

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 194**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0735 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01946230 .8**
- 96 Fecha de presentación: **09.06.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1287119**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2003**

54 Título: **Suplemento de medios de cultivo de gametos y de embriones de mamíferos y procedimiento de utilización del mismo**

30 Prioridad:
09.06.2000 US 210649 P
16.06.2000 US 212232 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2012

73 Titular/es:
Vitrolife Sweden AB
Box 9080
400 92 Göteborg , SE

72 Inventor/es:
GARDNER, David, K. y
LANE, Michelle, T.

74 Agente/Representante:
Durán Moya, Carlos

ES 2 377 194 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Suplemento de medios de cultivo de gametos y de embriones de mamíferos y procedimiento de utilización del mismo

5

SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a medios de cultivo que proporcionan ambientes útiles para el desarrollo celular. Más particularmente, la presente invención se refiere al suplemento de medio de cultivo definido que comprende constituyentes preparados a partir de fuentes no tradicionales que, cuando se añade al medio de cultivo, supera los problemas de los medios de cultivo anteriores.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Durante años los suplementos de medios para cultivar células embrionarias de mamíferos se han derivado de fluidos de animales y en particular del suero de la sangre. Aunque los suplementos de medios de cultivo en base a suero han sido algo eficaces para el cultivo de ciertos tipos de células y tejidos, estos suplementos de medios de cultivo se han encontrado que son indeseables. Una de las principales razones para que estos suplementos de medios de cultivo en base a suero no sean candidatos atractivos para el cultivo de células se debe a la posibilidad de que el medio de cultivo resultante estará contaminado con impurezas, toxinas y agentes infecciosos presentes en el fluido del que se deriva el medio. Además, dado que los animales de donde se colecta la sangre son diferentes y viven en diferentes ambientes, los fluidos producidos por estos animales tienen diferentes componentes a diferentes concentraciones. Se ha reconocido que un aspecto importante de un medio de cultivo basado en suero es que requiere macromoléculas en el medio. En un intento de imitar los productos en base a suero, los investigadores han tratado de añadir macromoléculas sintéticas tal como alcohol polivinílico, para sustituir macromoléculas en el suero tal como albúmina. Sin embargo, como gran parte del suero no está definido químicamente, la eliminación del suero de los medios de cultivo y el intento de sustituir sólo las moléculas más grandes ha producido medios de cultivo que no son ideales o resultan ineficaces para muchos propósitos debido a que están ausentes componentes esenciales del medio.

15

20

25

30

En consecuencia, existe la necesidad de suplementos de medios de cultivo que sean tan eficaces como los suplementos de medios de cultivo en base a productos sanguíneos y al mismo tiempo eliminar posibles fuentes de contaminación. Además, existe la necesidad de medios de cultivo estandarizados.

35

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención describe un novedoso suplemento completamente definido en base fisiológica para medios de cultivo de células embrionarias y gametos de mamíferos. Este suplemento de medios puede ser utilizado con medios de fertilización *in vitro*, medios de transferencia de embriones y medios de criopreservación de embriones para la preimplantación de embriones de mamíferos, así como suplemento de medios para el desarrollo de células madre embrionarias, o cualquier otro medio similar, muy conocidos en la técnica. Este suplemento comprende albúmina humana recombinante (AHR), hialuronano fermentado (HYN) y/o citrato y combinaciones de los mismos. La adición de este suplemento al medio de cultivo da como resultado un desarrollo equivalente comparado con los suplementos de medios con albúmina de suero purificada a partir de la sangre.

40

45

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El suplemento puede comprender albúmina humana recombinante (AHR) en cualquier concentración adecuada para los medios de cultivo en que se va a utilizar. Tal como se describirá en el presente documento, la utilización de AHR en lugar de la albúmina sérica humana (HSA) de origen natural tiene numerosas ventajas.

