

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008-441**
(22) Přihlášeno: **15.07.2008**
(40) Zveřejněno: **27.01.2010**
(Věstník č. 4/2010)
(47) Uděleno: **24.11.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **05.01.2011**
(Věstník č. 1/2011)

(11) Číslo dokumentu:

302 232

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/075 (2010.01)
C12N 5/07 (2010.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5882928; WO 2004035766.

Mochida a Hunt (2007) Nature, Vol. 449, Issue 7160, 336-340; Nishiyama a kol. (2007) Nature, Vol. 449, Issue 7160, 341-345.

(73) Majitel patentu:

Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 6 - Suchbát, CZ
Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha 10 -
Uhřetíněves, CZ

(72) Původce:

Jílek František Prof. MVDr. DrSc., Praha 6 - Dejvice, CZ
Petr Jaroslav Prof. Ing. DrSc., Praha 10 - Uhřetíněves, CZ
Rajmon Radko MVDr. Ph.D., Velké Přílepy, CZ
Chmelíková Eva Ing. Ph.D., Praha 4 - Kamýk, CZ

(74) Zástupce:

Ministerstvo zemědělství ČR, Mgr. Hana Jirkalová,
Těšnov 17, Praha 1, 11705

(54) Název vynálezu:

**Způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích
oocytů inhibicí kalcineurinu**

(57) Anotace:

Způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů inhibicí kalcineurinu, což se provádí tak, že na oocyty s neukončeným růstem se působí během jejich zrání v podmínkách in vitro látkami, které specificky brání defosforylaci proteinů a inhibují aktivitu kalcineurinu. Tato kultivace má velké využití při reprodukčních biotechnologiích zejména u hospodářských zvířat.

CZ 302232 B6

Způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů inhibicí kalcineurinu

Oblast techniky

5

Vynález se týká zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů v podmínkách kultivace in vitro s využitím látek inhibujících kalcineurin (protein fosfatázu 2B, zkráceně PP2B). Tento způsob kultivace má velký význam zejména při asistované reprodukci hospodářských zvířat.

10

Dosavadní stav techniky

V současné době se pro asistovanou reprodukci savců (klonování, in vitro oplození, transgenoze) včetně hospodářsky významných druhů využívají oocyty, což jsou samičí pohlavní buňky, které ukončily v těle samice růstovou fázi. Těchto oocytů je v daný okamžik od jednoho zvířete dostupný jen omezený počet a to limituje využití metod asistované reprodukce. Kromě oocytů s ukončenou růstovou fází se nachází ve vaječnících samice i mnohonásobně vyšší počet oocytů, které ještě růstovou fází neukončily. Tyto oocyty ale mají sníženou vývojovou schopnost a pro metody asistované reprodukce je nelze použít. To významně snižuje možnosti využití šlechtitelského potenciálu samic s vysokou plemennou hodnotou a omezuje možnosti asistované reprodukce, protože se často nedaří získat dostatek vajíček ve fázi ukončeného růstu. Pokud by se podařilo zvýšit vývojové schopnosti oocytů s neukončenou růstovou fází, využití šlechtitelského potenciálu samic by se zvýšilo a zefektivnily by se i postupy asistované reprodukce.

25

Podstata vynálezu

Uvedené problémy odstraňuje způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů inhibicí kalcineurinu, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že na oocyty s neukončeným růstem se působí během jejich zrání v podmínkách in vitro látkami, které specificky brání defosforylaci proteinů a inhibují aktivitu kalcineurinu.

Způsob podle vynálezu se dále provádí tak, že se oocyty s neukončenou růstovou fází kultivují in vitro s inhibitorem kalcineurinu po dobu, která je u daného živočišného druhu běžně nutná pro dosažení stadia metafáze I, poté jsou oocyty opět kultivovány v médiu bez inhibitoru kalcineurinu po dobu, která je běžně u daného druhu nutná pro postup zrání z metafáze I do metafáze II.

Způsob podle vynálezu se výhodně provádí tak, že na oocyty s neukončeným růstem se během kultivace in vitro v počáteční fázi působí látkami, jež jsou inhibitory kalcineurinu, zejména cypermethrinem v koncentracích od 1 do 100 μM , deltamethrinem v koncentracích od 5 do 200 μM a fenvalerátem v koncentracích od 100 do 500 μM .

Způsob zvýšení vývojové schopnosti oocytů podle vynálezu se konkrétně provádí tak, že se nezralé savčí oocyty s neukončeným růstem a neúplně vyvinutou vývojovou schopností in vitro nejprve kultivují v určité fázi kultivace v médiu se specifickým inhibitorem kalcineurinu (PP2B). Doba této kultivace odpovídá času, za jaký nezralé, dorostlé oocyty s plnou vývojovou schopností dosáhnou stadia metafáze I (24 hodin u prasete, 12 hodin u skotu, ovce). Např. cypermethrin se používá v koncentracích od 1 do 100 μM , deltamethrin se používá v koncentracích od 5 do 200 μM a fenvalerát v koncentracích od 100 do 500 μM . Následně jsou oocyty důkladně promyty a kultivovány v médiu bez inhibitorů kalcineurinu (PP2B) po dobu, za jakou dorostlé oocyty s plnou vývojovou schopností dospějí ze stadia metafáze I do stadia metafáze II a dokončí tak zrání (např. prase 20 hodin, skot a ovce 10 hodin).

