

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2005-369**
(22) Přihlášeno: **10.06.2005**
(40) Zveřejněno: **03.01.2007**
(**Věstník č. 1/2007**)
(47) Uděleno: **04.12.2006**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **03.01.2007**
(**Věstník č. 1/2007**)

(11) Číslo dokumentu:

297 528

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

<i>C12N 5/02</i>	(2006.01)
<i>C12N 5/06</i>	(2006.01)
<i>C12N 5/08</i>	(2006.01)
<i>C07D 231/54</i>	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 0158448; EP 1506784.

Christoph, P. et al.: "c-Jun N-terminal Kinase Activation in *Xenopus laevis* Eggs and Embryos", J. Biol. Chem. 276(2), 1459-1465, 2001.

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

Petr Jaroslav prof. Ing. DrSc., Praha, CZ
Jílek František prof. MVDr. 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:

**Použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro
přípravu kultivačního média na prodloužení
životnosti savčích oocytů in vitro**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro, kdy se odebrané savčí oocyty kultivují v podmínkách in vitro v kultivačním médiu s přídavkem specifického inhibitoru MAP kinázy JNK. Uchovávání odebraných savčích oocytů v podmínkách in vitro za současné inhibice MAP kinázy JNK zajišťuje zvýšenou životaschopnost oocytů a má velký význam při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

CZ 297528 B6

Použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro

5 Oblast techniky

Vynález se týká použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti odebraných savčích oocytů uchovávaných pro reprodukci po delší dobu v podmínkách in vitro.

10

Dosavadní stav techniky

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

25 Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se odebrané savčí oocyty kultivují v podmínkách in vitro v kultivačním médiu s

30 přídatkem specifického inhibitoru MAP kinázy JNK.

Použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro podle vynálezu se dále vyznačuje tím, že se odebrané dozrálé savčí oocyty in vitro kultivují před oplodněním v kultivačním médiu s obsahem inhibitoru MAP kinázy JNK po dobu nejméně 3 až 5 dnů, přičemž inhibitor MAP kinázy JNK je používán v koncentracích od 5 do 50 μM . Poté jsou oocyty opláchnuty kultivačním médiem, případně jsou přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního média s inhibitorem na dobu alespoň 1 až 3 dnů.

Podstata použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro podle vynálezu dále spočívá v tom, že se odebrané savčí oocyty kultivují a zrají in vitro po dobu až 5 dnů s inhibitory MAP kinázy JNK, přičemž výhodná koncentrace inhibitoru MAP kinázy JNK v kultivačním médiu je 5 až 50 μM , načež se po případném opláchnutí kultivačním médiem oocyty již po 3 dnech přenesou do čerstvě připraveného kultivačního média s inhibitorem.

45

Použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro se podle vynálezu konkrétně provádí tak, že se dozrálé savčí oocyty, nacházející se ve stádiu zrání metafáze II, zbaví kumulárních buněk opakovaným pipetováním úzkou skleněnou pipetou, potom se propláchnou v kultivačním médiu (např. médium M.199 obohacené o 10 % bovinního telecího Séra) a pak jsou přeneseny do kultivačního média s přídatkem molekul inhibujících MAP kinázu JNK (např. SAPK inhibitor I: H-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Agr-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Pro-Thr-ThrLeu-Asn-Leu-Phe-Pro-Gln-Val-Pro-Arg-Ser-Gln-Asp-Thr-NH₂; SAPK inhibitor II: 1,9-pyrazoloantron; SAPK inhibitor III: Ac-Tyr-Gly-Arg-LysLys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-gaba-Ile-Leu-Lys-Gln-Ser-Met-Thr-Leu-

50

Asn-Leu-Ala-Asp-Pro-Val-Gly-Ser-Leu-Lys-Pro-His-Leu-Arg-Ala-Lys-Asn-NH₂ nebo JNK inhibitor IV: (D)-H-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Pro-Lys-Arg-Pro-Thr-Thr-Leu-Asn-Leu-Phe-Pro-Gln-Val-Pro-Arg-Ser-Gln-Asp-Thr-NH₂) v koncentracích od 1 do 100 µM. V tomto médiu se odebrané oocyty kultivují až po dobu 3 dnů. Pro další kultivaci je výhodné, aby po 3 dnech kultivace byly oocyty opláchnuty v čerstvě připraveném médiu obohaceném o vybraný inhibitor MAP kinázy JNK a následně byly kultivovány opět v čerstvě připraveném médiu obohaceném o inhibitor MAP kinázy JNK. Po ukončení kultivace s cílem prodloužit životaschopnost oocytů in vitro jsou oocyty před dalším použitím propláchnuty v médiu bez inhibitoru a kultivovány běžně známým laboratorním postupem.

Původci vynálezu ověřili, že použitím inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média podle vynálezu jsou u oocytů kultivovaných po dlouhou dobu v podmínkách in vitro potlačeny procesy fragmentace a lýzy oocytů. Například při kultivaci oocytů v médiu s obsahem 30 µM 1,9 parazoloantronu po dobu tří dnů nedochází u oocytů prasete vůbec k fragmentaci ani lýze, zatímco při kultivaci dosavadním standardním způsobem dosahuje za stejnou dobu podíl fragmentovaných oocytů zhruba 25 % a podíl lyzovaných oocytů zhruba 10 %. Výsledkem kultivace oocytů v přítomnosti inhibitorů MAP kinázy JNK podle vynálezu je tedy eliminace nežádoucích procesů fragmentace a lýzy oocytů. Podíl oocytů, které si uchovávají prodlouženou životaschopnost použitím inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média podle vynálezu, je podstatně vyšší.

