

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14.03.2007**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **04.06.2008**
(Věstník č. 23/2008)

(21) Číslo dokumentu:

2007-197

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)
C07C 217/76 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

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

(72) Původce:

Jílek František Prof. MVDr. Ing. DrSc., Praha 6 Dejvice,
CZ
Petr Jaroslav Prof. Ing. DrSc., Praha 10 - Uhřetěves, CZ
Jeřeta Michal Ing. PhD., Chýnov, CZ
Rozinek Jiří Prof. Ing. CSc., Praha 6 - Suchbát, CZ
Rajmon Radko MVDr. PhD., Velké Přílepy, CZ
Sedmíková Eva Mgr. Ing. PhD., Praha 6 - Střešovice, CZ
Chmelíková Eva Ing. PhD., Praha 12 - Kamýk, CZ
Lánská Vilma Ing. PhD., Praha 9 - Střížkov, CZ
Kuthanová Zuzana Ing., Praha 4, CZ
Härtlová Helena MVDr. CSc., Nymburk, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití inhibitoru histon deacetylázy pro
přípravu kultivačního média na prodloužení
životnosti savčích oocytů in vitro**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití inhibitoru histon deacetylázy 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 histon deacetylázy. Uchovávání
odebraných savčích oocytů v podmínkách in vitro za současné
inhibice histon deacetylázy zajišťuje zvýšenou
životaschopnost oocytů a má velký význam při reprodukčních
biotechnologiích u hospodářských zvířat i v asistované
reprodukci v humánní medicíně.

14.03.00
~~11.04.197~~
1661

Použití inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro

Oblast techniky

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

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 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.

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje použití inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti odebraných 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 přídavkem specifického inhibitoru histon deacetylázy.

Použití inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média, podle vynálezu se dále vyznačují tím, že se odebrané dozrálé savčí oocyty in vitro kultivují před oplodněním v kultivačním médiu s obsahem inhibitoru histon deacetylázy po dobu 3 až 5 dnů, přičemž koncentrace inhibitoru histon

deacetylázy v kultivačním médiu je 10 nM až 1 mikroM. Poté jsou oocyty opláchnuty kultivačním médiem, případně jsou přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního média s inhibitorem pro kultivaci dalších 1 až 3 dnů.

Použití inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti savčích oocytů in vitro se též vyznačuje tím, že se odebrané dozrálé savčí oocyty kultivují in vitro po dobu až 5 dnů s inhibitory histon deacetylázy, přičemž výhodná koncentrace inhibitoru histon deacetylázy v kultivačním médiu je 10 nM až 1 mikroM. Poté se po případném opláchnutí kultivačním médiem oocyty přenesou do čerstvě připraveného kultivačního média pro další běžné zpracování, jako jsou reprodukční biotechnologie (např. partenogenetickou aktivaci, oplození in vitro, pro přípravu cytoplastů k přenosu jader somatických buněk, tj. klonování).

Použití inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média na prodloužení životnosti odebraných savčích oocytů uchovávaných pro reprodukci po delší dobu v podmínkách in vitro podle vynálezu se výhodně provádí tak, že se savčí oocyty dozrálé do stádia metafáze II zbaví kumulárních buněk opakovaným pipetováním úzkou skleněnou pipetou. Poté se propláchnou v kultivačním médiu (např. médium M199 obohacené o 10 % hmot. bovinního telecího séra) a pak jsou přeneseny do kultivačního média s přídavkem molekul inhibujících histon deacetylázu (např. trichostatin A) v koncentracích od 1 do 1000 nM. V tomto médiu se oocyty kultivují 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 histon deacetylázy a následně byly kultivovány v čerstvě připraveném médiu obohaceném o inhibitor histon deacetylázy. Po ukončení kultivace s cílem prodloužit životaschopnost oocytů jsou oocyty před dalším použitím propláchnuty v médiu bez aktivátoru a kultivovány běžným laboratorním postupem.

