

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2006-446**
(22) Přihlášeno: **10.07.2006**
(40) Zveřejněno: **27.02.2008**
(Věstník č. 2/2008)
(47) Uděleno: **18.01.2008**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **27.02.2008**
(Věstník č. 9/2008)

(11) Číslo dokumentu:

298 869

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 6680199.

Rotmann, A. et al.: "Activation of classical protein kinase C reduces the expression of human cationic amino acid transporter 3 (HCAT-3) in the plasma membrane", Biochem.J. 395, 117-123, 2006; Heikinheimo, O. and Gibbons, W.E.: "The molecular mechanisms of oocyte maturation and early embryonic development are unveiling new insights into reproductive medicine", Molecular Human Reproduction, vol.4(8), 745-756, 1998; Mayes, M.A. et al.: "Parthenogenic activation of pig oocytes by protein kinase inhibition", Biology of Reproduction 53, 270-275, 1995.

(73) Majitel patentu:

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

(72) Původce:

Jílek František prof. MVDr. Ing. DrSc., Praha, CZ
Petr Jaroslav prof. Ing. DrSc., Praha, CZ
Jeřeta Michal Ing., Kralupy nad Vltavou, 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
Hartlová Helena MVDr. CSc., Nymburk, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název vynálezu:

**Způsob partenogenetické aktivace oocytů se
stimulací protein kináz C nezávislých na
vápníku**

(57) Anotace:

Způsob zdokonalené partenogenetické aktivace oocytů in vitro využívající kromě klasických aktivačních stimulů i specifické stimulační protein kináz C nezávislých na iontech vápníku. Tato aktivace má velké využití při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

CZ 298869 B6

Způsob partenogenetické aktivace oocytů se stimulací protein kináz C nezávislých na vápníku

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu partenogenetické aktivace oocytů in vitro s využitím látek stimulujících protein kinázy C nezávislé na vápníku. Tato aktivace má velký význam zejména při klonování hospodářských zvířat.

10

Dosavadní stav techniky

V současné době se aktivace zejména zvířecích oocytů, což jsou samičí pohlavní buňky, provádí
15 v podmínkách in vitro mnoha způsoby. Jedním ze způsobů je např. partenogenetická aktivace vápníkovými ionofory a současnou aktivací enzymů protein kináz C. Protein kinázy C představují širokou skupinu enzymů s velmi rozdílnými vlastnostmi. Dělí se obecně na tři skupiny - závislé na vápníku, nezávislé na vápníku a netradiční protein kinázy C. Pro dokonalejší aktivaci se využívají forbol estery, které stimulují první dvě uvedené skupiny protein kináz C. Enzymy obou
20 skupin - na vápníku závislé a na vápníku nezávislé - mají ale v buňkách odlišné role. Účinky forbol esterů jsou proto silně nespecifické a aktivace oocytů proto neprobíhá stejně. Obecně je aktivace oocytů hospodářsky významných druhů savců využívána pro širokou škálu účelů, jako např. pro klonování metodou přenosu jader somatických buněk, tvorbu embryonálních kmenových buněk z partenogenetických embryí nebo pro tvorbu embryí metodou intracytoplasmatické
25 injekce spermie (ICSI). Je proto žádoucí, aby aktivace oocytů in vitro probíhala vždy co nejefektivněji a nedocházelo ke zbytečným nákladům při klonování zvířat.

Podstata vynálezu

30

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob partenogenetické aktivace oocytů se stimulací protein kináz C nezávislých na vápníku, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že na oocyty in vitro působí kromě základního aktivačního činidla, zejména vápníkového ionoforu, elektrických stimulů nebo iontů stroncia, i látky, které specificky stimulují protein kinázy C nezávislé na
35 vápníku.

Způsob podle vynálezu se dále provádí tak, že na oocyty in vitro, ošetřené tradičně aktivačním činidlem, se dále po 2 až 3 hodiny působí látkami, které specificky stimulují protein kinázy C nezávislé na vápníku.

40 Způsob podle vynálezu se výhodně provádí tak, že na oocyty in vitro, ošetřené tradičně aktivačním činidlem, se dále po 2 až 3 hodiny působí heptaamoniovou solí dipalmitoyl-L-alfa-fosfatidylinositol-3, 4, 5-trifosfátu v koncentraci 1 až 2 mM.

Způsob partenogenetické aktivace oocytů podle vynálezu se konkrétně provádí tak, že se dozrálé
45 savčí oocyty in vitro, nacházející se ve stádiu zrání metafáze II, zbaví kumulárních buněk opakovaným pipetováním úzkou skleněnou pipetou, propláchnou se v kultivačním médiu (např. médium M199 obohacené o 10 % bovinního telecího séra) a pak jsou vystaveny účinku tradičního aktivačního činidla (např. kalcium ionoforu A23187 v koncentraci 50 mikromolů pro dobu 5 minut) a následně jsou přeneseny do kultivačního média bez ionoforu obohaceného o aktivátor kalcium-independentních izotypů protein kináz C. V tomto médiu se oocyty kultivují po dobu 2
50 až 3 hodin. Následně jsou oocyty opláchnuty v médiu, které neobsahuje aktivátor kalcium-independentních izotypů protein kináz C a jsou pak kultivovány běžným laboratorním postupem.