50

Habitualmente, cuando el suplemento comprende AHR, el suplemento comprende, aproximadamente, entre 0,1 mg/ml y 20,0 mg/ml de AHR en base al volumen total del medio al que se añade el suplemento. En una realización, se añade aproximadamente entre 0,5 mg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml de AHR en base al volumen total del medio.

55

La eficacia del suplemento se puede mejorar mediante la adición de hialuronano fermentado (HYN) al suplemento. La adición de HYN fermentado al suplemento de medios de cultivo muestra resultados positivos.

60

La frase "aumenta la viabilidad de gametos o células embrionarias", tal como se utiliza en el presente documento, se define que comprende el desarrollo incrementado en el cultivo de los embriones hasta el estado de blastocistos, incremento de la capacidad de eclosión *in vitro* de la zona pelúcida y/o un incremento de la viabilidad general del embrión en cultivos de embriones cuando los embriones son cultivados en un medio que comprende el suplemento de la presente invención en comparación con los que se cultivan en el mismo medio sin el suplemento.

65

Además, la adición de HYN fermentado al medio adecuado afecta significativamente la capacidad de los blastocistos de sobrevivir a la congelación. La utilización de HYN fermentado tiene varias ventajas sobre la utilización de HYN proveniente de fuentes naturales de vertebrados de sangre caliente tales como las purificadas a partir de cresta de gallo o cordón umbilical. Mediante la utilización de HYN fermentado en lugar de HYN proveniente de fuentes de vertebrados de sangre caliente, la capacidad de controlar la seguridad y estabilidad de HYN de diferentes fuentes y lotes es mucho mayor.

Cuando está presente, la cantidad de HYN fermentado, en general, estará en concentraciones aproximadamente, de 0,1 mg/ml aproximadamente hasta 5,0 mg/ml en base al volumen total del medio. En una realización, el HYN fermentado se añadirá al medio en concentraciones, aproximadamente, de 0,125 mg/ml, aproximadamente hasta 1,0 mg/ml en base al volumen total del medio.

El suplemento puede incrementarse aún más mediante la adición de citrato. En una realización, citrato y AHr se añaden ambos al suplemento del medio, ya que se ha descubierto sorprendente e inesperadamente que la adición de citrato a un suplemento de medios de cultivo que contiene AHr, permite que AHr duplique las propiedades de HSA o albúmina de suero bovino (ASB). La adición de citrato tiene un efecto adicional de mejora del desarrollo del material celular cultivado. Puede utilizarse cualquier citrato utilizado para medios de cultivo que sea muy conocido en la técnica, incluyendo pero sin constituir limitación, citrato de colina, citrato de calcio, ácido cítrico, citrato de sodio y combinaciones de los mismos. En una realización se utiliza citrato de sodio. El citrato se añade, generalmente, en concentraciones aproximadamente de 0,1 mM aproximadamente hasta 5,0 mM, en base al volumen total del medio. En una realización, el citrato se añade a concentraciones aproximadamente de 0,1 mM aproximadamente hasta 1,0 mM, en base al volumen total del medio.

El suplemento de medios de cultivo de la presente invención comprende AHr, HYN fermentado y/o citrato en cualquier combinación conveniente. En una realización, el suplemento de medios de cultivo y el medio de cultivo al que se le añade el suplemento, están libres de macromoléculas no recombinantes o macromoléculas purificadas a partir de una fuente animal. En otra realización, el suplemento de medios de cultivo y el medio de cultivo al que se añade el suplemento, están libres de HSA no recombinante y/o HYN no fermentado.

La presente invención se refiere al suplemento de medios de cultivo descrito anteriormente, al medio de cultivo que comprende el suplemento de medios de cultivo, a un procedimiento de preparación del suplemento de medios de cultivo, a kits que comprenden el suplemento de medios de cultivo. También se da a conocer un procedimiento de crecimiento de material embrionario empleando el suplemento de medios de cultivo descrito en el presente documento.

