozici zvířat bisfenolu A nebo bisfenolu S. Oba tyto endokrinní disruptory jsou s to narušit následné zrání oocytů in vitro. Proto se vyvíjejí systémy kultivace, které by riziko narušení in vitro zrání u oocytů ze zvířat exponovaných bisfenolem A nebo bisfenolem S snížily či 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 bisfenolu A nebo bisfenolu S, zvýšilo by se využití šlechtitelského potenciálu samic a zefektivnily by se i postupy asistované reprodukce.

Podstata vynálezu

Uvedené problémy odstraňuje způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných bisfenolem A nebo bisfenolem S podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že v oocytech s ukončeným růstem jsou během jejich zrání v podmínkách in vitro inhibovány sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPázy (SERCA).

Způsob podle vynálezu je charakterizován tím, že se oocyty s ukončenou růstovou fází kultivují in vitro s inhibitory SERCA, obsahující kyselinu cyklopiazonovou nebo thapsigargin, po dobu, která je u daného druhu 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 kyselinou cyklopiazonovou nebo thapsigarginem v koncentracích od 1 do 1000 nM, přičemž tato kultivace trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace in vitro pro postup zrání oocytů do stádia metafáze II.

Způsob podle vynálezu je také charakterizován tím, že se na oocyty působí kyselinou cyklopiazonovou v koncentracích od 10 do 40 nM nebo thapsigarginem v koncentracích od 100 do 200 μ M.

Způsob zvýšení ochrany oocytů proti efektům bisfenolu A a bisfenolu S 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 inhibitorem SERCA. Např. kyselina cyklopiazonová se používá v koncentracích od 10 do 40 nM, thapsigargin se používá v koncentracích od 100 do 200 μ M. 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 hodin, u skotu 22 až 24 hodin).

Způsobem podle vynálezu jsou oocyty vystaveny působení inhibitoru SERCA, což má pozitivní vliv na kvalitu zrání oocytů, především pak na integritu dělicího vřeténka a euploidní stav chromozomů dozrálého oocyty. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože experimenty původců prokázaly, že kultivace s inhibitory SERCA má příznivý efekt na zrání oocytů od zvířat, jež byla předtím vystavena účinku bisfenolu A nebo bisfenolu S. Pokud není použit způsob podle vynálezu, pak většina kultivovaných oocytů ze zvířat, jež byla předtím vystavena neblahým účinkům bisfenolu A nebo bisfenolu S, má narušené dělicí vřeténko a při vydělení prvního pólového tělíska dochází k aneuploidii. Takové oocyty jsou pro většinu biotechnologií nepoužitelné. Způsobem podle vynálezu je dosaženo úplného zrání oocytů do metafáze II u více než 90 % oocytů. Tyto oocyty lze použít pro další reprodukční biotechnologie, protože jsou s to se vyvíjet v kvalitní embrya.

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 bisfenolu A nebo bisfenolu S, podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat (např. klonování, ICSI).

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

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

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Při klasické kultivaci prasečích oocytů od prasnic, jež byly předtím vystaveny účinkům bisfenolu A nebo bisfenolu S, dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stádia metafáze II u 40 % oocytů. Způsobem podle vynálezu jsou prasečí oocyty s ukončenou růstovou fází kultivovány 44 hodin v kultivačním médiu s přídatkem 25 nM kyseliny cyklopiazonové. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II (přes 90 %). Takto získané oocyty lze podrobit standardní partenogenetické aktivaci a navodit u nich

vývoj do stádia blastocysty. Takto získané savčí partenogenetické zárodky ve vývojovém stádiu blastocytu lze využít například pro tvorbu embryonálních kmenových buněk.

Příklad 2

5

Při tradiční kultivaci oocytů skotu s ukončeným růstem od krav, jež byly předtím vystaveny účinkům bisfenolu A nebo bisfenolu S, dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stádia metafáze II u 25 % oocytů. Způsobem podle vynálezu jsou oocyty skotu s ukončenou růstovou fází od krav, jež byly předtím vystaveny účinku bisfenolu A nebo bisfenolu S, kultivovány 24 hodin v kultivačním médiu se 150 nM thapsigarginu. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II (přes 90 %). Takto získané oocyty lze podrobit standardnímu oplození in vitro. Úspěšně oplozené oocyty se dále vyvíjejí v embrya vhodná pro přenos náhradní matce.

15

Průmyslová využitelnost

Nový způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných bisfenolem A nebo bisfenolem S umožňuje zdokonalení kultivačního postupu oocytů in vitro, jenž využívá účinků inhibitorů SERCA, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat.

25

PATENTOVÉ NÁROKY

- 30 1. Způsob eliminace defektů zrání savčích oocytů vyvolaných bisfenolem A nebo bisfenolem S, **vyznačující se tím**, že v oocytech s ukončeným růstem jsou během jejich zrání v podmínkách in vitro inhibovány sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPázy (SERCA).
- 35 2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se oocyty s ukončenou růstovou fází kultivují in vitro s inhibitory SERCA, obsahující kyselinu cyklopiazonovou nebo thapsigargin, po dobu, která je u daného druhu běžně nutná pro postup zrání oocytů do metafáze II.
- 40 3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se na oocyty s ukončeným růstem a úplně vyvinutou vývojovou schopností během jejich zrání in vitro působí kyselinou cyklopiazonovou nebo thapsigarginem v koncentracích od 1 do 1000 nM, přičemž tato kultivace trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace in vitro pro postup zrání oocytů do stádia metafáze II.
- 45 4. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se na oocyty působí kyselinou cyklopiazonovou v koncentracích od 10 do 40 nM nebo thapsigarginem v koncentracích od 100 do 200 μM .