Způsobem podle vynálezu jsou v oocytech specificky stimulovány jen protein kinázy C nezávislé na vápníku a aktivita izotypů kináz závislých na vápníku není tímto ošetřením významněji ovlivněna. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože experimenty původců prokázaly, že stimulace na vápníku závislých protein kináz C má na partenogenetickou aktivaci oocytů nepříznivý efekt, neboť jejich zvýšená aktivita brzdí zdárný vývoj zárodku. Výsledkem způsobu aktivace podle vynálezu je podstatně efektivnější aktivace vyššího podílu oocytů a partenogenetický vývoj takto aktivovaných oocytů je podstatně vyšší, než při dosud používaných způsobech, což má velký hospodářský význam. Způsob aktivace oocytů in vitro s cílenou stimulací na vápníku nezávislých protein kináz C podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat (např. klonování, ICSI) i v asistované reprodukci v humánní medicíně, kdy při současném snižování porodnosti tato metoda zvláště nabývá na významu.

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

15

Příklady provedení

Příklad 1

20

Při klasické partenogenetické aktivaci vápníkovým ionoforem (A23187, 50 mikromol, 5 minut) dochází k partenogenetické aktivaci u 70 % oocytů in vitro. Podle způsobu podle vynálezu jsou dozrálé prasečí oocyty ve stádiu metafáze II po aktivaci ionoforem kultivovány po 2 až 3 hodiny v kultivačním médiu s přidavkem 2 mM heptaamoniové soli dipalmitoyl-L-alfa-fosfatidylinositol-3, 4, 5-trifosfátu. Při tomto postupu stoupá významně podíl aktivovaných oocytů a významně se zvyšuje následná vývojová schopnost partenogenetických embryí do stádia blastocysty. Takto získané savčí partenogenetické zárodky ve vývojovém stádiu blastocysty lze využít například pro tvorbu embryonálních kmenových buněk.

Příklad 2

30

U některých živočišných druhů (např. kůň) provází oplození v podmínkách in vitro problémy s penetrací spermie do vajíčka. Tento problém se obchází tzv. intracytoplasmatickou injekcí spermie, při kterém je spermie vpravena do vajíčka mikroinjekcí. Tento postup nachází uplatnění i v humánní medicíně při léčbě neplodnosti nebo při záchraně druhů savců ohrožených vyhynutím. Mikroinjekce spermie ale nemusí navodit podmínky aktivace nezbytné pro zahájení vývoje vzniklého zárodku. Také v tomto případě se může uplatnit aktivace oocytu. Po aktivaci tradičním způsobem (např. elektrickými pulzy) jsou oocyty kultivovány po 2 až 3 hodiny v kultivačním médiu s přidavkem 2 mM heptaamoniové soli dipalmitoyl-L-alfafosfatidylinositol-3, 4, 5-trifosfátu. V následujících hodinách nastane u značného podílu takto ošetřených vajíček aktivace a zárodek pokračuje ve vývoji až do stádia blastocysty, kdy je schopen přenosu do dělohy náhradní matky.

Příklad 3

45

Při klonování savců dochází ke vnášení jaderné dědičné informace somatické buňky do cytoplasmy vajíčka, jež bylo vlastní jaderné dědičné informace zbaveno (bylo enukleováno). Pro následný vývoj embrya klonu je nezbytná aktivace takto vzniklé buňky. Adekvátní aktivační stimul je nezbytný především v případě využití tzv. honolulské techniky, kde je jádro somatické buňky vneseno do cytoplasmy enukleovaného vajíčka mikroinjekcí. Pro aktivaci takto vzniklého zárodku klonu lze využít po tradičním aktivačním stimulu (např. stronciovými ionty) kultivaci oocytů po 2 až 3 hodiny v kultivačním médiu s přidavkem 2 mM heptaamoniové soli dipalmitoyl-L-alfafosfatidylinositol-3, 4, 5-trifosfátu.

50

toyl-L-alfafosfatidylinositol-3, 4, 5-trifosfátu. V následujících hodinách nastane u značného podílu takto ošetřených zárodků aktivace a zárodek pokračuje ve vývoji až do stádia blastocytu, kdy je schopen přenosu do dělohy náhradní matky.

5

Průmyslová využitelnost

Řešení se týká zdokonalené partenogenetické aktivace oocytů in vitro využívající specifické stimulace na vápníku závislých protein kináz C, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat i v asistované reprodukci v humánní medicíně.

10

15

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob partenogenetické aktivace oocytů zvířat se stimulací protein kináz C nezávislých na vápníku, **vyznačující se tím**, že se na oocyty in vitro působí kromě tradičními aktivačními činidly, jako jsou zejména vápníkový ionofor, ionty stroncia a elektrické stimuly, heptaamoniovou solí dipalmitoyl-L-alfa-fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu v koncentraci 1 až 2 mM, tedy látkou stimulující specificky izotypy protein kinázy C, které pro svou aktivaci nepotřebují ionty vápníku, aniž by zároveň byly stimulovány protein kinázy C, které ke své aktivitě vyžadují vazbu vápníkových iontů, a jejichž zvýšená aktivita brzdí vývoj zárodku.

20

25

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se na oocyty in vitro působí kromě tradičními aktivačními činidly heptaamoniovou solí dipalmitoyl-L-alfa-fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátu v koncentraci 1 až 2 mM, tedy látkou stimulující specificky izotypy protein kinázy C, po dobu 2 až 3 hodin.

30

35

Konec dokumentu