En una realización con embriones se describe un procedimiento de crecimiento de material celular empleando el suplemento de medios de cultivo descrito en el presente documento de manera que pueden ser incluidos en el medio al comienzo del cultivo o pueden añadirse mediante alimentación por lotes o de manera continua. Además, los componentes del suplemento de medios de cultivo pueden añadirse juntos o por separado, en diferentes etapas de la preparación del medio de cultivo.

Este suplemento se puede añadir a cualquier medio de cultivo de material celular de mamífero adecuado muy conocido en la técnica, comprendiendo pero sin constituir limitación a, medios de cultivo de embriones, medios de transferencia de embriones y medios de criopreservación de embriones (que comprende ambos procedimientos congelación y vitrificación) de embriones de cualquier especie de mamífero y medios de cultivo de células madre. Puede utilizarse cualquier medio de cultivo que ayude al desarrollo de embriones o células, lo que incluye, solamente a modo de ejemplo, medio con tampón bicarbonato, Hepes o MOPS o fosfato salino. Ejemplos de medios de cultivo son G1.2/G2.2, KSOM/KSOMaa, M16, SOF/SOFaa, MTF, P1, Earle's, Hams F-10, M2, Hepes-G1.2, PBS y/o Whitten. (Gardner y Lane, 1999; Embryo Culture Systems; Handbook of in Vitro Fertilization, CRC Press, Editores: Trounson AO y DK Gardner, 2^a edición, Boca Raton, pp 205-264).

La preparación de AHr es muy conocida en la técnica. En una realización, AHr se obtiene de levadura modificada genéticamente que produce una proteína albúmina humana. Una metodología de este tipo para la preparación de AHr a partir de levadura se describe en la Patente de EE.UU. N^o 5.612.197.

El hialuronano fermentado (HYN) se obtiene mediante cualquier procedimiento muy conocido en la técnica. Un procedimiento de este tipo es la fermentación bacteriana continua de *Streptococcus equi*. El hialuronano es un polímero natural de unidades de disacáridos repetidas de N-acetilglucosamina y ácido D-glucurónico. Se encuentra ampliamente distribuido por todo el cuerpo. Por lo general, el peso molecular de HYN fermentado es $2,3 \times 10^6$ kD. La preparación de HYN a partir de *Streptococcus* es muy conocida en la técnica y se puede utilizar cualquier otro procedimiento muy conocido, incluyendo los descritos en Cifonelli JA, Dorfinan A. The biosynthesis of hyaluronic acid by group A *Streptococcus*: The uridine nucleotides of groups A *Streptococcus*. J. Biological Chemistry 1957; 228: 47-557; Kjems E, Lebech K. Isolation of hyaluronic acid from cultures of streptococci in a chemically defined medium. Acta Path. Microbiol. Scand. 1976 (Sect. B); 84: 162-164; y Markovitz A, y otros. The biosynthesis of hyaluronic acid by group A *Streptococcus*. J. Biological Chemistry 1959; 234(9): 2343-2350.