Při oplození oocytů in vitro hospodářských zvířat (ať již metodou kultivace oocytů se spermiemi nebo metodou mikroinjekce spermie 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 spermiemi nebo metodou mikroinjekce spermie 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 inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení kultivace oocytů za současné inhibice MAP kinázy JNK podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat (např. klonování, in vitro oplození, IVF, ICSI, transgenozí) i v asistované reprodukci v humánní medicíně, kdy při současném snižování porodnosti tato metoda zvláště nabývá na významu.

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 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 média obohaceného o inhibitory MAP kinázy JNK. Původci vynálezu bylo zjištěno, že takto použité oocyty nebo cytoplasy (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 inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení

10

Příklad 1

Dozrálé prasečí oocyty (600 oocytů) ve stádiu metafáze II byly po dozrání v podmínkách in vitro kultivovány před oplozením v médiu obohaceném o 20 μ M inhibitoru MAP kinázy JNK 1,9-pyrazoloantron. V tomto kultivačním médiu byly kultivovány až do chvíle, kdy je vše připraveno k jejich oplození. Pak byly oocyty opláchnuty médiem bez inhibitoru 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 inhibitoru MAP kinázy JNK, a i vzniklá embrya byla životaschopnější. Úspěšnost reprodukce s oocytami kultivovanými podle vynálezu byla při opakovaných pokusech u selat v průměru 52 až 86 % (u reprodukce podle dosavadního způsobu zacházení s oocytami bývá cca 45 %).

Při ověřování použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média 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 15 až 25 % oproti současně používaným způsobům reprodukce hospodářských zvířat.

Příklad 2

30

Dozrálé lidské oocyty (20 oocytů) ve stádiu metafáze II byly kultivovány před oplozením v médiu obohaceném o 20 μ M inhibitoru MAP kinázy JNK 1,9-pyrazoloantron. V tomto kultivačním médiu byly kultivovány až do chvíle, kdy je vše připraveno k jejich oplození. Pak byly oocyty opláchnuty médiem bez inhibitoru a následně podrobeny obvyklým postupům potřebným k oplození in vitro. Takto ošetřené oocyty mají vyšší kvalitu a i vzniklá embrya jsou životaschopnější o cca 10 až 15 % než oocyty, které by byly před oplozením kultivovány bez inhibitoru MAP kinázy JNK.

Příklad 3

40

Dozrálé prasečí oocyty (50 oocytů) ve stádiu metafáze II byly po dozrání v podmínkách in vitro kultivovány v médiu obohaceném o 20 μ M inhibitoru MAP kinázy JNK 1,9-pyrazoloantron. V tomto médiu 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 20 % případů. Pokud byly oocyty nechány před přípravou cytoplastů stejně dlouhou dobu bez inhibitoru MAP kinázy JNK, jejich kvalita se zhoršila natolik, že je nebylo možné pro klonování použít v důsledku vysoké náchylnosti k fragmentaci (zániku programovanou smrtí - apoptózou).

50

Průmyslová využitelnost

5 Řešení se týká prodlouženího uchovávání Savčích oocytů v podmínkách in vitro za současné inhibice MAP kinázy JNK, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

Vysvětlení zkratk použitých v textu:

10	MAP	mitogeny aktivovaná protein kináza
	JNK	c-Jun NH ₂ koncová kináza (c-Jun NH ₂ terminal kinase)
	SAPK	synonymum k JNK, (stress-activated protein kinase) stresem aktivovaná protein kináza
	MAP kináza JNK	c-Jun NH ₂ koncová kináza patřící do skupiny mitogeny aktivovaných protein kináz
15	IVF	in vitro oplodnění (in vitro fertilization)
	ICSI	intracytoplazmatická injekce spermií (intracytoplasmic sperm injection)

20

P A T E N T O V É N Á R O K Y

25 **1.** Použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro, kdy se odebrané savčí oocyty kultivují v podmínkách in vitro v kultivačním médiu s přidavkem specifického inhibitoru MAP kinázy JNK.

30 **2.** Použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média, podle nároku 1, kdy se odebrané dozrále savčí oocyty in vitro kultivují před oplodněním v kultivačním médiu s obsahem inhibitoru MAP kinázy JNK po dobu nejméně 3 až 5 dnů, přičemž koncentrace inhibitoru MAP kinázy JNK v kultivačním médiu je 5 až 50 μM, poté jsou oocyty opláchnuty kultivačním médiem, případně jsou přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního média s inhibitorem na dobu alespoň 1 až 3 dnů.

35 **3.** Použití inhibitoru MAP kinázy JNK pro přípravu kultivačního média, podle nároku 1, kdy se odebrané savčí oocyty kultivují a zrají in vitro po dobu až 5 dnů s inhibitory MAP kinázy JNK, přičemž výhodná koncentrace inhibitoru MAP kinázy JNK v kultivačním médiu je 5 až 50 μM, poté se po případném opláchnutí kultivačním médiem oocyty již po 3 dnech přenesou do čerstvě připraveného kultivačního média s inhibitorem.

40

Konec dokumentu
