

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2006-787**
(22) Přihlášeno: **08.12.2006**
(40) Zveřejněno: **21.05.2008**
(Věstník č. 5/2008)
(47) Uděleno: **10.04.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **21.05.2008**
(Věstník č. 21/2008)

(11) Číslo dokumentu:

299 219

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/06 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Viveiros M.M. et al.: „Protein Kinase C Activity Regulates the Onset of Anaphase I in Mouse Oocytes“, *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, Vol. 71, 1525–1532, 2004; Quan H.M. et al.: „Effects of PKC activation on the meiotic maturation, fertilization and early embryonic development of mouse oocytes“, *Zygote* 11(4):329-337, 2003; Downs S.M. et al.: „Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes, *Mol. Reprod. Dev.*, Vol. 58(1), 101-115, 2001.

(73) Majitel patentu:

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., 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. PhD., Chýnov, CZ
Rozinek Jiří Prof. Ing. CSc., Praha, CZ
Rajmon Radko MVDr. PhD., Velké Přílepy, CZ
Sedmíková Markéta Mgr. Ing. PhD., Praha, CZ
Chmelíková Eva Ing. PhD., Praha, CZ
Lánská Vilma Ing. PhD., Praha, CZ
Kuthanová Zuzana Ing., Praha, CZ
Härtlová Helena MVDr. CSc., Nymburk, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

Způsob prodloužení životnosti savčích oocytů v podmínkách in vitro

(57) Anotace:

Řešení se týká prodlouženého uchovávání savčích oocytů v podmínkách in vitro za současné aktivace protein kináz C. Tento způsob kultivace zajišťuje zvýšenou životaschopnost oocytů a má velký význam při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat.

CZ 299219 B6

Způsob prodloužení životnosti savčích oocytů v podmínkách in vitro

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu prodloužení životnosti savčích oocytů, aby se zachovala životaschopnost savčích oocytů uchovávaných po delší dobu v podmínkách in vitro. Prodloužení životnosti oocytů savců má velký význam pro reprodukční biotechnologie u hospodářských zvířat (klonování, in vitro oplození, transgenozé).

Dosavadní stav techniky

Oocyty savců (samici pohlavní buňky) mají po vyjmutí z těla samice omezenou životnost a při následné kultivaci v podmínkách in vitro to způsobuje potíže. Po dokončení zrání podléhají spontánně řadě procesů, jež je znehodnocují pro další využití v reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat (klonování, in vitro oplození, transgenozé). 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.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob prodloužení životnosti savčích oocytů v podmínkách in vitro podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že savčí oocyty jsou při něm v savčích oocytech aktivovány enzymy protein kináz C.

Způsob podle vynálezu ještě spočívá v tom, že se na savčí oocyty působí látkami se specifickým aktivačním účinkem na protein kináz C.

Způsob podle vynálezu se dále vyznačuje tím, že se savčí oocyty kultivují in vitro až po dobu 5 dnů s aktivátory protein kináz C s tím, že se po 3 dnech oocyty přenesou do čerstvého kultivačního média s přidavkem aktivátoru protein kináz C.

Způsobem podle vynálezu jsou u oocytů kultivovaných po dlouhou dobu v podmínkách in vitro potlačeny procesy fragmentace a lýzy. Například při kultivaci v médiu s 50 mikroM forbol 12-myristát 13-acetátu po dobu 3 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 aktivátorů protein kináz C je tedy eliminace nežádoucích procesů fragmentace a lýzy oocytů. Podíl oocytů, které si uchovávají životaschopnost, je podstatně vyšší. Způsob prodloužené kultivace oocytů za současné aktivace protein kináz C podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat, např. klonování, oplození in vitro (IVF), intracytoplasmatické injekci spermií (ICSI) či transgenozí.

Je známo, že při oplození in vitro oocytů hospodářských zvířat (ať již metodou kultivace oocytů 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 plemene, např. plemenného kance), oocyty rychle ztrácejí na kvalitě, procházejí procesem stárnutí, což snižuje pravděpodobnost úspěšného oplození, úspěšného a zdravého vývoje zárodku.

Při klonování živočichů (savců) 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 použití uchovávány v podmínkách in vitro. Při tom v nich ale samovolně probíhají procesy stárnutí, které poškozují 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 médium obohacené o aktivátory protein kináz C. Takto použité oocyty nebo cytoplasty (oocyty zbavené enukleací jaderné dědičné informace) jsou kvalitnější a embrya klonů, která jsou z nich vytvořena přenosem jader somatických buněk, jsou životaschopnější.

Bylo prokázáno, že významného prodloužení životaschopnosti oocytů potlačením fragmentace a lýzy savčích oocytů lze dosáhnout ošetřením oocytů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v aktivaci (zvýšení aktivity) protein kináz C, kdy se savčí oocyty dozrálé v podmínkách in vitro nebo získané po dozrání in vivo dále kultivují in vitro až po dobu 5 dnů se specifickými aktivátory protein kináz C.

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

Příklady provedení

Příklad 1

Podle nového způsobu podle vynálezu jsou dozrálé prasečí oocyty ve stádiu metafáze II kultivovány před oplozením v médiu obohaceném o 50 mikromol aktivátoru protein kináz C forbol 12-myristát 13-acetátu. V tomto kultivačním médiu jsou kultivovány až do chvíle, kdy je vše připraveno k jejich oplození. Pak jsou oocyty opláchnuty médiem bez aktivátoru a následně podrobeny obvyklým procedurám potřebným k oplození in vitro. Takto ošetřené oocyty mají vyšší kvalitu než oocyty, které by byly před oplozením kultivovány bez aktivátoru protein kináz C a i vzniklá embrya jsou životaschopnější.

Příklad 2

Dozrálé savčí oocyty nacházející se ve stádiu zrání metafáze II se zbaví kumulárních buněk opakovaným pipetováním úzkou skleněnou pipetou, propláchnou se kultivačním médiem (např. médium M199 obohacené o 10 % hmotn. bovinního telecího séra) a pak jsou přeneseny do kultivačního média s přidávkou molekul aktivujících protein kináz C (např. forbol 12-myristát 13-acetát) v koncentracích od 1 do 100 mikromol. V tomto médiu se 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 aktivátor kináz C a následně byly kultivovány v čerstvě připraveném médiu obohaceném o aktivátor protein kináz C. Po ukončení kultivace s cílem prodloužit životaschopnost oocytů jsou oocyty před dalším použitím propláchnuty v médiu bez aktivátoru a kultivovány běžným laboratorním postupem.

Průmyslová využitelnost

5 Řešení se týká prodlouženého uchovávání savčích oocytů v podmínkách in vitro za současné aktivace protein kináz C, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích u hospodářských zvířat.

10

P A T E N T O V É N Á R O K Y

- 15 **1.** Způsob prodlouženého uchovávání savčích oocytů v podmínkách in vitro, **v y z n a ě u j í - c í s e t í m**, že jsou při něm v savčích oocytech aktivovány enzymy protein kináz C.
- 2.** Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se na savčí oocyty působí látkami se specifickým aktivačním účinkem na protein kináz C.
- 20 **3.** Způsob podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se savčí oocyty kultivují in vitro až po dobu 5 dnů s aktivátory protein kináz C s tím, že se po 3 dnech oocyty přenesou do čerstvě připraveného kultivačního média s přidavkem aktivátoru protein kináz C.

25

Konec dokumentu