- Se pueden añadir otros compuestos al suplemento de medios de cultivo de la presente invención. Estos comprenden factores de crecimiento, ya que las células y embriones de mamíferos habitualmente tienen muchos receptores de factores de crecimiento y la adición de dichos factores de crecimiento puede incrementar la velocidad de crecimiento del material cultivado. Dichos factores de crecimiento comprenden, sin constituir limitación, insulina, habitualmente en cantidades de 0,1 a 100 ng/ml; IGF II, habitualmente en cantidades de 0,1 hasta 100 ng/ml; FCE, habitualmente en cantidades de 0,1 a 100 ng/ml; LIF, habitualmente en cantidades de 5 a 1000 U/ml; PAF, habitualmente en cantidades de 0,1 a 500 μ M y combinaciones de los mismos. Todas las cantidades están en base al volumen total del medio de cultivo al que se añade el suplemento de medios de cultivo.
- El suplemento de medios de cultivo puede ser preparado de dos formas, como un suplemento de medios de cultivo por separado que se añade al medio de cultivo después de la preparación del medio o se pueden añadir directamente los componentes del suplemento de medios de cultivo al medio de cultivo durante la preparación del medio.
- Solamente a modo de ejemplo, el suplemento de medios de cultivo se puede preparar de por sí de la siguiente manera. El AHr del suplemento de medios se puede preparar como una solución madre mediante adición de agua, solución salina o medio para obtener una solución madre de 50 a 500 mg/ml, habitualmente de 250 mg/ml. De forma alternativa, la solución se puede preparar como solución madre a 250 mg/ml. El HYN fermentado se reconstituye en agua, solución salina o medio, para obtener una solución madre de 10 a 500 mg/ml, habitualmente de 500 mg/ml. Esto se logra mediante la adición de agua, solución salina o medio a un matraz y se añade la cantidad deseada de HYN a la solución. A continuación, el HYN se disuelve mediante agitación rigurosa o mezclado utilizando una varilla de agitación. Para una solución de 500 mg/ml, se pueden añadir 500 mg de HYN a 1 ml de solución. El citrato se prepara como una solución madre mediante adición de agua, solución salina o medio para obtener una solución madre de 5 a 500 mM, habitualmente de 500 mM. Para una solución madre 500 mM se añaden 0,9605 g de ácido cítrico a 10 ml de solución. Las soluciones madre de AHr, HYN fermentado y citrato se añaden juntas para hacer una solución de suplemento única, que se añade al medio final como una solución madre concentrada 100 x veces. Para 10 ml de medio de cultivo, se añaden 100 μ l del suplemento.
- Se puede añadir el AHr directamente al medio de cultivo como polvo o como solución madre. La siguiente realización se presenta solamente a modo de ejemplo. Se pueden añadir 100 μ l de solución madre de 250 mg/ml a 9,9 ml de medio. El HYN fermentado se puede añadir directamente al medio de cultivo ya sea como polvo o como una solución madre. En forma de polvo, se pueden añadir 1,25 mg de HYN a 10 ml de medio de cultivo. De forma alternativa, se pueden añadir 125 μ l de una solución madre al 1% a 9,9 ml de medio. El citrato se puede añadir directamente al medio de cultivo ya sea como polvo o como solución madre. En forma de polvo, se pueden añadir 9,6 mg a 100 ml de medio o, de forma alternativa, se puede añadir 100 μ l de una solución madre 50 mM a 9,9 ml de medio.
- Todos los intervalos citados en el presente documento comprenden todas las combinaciones y subcombinaciones comprendidas dentro de los límites del intervalo; por tanto, un intervalo "aproximadamente de 0,1 mg/ml aproximadamente hasta 20,0 mg/ml" comprendería los intervalos aproximadamente de 0,125 mg/ml aproximadamente hasta 11,5 mg/ml, aproximadamente de 1,0 mg/ml aproximadamente hasta 15,0 y así sucesivamente.
- El suplemento de medios de cultivo de la presente invención resuelve varios problemas que persisten en la técnica de cultivo de células de mamíferos, tejidos, embriones y otros materiales celulares relacionados. Uno de los problemas de los actuales medios de cultivo es que el material celular de mamíferos cultivado, en particular los embriones, pueden contaminarse por contaminantes tales como priones y/o endotoxinas presentes en los productos sanguíneos macromoleculares tal como la albúmina humana. Una ventaja del suplemento de la presente invención es que elimina la posible contaminación asociada a la utilización de productos sanguíneos en los medios de cultivo de embriones y otros materiales celulares de mamíferos.
- Otro problema de los medios de cultivo actuales es la dificultad en la estandarización de dichos medios de cultivo cuando utilizan productos sanguíneos tales como albúmina de suero u otros materiales naturales. Además, la presente invención hace que sea más fácil purificar el producto final cultivado, cuando se eliminan las variaciones y los contaminantes de los productos sanguíneos naturales en el medio de cultivo.
- La presente invención elimina la variación inherente ocasionada cuando se utiliza una proteína biológica que a menudo está contaminada con otras moléculas y que difiere significativamente entre diferentes preparaciones y también entre lotes de la misma preparación. Por lo tanto, la utilización de moléculas recombinantes tales como AHr permite la formulación del medio fisiológico a ser preparado de una manera estandarizada. Estas preparaciones están libres de endotoxinas, libres de priones y son más compatibles fisiológicamente que los medios de cultivo que se utilizan actualmente. Los medios de cultivo actuales contienen otras macromoléculas sintéticas tales como alcohol polivinílico o polivinilpirrolidona, que son incapaces de realizar funciones fisiológicas esenciales tales como unir factores de crecimiento y por tanto la utilización de estos medios resulta en un desarrollo inferior del material celular de mamíferos.

