

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.05.2010**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **30.11.2011**
(Věstník č. 48/2011)

(21) Číslo dokumentu:

2010-394

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 5/075 (2010.01)

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 15/873 (2010.01)

C12N 9/12 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:

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

(72) Původce:

Jilek František prof. MVDr. Ing. DrSc., Praha 6 -
Dejvice, CZ
Petr Jaroslav prof. Ing. DrSc., Praha - Uhřetěves, CZ
Rajmon Radko doc. MVDr. Ph.D., Velké Přílepy, CZ
Chmelíková Eva doc. Ing. Ph.D., Praha 12 - Kamýk, CZ
Dörflerová Andrea Ing., Třebenice, CZ
Kheilová Kateřina Ing., Praha 9 - Kbely, CZ
Krejčová Tereza Ing., Praha 12 - Modřany, CZ

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob zvýšení vývojové schopnosti
rostoucích oocytů aktivací protein kináz C**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu zvýšení vývojové schopnosti
rostoucích oocytů aktivací protein kináz C, což je
charakterizováno tím, že se na oocyty, jež dosud neukončily
svou růstovou fázi, během zrání in vitro působí v určité fázi
kultivace látkami, které specificky aktivují protein kinázy C.
Tato kultivace má velké využití při reprodukčních
biotechnologiích hospodářských zvířat.

Způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů aktivací protein kináz C

vzr

Oblast techniky

Vynález se týká zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů v podmínkách kultivace *in vitro* s využitím látek aktivujících protein kinázy C. Tento způsob kultivace má velký význam zejména při asistované reprodukci hospodářských zvířat.

Dosavadní stav techniky

V současné době se pro asistovanou reprodukci savců (klonování, *in vitro* oplození, transgenóza) 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.

Podstata vynálezu

Uvedené problémy odstraňuje způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů aktivací protein kináz C, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se na oocyty, jež dosud neukončily svou růstovou fází, během zrání *in vitro* působí v určité fázi kultivace látkami, které specificky aktivují protein kinázy C.

Způsob podle vynálezu je dále charakterizován tím, že se oocyty s neukončenou růstovou fází kultivují *in vitro* bez aktivátorů protein kináz C po dobu, která je u daného živočišného druhu běžně nutná pro dosažení stádia metafáze I, následně jsou oocyty kultivovány v médiu se specifickým aktivátorem protein kináz C po dobu, která je běžně u daného druhu nutná pro postup zrání z metafáze I do metafáze II.

Způsob podle vynálezu je také charakterizován tím, že se na oocyty s neukončeným růstem během kultivace *in vitro* v určité fázi působí látkami, jež jsou obecně známy jako aktivátory protein kináz C, zejména forbol-12-myristát-13-acetátem v koncentracích od 10 do 100 nM, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerolem v koncentracích od 20 do 200 mikrom, popřípadě kombinací 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE) s dipalmitoyl-L-alfa-fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát heptaammoniovou solí (DIPALM) v koncentracích 10 mikrom OLE a 100 nM DIPALM, přičemž působení aktivátorem protein kináz C trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace *in vitro* pro postup zrání oocytů ze stádia metafáze I do stádia metafáze II.

Způsob podle vynálezu se výhodně provádí tak, že se na oocyty s neukončeným růstem a neúplně vyvinutou vývojovou schopností během jejich zrání *in vitro* působí látkami obecně známými jako aktivátory protein kinázy C, zejména prostřednictvím forbol-12-myristát-13-acetátu (PMA), 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerolem (STEAR) nebo kombinovaným ošetřením aktivátorů, které aktivují buď jen kalcium-dependentní nebo jen kalcium-independentní protein kinázy C. Tak lze využít kombinované ošetření

oocytů specifickým aktivátorem kalcium-dependentních protein kináz C 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolem (OLE) spolu se specifickým aktivátorem kalcium-independentech protein kináz C dipalmitoyl-L-alfa-phosphatidylinositol-3,4,5-trifosfát heptaammoniovou solí (DIPALM).