- Způsobem podle vynálezu je v oocytech specificky inhibován kalcineurin (PP2B) a nedochází k defosforylaci proteinů. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože experimenty původců prokázaly, že dočasná inhibice kalcineurinu a takto vyvolaná inhibice defosforylace proteinů má příznivý efekt na další průběh zrání oocytů. Pokud není použit způsob podle vynálezu, zastaví většina kultivovaných oocytů s neukončeným růstem a neúplnou vývojovou schopností zrání ve stadiu metafáze I a jsou pro většinu biotechnologií již nepoužitelné. Způsobem podle vynálezu je dosaženo úplného zrání oocytů do metafáze II u 67 % oocytů. Tyto oocyty lze použít pro další reprodukční biotechnologie, protože jsou s to se vyvíjet v 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 trojnásobný, což má velký hospodářský význam. Způsob kultivace oocytů in vitro podle vynálezu s cílenou inhibicí kalcineurinu (PP2B) v počáteční fázi kultivace lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích zejména u hospodářských zvířat (např. klonování, ICSI), ale i v humánní medicíně.

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

Příklady provedení

Příklad 1

Při klasické kultivaci prasečích oocytů s neukončeným růstem dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stadia metafáze II u 18 % oocytů. Při způsobu podle vynálezu jsou prasečí oocyty s neukončenou růstovou fází kultivovány nejprve po 24 hod. s inhibitorem kalcineurinu (PP2B) cypermethrinem v koncentraci 25 μM a poté jsou kultivovány opět 24 hodin v kultivačním médiu bez přídavku inhibitorů kalcineurinu (PP2B). Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stadia metafáze II (75 %). Takto získané oocyty lze podrobit standardní partenogenetické aktivaci a navodit u nich vývoj do stadia blastocysty. Takto získané savčí partenogenetické zárodky ve vývojovém stadiu blastocysty lze využít například pro tvorbu embryonálních kmenových buněk.

Příklad 2

Při tradiční kultivaci oocytů skotu s neukončeným růstem dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stadia metafáze II u 14 % oocytů. Při způsobu podle vynálezu jsou oocyty skotu s neukončenou růstovou fází kultivovány nejprve po 12 hodin v kultivačním médiu s přídavkem inhibitoru kalcineurinu (PP2B) 100 μM deltamethrinu a následně jsou kultivovány dalších 12 hodin v médiu bez inhibitoru kalcineurinu (PP2B). Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stadia metafáze II (68 %). Takto získané oocyty lze podrobit standardnímu oplození in vitro. Úspěšně oplozené oocyty se dále vyvíjejí v embrya vhodná pro přenos náhradní matce.

Příklad 3

Při klasické kultivaci prasečích oocytů s neukončeným růstem dochází v podmínkách in vitro k dokončení zrání do stadia metafáze II u 18 % oocytů. Při způsobu podle vynálezu jsou prasečí oocyty s neukončenou růstovou fází kultivovány nejprve po 24 hodin v kultivačním médiu s inhibitorem kalcineurinu (PP2B) 250 μ M fenvalerátu a následně pak jsou kultivovány dalších 24 hodin v kultivačním médiu bez přídavku inhibitorů kalcineurinu (PP2B). Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stadia metafáze II (69 %). Takto získané oocyty lze použít pro produkci cytoplastů pro klonování přenosem jader somatických buněk.

Průmyslová využitelnost

Řešení se týká zdokonaleného kultivačního postupu oocytů in vitro, jenž využívá specifické inhibice kalcineurinu (PP2B) v počáteční fázi kultivace, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů inhibicí kalcineurinu, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že na oocyty s neukončeným růstem se působí během jejich zrání v podmínkách in vitro látkami, které specificky brání defosforylaci proteinů a inhibují aktivitu kalcineurinu.
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že se oocyty s neukončenou růstovou fází kultivují in vitro s inhibitorem kalcineurinu po dobu, která je u daného živočišného druhu běžně nutná pro dosažení stadia metafáze I, poté jsou oocyty opět kultivovány v médiu bez inhibitoru kalcineurinu po dobu, která je běžně u daného druhu nutná pro postup zrání z metafáze I do metafáze II.
3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že na oocyty s neukončeným růstem se během kultivace in vitro v počáteční fázi působí látkami, jež jsou inhibitory kalcineurinu, zejména cypermethrinem v koncentracích od 1 do 100 μ M, deltamethrinem v koncentracích od 5 do 200 μ M a fenvalerátem v koncentracích od 100 do 500 μ M.

Konec dokumentu