La presente invención se comprenderá mejor a partir de los ejemplos a continuación. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que las composiciones específicas, procedimientos y resultados que se analizan son solamente ilustrativos de la presente invención y no implican limitaciones de la presente invención.

5 **EJEMPLOS**

Ejemplo 1

10 Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre concentradas tal como se muestra en la tabla 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHr a 9,8 ml de medio. En los experimentos iniciales se investigó la sustitución de albúmina purificada a partir de la sangre por AHr para el desarrollo en cultivo de embriones de ratones exocriados ("outbred"). Los óvulos fertilizados se cultivaron durante 4 días en una de tres diferentes concentraciones de AHr. Los embriones se cultivaron a 37°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en un volumen de incubación de embriones de 10 embriones: 20 µl de medio. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 48 horas seguido de 48 horas de cultivo en el medio G2.2. El tratamiento de control negativo fue sin proteína, el tratamiento de control positivo fue de 5 mg/ml de HSA (producto sanguíneo). Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 1

Solución madre	Período de expiración	Componentes	G1.2 (g/L)	G2.2 (g/L)	FG1 (g/L)
A conc. x10	3 meses	NaCl	5,26	5,26	5,844
		KCl	0,41	0,41	0,41
		NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	0,035	0,035	0,078
		MgO ₄ -7 H ₂ O	0,246	0,246	0,246
		Lactato de Sodio	1,17	0,66	0,58
		Glucosa	0,09	0,568	0,567
		Penicilina	0,06	0,06	0,06
B conc. x10	1 semana	NaHCO ₃	2,101	2,101	2,1
		Rojo Fenol	0,001	0,001	0,001
C conc. x100	2 semanas	Ácido pirúvico	0,0352	0,011	0,0352
D conc. x100	1 mes	CaCl ₂ - H ₂ O	0,265	0,265	0,265
G conc. x100	3 meses	Alanil-glutamina	0,108	0,217	-
T conc. x100	3 meses	Taurina	0,0125	-	0,0125
ED	1 mes	EDTA	0,029	-	-
		Soln. NaOH	0,4	-	-
N soln. x100		Aminoácidos no esenciales	10 ml	10 ml	10 ml
E soln. x50		Aminoácidos esenciales	-	20 ml	-
V soln. x100		Vitaminas	-	-10 ml	10 ml
Soluciones madre A y B					
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar componentes individuales en un matraz de 100 ml. 2. Añadir 50 ml de H₂O (ya sea H₂O Extreme o Biowittaker). 3. Mezclar bien hasta que se disuelvan todos los componentes. 4. Añadir otros 50 ml de H₂O 5. Mezclar bien. 6. Filtrar a través de filtro de 0,2 µm. 7. Almacenar a 4°C. 					
Soluciones madre C – T					
<ol style="list-style-type: none"> 1. Pesar componente en un tubo de 10 ml. 2. Añadir 10 ml de H₂O (ya sea H₂O Extreme o Biowittaker). 3. Mezclar bien hasta que se disuelva. 4. Filtrar a través de filtro de 0,2 µm. 5. Almacenar a 4°C. 					