Původci vynálezu ověřili, že použitím inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média podle vynálezu jsou u oocytů kultivovaných po dlouhou dobu v podmínkách in vitro potlačeny procesy fragmentace a lýzy. Například při kultivaci v médiu s 10 nM trichostatinu A 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 histon deacetyláz je tedy eliminace nežádoucích procesů fragmentace a lýzy oocytů. Podíl oocytů, které si uchovávají životaschopnost, je tak podstatně vyšší.

Při in vitro oplození oocytů hospodářských zvířat (ať již metodou kultivace oocytů se spermii nebo metodou mikroinjekce spermie do cytoplasmy oocytu) 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 plemeníka, 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 spermie do cytoplasmy oocytu) 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 histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média na prodloužení kultivace oocytů za současné inhibice histon deacetylázy 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 histon deacetylázy. 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 histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média podle vynálezu pouze dokládají, aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení

Příklad 1

Dozrálé prasečí oocyty (400 oocytů) ve stádiu metafáze II byly po dozrání v podmínkách *in vitro* kultivovány před oplozením v médiu obohaceném o 10 nM inhibitoru histon deacetylázy trichostatinu A. 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 histon deacetylázy, a i vzniklá embrya byla životaschopnější. Úspěšnost reprodukce s oocytami kultivovanými podle vynálezu byla při opakovaných pokusech v průměru 70 % (u reprodukce podle dosavadního způsobu zacházení s oocytami bývá cca 45 %).

Při ověřování použití inhibitoru histon deacetylázy 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 20 % oproti současně používaným způsobům reprodukce hospodářských zvířat.

Příklad 2

Dozrálé lidské oocyty (17 oocytů) ve stádiu metafáze II byly kultivovány před oplozením v médiu obohaceném o 10 nM inhibitoru histon deacetylázy trichostatinu A. 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 % než oocyty, které by byly před oplozením kultivovány bez inhibitoru histon deacetylázy trichostatinu A..

Příklad 3

Dozrálé prasečí oocyty (40 oocytů) ve stádiu metafáze II byly po dozrání v podmínkách in vitro kultivovány v médiu obohaceném o 10 nM inhibitorem histon deacetylázy trichostatinu A. 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 18 % případů. Pokud byly oocyty nechány před přípravou cytoplastu stejně dlouhou dobu bez inhibitoru histon deacetylázy trichostatinu A., jejich kvalita se zhoršila natolik, že nebylo možné pro klonování použít v důsledku vysoké náchylnosti k fragmentaci (zániku programovanou smrtí – apoptózou).

Průmyslová využitelnost

Řešení se týká prodlouženého uchovávání savčích oocytů v podmínkách in vitro za současné inhibice histon deacetylázy, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

Vysvětlení zkratk použitých v textu:

HDA	histon deacetyláza
TSA	trichostatin A
IVF	in vitro oplodnění (in vitro fertilization)
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie (intra cytoplasmic sperm injection)

14.03.07
~~PH 1007-197~~
16616

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití inhibitoru histon deacetylázy 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 histon deacetylázy.
2. Použití inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního media, podle nároku 1, kdy se odebrané dozrálé savčí oocyty in vitro kultivují před oplodněním v kultivačním médiu s obsahem inhibitoru histon deacetylázy po dobu 3 až 5 dnů, přičemž koncentrace inhibitoru histon deacetylázy v kultivačním médiu je 10 nM až 1 mikroM, poté jsou oocyty opláchnuty kultivačním médiem, případně jsou přeneseny do čerstvě připraveného kultivačního média s inhibitorem pro kultivaci dalších 1 až 3 dnů.
3. Použití inhibitoru histon deacetylázy pro přípravu kultivačního média, podle nároku 1, kdy se odebrané dozrálé savčí oocyty kultivují in vitro po dobu až 5 dnů s inhibitory histon deacetylázy, přičemž výhodná koncentrace inhibitoru histon deacetylázy v kultivačním médiu je 10 nM až 1 mikroM, poté se po případném opláchnutí kultivačním médiem oocyty přenesou do čerstvě připraveného kultivačního média pro další běžné zpracování.