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 médiu bez aktivátorů protein kináz C. Doba této kultivace odpovídá času, za jaký nezralé, dorostlé oocyty s plnou vývojovou schopností dosáhnou stádia metafáze I (24 hodin u prasete, 12 hodin u skotu, ovce). Následně jsou oocyty vystaveny na 24 hodin účinku specifického aktivátoru protein kináz C, např. forbol-12-myristát-13-acetát se používá v koncentracích od 10 do 100 nM, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerol se používá v koncentracích od 20 do 200 mikrom, 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolem (OLE) spolu s dipalmitoyl-L-alfa-phosphatidylinositol-3,4,5-trifosfát heptaammoniovou solí se používají v koncentracích 10 mikrom OLE a 100 nM DIPALM. S aktivátory protein kinázy C jsou oocyty kultivovány po dobu, za jakou dorostlé oocyty s plnou vývojovou schopností dospějí ze stádia metafáze I do stádia metafáze II a dokončí tak zrání (např. prase 20 hodin, skot a ovce 10 hodin).

Způsobem podle vynálezu jsou v oocytech specificky aktivovány protein kinázy C, které následně fosforylují své intracelulární substráty. To se ukazuje jako velmi výhodné, protože experimenty původců prokázaly, že aktivace protein kinázy C po počáteční kultivaci oocytů 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 stádiu metafáze I a jsou pro většinu biotechnologií nepoužitelné. Způsobem podle vynálezu je dosaženo úplného zrání oocytů do metafáze II u 80 % oocytů. Tyto oocyty lze použít pro další reprodukční biotechnologie, protože jsou s to se vyvíjet v embrya.

Výsledkem způsobu 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* s cílenou aktivací protein kinázy ve specifické fázi podle vynálezu lze využít zejména při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat (např. klonování, ICSI).

Následující příklady provedení způsob 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 stádia metafáze II u 20 % oocytů. Způsobem podle vynálezu jsou prasečí oocyty s neukončenou růstovou fází kultivovány nejprve po 24 hodin v kultivačním médiu bez přídavku aktivátorů protein kináz C, následně pak jsou kultivovány 20 hodin s přídavkem 100 nM forbol-12-myristát-13-acetátu. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II (kolem 80 %). Takto získané oocyty lze podrobit standardní partenogenetické aktivaci a navodit u nich vývoj do stádia blastocysty. Takto získané savčí partenogenetické zárodky ve vývojovém stádiu 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 stádia metafáze II u 15 % oocytů. Způsobem podle vynálezu jsou oocyty skotu s neukončenou růstovou fází kultivovány nejprve po 12 hodin v kultivačním médiu bez přídavku aktivátorů protein kináz C, následně jsou kultivovány 10 hodin v kultivačním médiu s 100

mikroM 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerolu. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II (76 %). Takto získané ovocyty 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 stádia metafáze II u 20 % oocytů. Způsobem podle vynálezu jsou prasečí oocyty s neukončenou růstovou fází kultivovány nejprve po 24 hodin v kultivačním médiu bez přídavku aktivátorů protein kináz C a následně jsou kultivovány 20 hodin v kultivačním médiu s přídavkem 10 mikroM 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu spolu se 100 nM dipalmitoyl-L-alfa-phosphatidylinositol-3,4,5-trifosfát heptaammoniové soli. Při tomto postupu stoupá významně podíl dozrálých oocytů, které dosáhnou stádia metafáze II (80 %). 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 aktivace protein kináz C v určité fázi kultivace, což má velký význam při reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat.

PATENTOVÉ NÁROKY

24835

1. Způsob zvýšení vývojové schopnosti rostoucích oocytů aktivací protein kináz C, **vyznačující se tím**, že se na oocyty, jež dosud neukončily svou růstovou fází, během zrání *in vitro* působí v určité fázi kultivace látkami, které specificky aktivují protein kinázy C.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se oocyty s neukončenou růstovou fází kultivují *in vitro* bez aktivátorů protein kináz C po dobu, která je u daného živočišného druhu běžně nutná pro dosažení stádia metafáze I, následně jsou oocyty kultivovány v médiu se specifickým aktivátorem protein kináz C po dobu, která je běžně u daného druhu nutná pro postup zrání z metafáze I do metafáze II.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že na oocyty s neukončeným růstem se během kultivace *in vitro* v určité fázi působí látkami, jež jsou obecně známy jako aktivátory protein kináz C, zejména forbol-12-myristát-13-acetátem v koncentracích od 10 do 100 nM, 1-stearoyl-2-arachidonoyl-sn-glycerolem v koncentracích od 20 do 200 mikrom, popřípadě kombinací 1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerolu (OLE) s dipalmitoyl-L-alfa-fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát heptaammoniovou solí (DIPALM) v koncentracích 10 mikrom OLE a 100 nM DIPALM, přičemž působení aktivátorem protein kináz C trvá po dobu, která odpovídá době nutné v podmínkách kultivace *in vitro* pro postup zrání oocytů ze stádia metafáze I do stádia metafáze II.