20

Preparación del medio de cultivo de embriones - Parte I

Solución madre de EDTA

25 1. Pesar 0,029 g de EDTA en un tubo de 10 ml.

2. Pesar, por separado, 0,4 g de NaOH en un tubo de 10 ml.
3. Añadir 10 ml de H₂O (ya sea H₂O Extreme o Biowittaker) al NaOH y mezclar hasta que se disuelva.
4. Añadir 220 µl de solución NaOH al EDTA.
5. Mezclar hasta que se disuelva.
6. Añadir 9,8 ml de H₂O al EDTA.
7. Añadir 90 ml de H₂O a un matraz de 100 ml.
8. Añadir 10 ml de solución de EDTA a 90 ml de H₂O.
9. Filtrar a través de filtro de 0.2 µm.
10. Almacenar a 4°C.

Tabla 2

AHr mg/ml	Blastocistos	Eclosión	Número de células	Número MCI	Número TE	% MCI/Total
0	76,7	31,7	60,8±2,2 ^a	13,8±0,7 ^a	47,1±2,0 ^a	23,0±0,9
1,25	70,7	46,6	72,6±2,2 ^{bc}	17,7±0,6 ^b	56,4±1,9 ^{bc}	24,0±0,6
2,5	75	39,3	78,1±2,5 ^b	18,4±0,5 ^b	58,4±2,1 ^b	24,2±0,5
5	76,8	37,5	65,9±2,7 ^{ac}	16,3±0,7 ^b	49,6±2,4 ^{ac}	25,2±0,7
HSA a 5 mg/ml	72,6	38,7	74,3±2,4 ^{bc}	17,2±0,7 ^b	56,2±2,0 ^{bc}	23,6±0,6

Diferentes supraíndices indican diferencias significativas, P < 0,05.

El AHr fue capaz de sustituir a HSA para el desarrollo de embriones en cultivo en concentraciones, como mínimo, de 1,25 a 2,5 mg/ml.

Ejemplo 2

Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo. En los experimentos iniciales se investigó la sustitución de albúmina purificada a partir de sangre por HYN para el desarrollo de embriones de ratones exocriados en cultivo. Los óvulos fertilizados se cultivaron durante 4 días en una de las cuatro diferentes concentraciones de HYN. Los embriones se cultivaron a 37°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en un volumen de incubación de embriones de 10 embriones: 20 µl de medio. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 48 horas seguido de 48 horas de cultivo en el medio G2.2. El tratamiento de control negativo fue sin proteína. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

HYN (mg/ml)	Blastocistos	Eclosión	Número de células	Número MCI	Número TE	% MCI/Total
0	82,4 ^a	38,3 ^a	67,3±2,8 ^a	16,1±0,7 ^a	50,3±2,3 ^a	24,6±0,8 ^a
0,125	86,6 ^a	57,1 ^c	79,6±1,9 ^{bc}	21,2±0,8 ^{bc}	58,7±1,5 ^{bc}	26,5±0,6 ^{ac}
0,25	94,5 ^a	72,7 ^c	74,9±3,4 ^{bc}	21,8±1,2 ^{bc}	51,9±2,8 ^{ac}	29,7±0,8 ^{bc}
0,5	100 ^a	50 ^b	64,2±1,9 ^{ac}	18,0±0,7 ^{ac}	48,7±2,0 ^a	28,3±1,1 ^{bc}
1	61,8 ^b	23,5 ^a	62,0±2,7 ^{ac}	17,5±0,8 ^{ac}	49,1±2,5 ^a	26,4±0,9 ^{ac}

Diferentes supraíndices indican diferencias significativas, P < 0,05.

El HYN fermentado en concentraciones, como mínimo, de 0,125 a 0,5 mg/ml, estimuló el desarrollo de embriones de ratón.

Ejemplo 3

Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHr a 9,8 ml de medio, se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio. En experimentos posteriores se investigó la sustitución de albúmina purificada a partir de sangre por AHr junto con HYN fermentado para el desarrollo de embriones de ratones exocriados en cultivo. Los óvulos fertilizados se cultivaron durante 4 días. Los embriones se cultivaron a 37°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en un volumen de incubación de embriones de 10 embriones: 20 µl de medio. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 48 horas seguido de 48 horas de cultivo en el medio G2.2. Los resultados se muestran debajo en la tabla 4.

Tabla 4

Tratamiento	Número de células	Número MCI	Número TN	% MCI/Total
5 mg/ml de HSA	73,3±1,7	17,8±0,6	55,5±1,3	24,3±0,5
1,25 mg/ml AHr + 0,125 mg/ml HYN	71,8±1,6	18,6±0,5	53,2±1,3	26,0±0,5

Significativamente diferente a HSA (producto sanguíneo)

El cultivo con AHR y HYN fermentado juntos incrementa significativamente el desarrollo de la masa celular interna (MCI) de las células. Como el desarrollo de MCI está relacionado linealmente con la capacidad de desarrollar un feto viable, un incremento del % MCI probablemente significa aumento en viabilidad.

5

Ejemplo 4

Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHR a 9,8 ml de medio de cultivo, se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo. En experimentos posteriores se investigó la sustitución de albúmina purificada a partir de sangre por AHR junto con HYN fermentado para el desarrollo de embriones de ratones de exocriados ("outbred") después de transferirlos a los ratones receptores. Los óvulos fertilizados se cultivaron durante 4 días y, a continuación, se transfirieron en etapa de blastocistos a las hembras receptoras. Los embriones se cultivaron a 37°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en un volumen de incubación de embriones de 10 embriones: 20 µl de medio. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 48 horas seguido de 48 horas de cultivo en el medio G2.2. Los resultados se muestran en la tabla 5.

10

15

Tabla 5

	Tasa de implantación (%)	Desarrollo Fetal (%)	Feto/sitio de implantación (%)	Peso (mg)
HSA	63,3	43,3	68,4	208
AHR e HYN	65,0	46,7	71,8	207

Los resultados obtenidos en el cultivo con AHR y HYN fermentado juntos muestran un desarrollo fetal de embriones equivalente al de embriones cultivados en medio suplementado con HSA (producto de la sangre).

20

Ejemplo 5

Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHR a 9,8 ml de medio de cultivo, se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo y se añadieron 100 µl de citrato proveniente de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo. Los experimentos se llevaron a cabo para determinar si, además, un suplemento de AHR y HYN fermentado junto con citrato incrementaba el desarrollo de embriones de ratón en cultivo. Los embriones se cultivaron a partir del óvulo fertilizado durante 48 horas con AHR y HYN en presencia o ausencia de citrato. Los embriones se cultivaron a 37°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en un volumen de incubación de embriones de 10 embriones: 20 µl de medio de cultivo. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 48 horas. Los resultados se muestran en la tabla 6.

25

30

Tabla 6

	Promedio de número de células Día 3	% 8 células	% compactado
Sin citrato	6,33±0,17	69,7	7,3
Con citrato	7,21±0,13*	81,1*	12,2*

* Significativamente diferente del medio sin citrato a P < 0,05.

35

La adición de citrato al medio que contiene AHR y HYN fermentado incrementó significativamente el desarrollo embrionario.

Ejemplo 6

Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHR a 9,8 ml de medio de cultivo, se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo y se añadieron 100 µl de citrato proveniente de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo. Los experimentos se desarrollaron para determinar si, además, un suplemento de AHR y HYN fermentado junto con citrato incrementaba el desarrollo de embriones de ratón en cultivo. Los embriones se cultivaron a partir de óvulo fertilizado durante 48 horas con AHR y HYN en presencia o ausencia de citrato. A continuación, los embriones fueron transferidos al medio de cultivo con o sin citrato durante otras 48 horas. Los embriones se cultivaron a 37°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en un volumen de incubación de embriones de 10 embriones: 20 µl de medio de cultivo. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 48 horas seguido por 48 horas de cultivo en el medio G2.2. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 7.

45

50

Tabla 7

Tratamiento	Morula/ Blastocistos (%)	Blastocistos Totales (%)	Eclosión (% del Total)	Número de células	Número MCI	Número TE	% ICM/ Total
-/-	53,9	45,2	13	100,4	28,9	71,5	28,4
+/-	71,3	67,3	16,8	112,6	34,9	77,7	30,7
-/+	68,5	64,8	23,2	94,8	33,4	61,44	34,5
+/+	72,7	62,7	18,2	100,7	30,9	69,8	30,4

Diferentes supraíndices indican diferencias significativas, P < 0,05.

5 Según los resultados observados en la tabla 7, la adición de citrato aumentó significativamente el desarrollo del embrión.

Ejemplo 7

10 Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHr a 9,8 ml de medio de cultivo, se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo y se añadieron 100 µl de citrato proveniente de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo.

15 En los experimentos iniciales en la vaca se investigó la sustitución de albúmina purificada a partir de la sangre (albúmina de suero bovino, ASB) por AHr o por HYN fermentado o AHr junto con HYN fermentado para el desarrollo en el cultivo de los óvulos fertilizados. Los óvulos fertilizados se cultivaron durante 6 a 7 días. Los embriones se cultivaron a 38,5°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en 500 µl de medio. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 72 horas seguido de 72 horas de cultivo en el medio G2.2. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 8.

20

Tabla 8

Tratamiento	Número de embriones	Blastocistos totales Día 6	Blastocistos totales Día 7
ASB	592	30,9 ^a	36,8
AHr	583	22,1 ^b	38,4
HYN	549	16,9 ^b	30,4
AHr + HYN	558	27,8 ^a	39,1

Diferentes supraíndices indican diferencias significativas, P < 0,05.

25 La combinación de AHr y HYN fermentado permitió, en el cultivo de los embriones de vaca, un desarrollo embrionario equivalente al que se obtiene en presencia de ASB.

25

Ejemplo 8

30 Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHr a 9,8 ml de medio de cultivo, se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo y se añadieron 100 µl de citrato proveniente de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo.

35 En experimentos posteriores en la vaca se investigó la sustitución de albúmina purificada a partir de sangre (Albúmina de suero bovino, ASB) por AHr con o sin citrato para el desarrollo, en cultivo, de óvulos fertilizados. Los óvulos fertilizados se cultivaron durante 6 a 7 días. Los embriones se cultivaron a 38,5°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en 500 µl de medio. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 72 horas seguido de 72 horas de cultivo en el medio G2.2. Los resultados se muestran en la siguiente tabla 9.

Tabla 9

Tratamiento	Blastocistos totales Día 6	Número de células Blastocistos Día 6	Número de células en Masa Celular Interna de Blastocistos Día 6
ASB	40,2	143±6 ^a	46,2±1,9 ^a
AHr	36,6	123±7 ^b	37,9±1,9 ^a
AHr + citrato	41,4	146±5 ^a	45,3±1,9 ^a

Diferentes supraíndices indican diferencias significativas, P < 0,05.

40

Los resultados obtenidos en el cultivo con AHr y citrato muestran un desarrollo de embriones de vaca equivalente al de embriones cultivados en presencia de ASB.

Ejemplo 9

5 Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1. Se añadieron 200 µl de una solución madre de 250 mg/ml de AHR a 9,8 ml de medio de cultivo, se añadieron 100 µl de HYN fermentado de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo y se añadieron 100 µl de citrato proveniente de una solución madre x100 a 10ml de medio de cultivo.

10 En experimentos posteriores en la vaca se investigó la adición de HYN fermentado a AHR con citrato para el desarrollo, en cultivo, de óvulos fertilizados y la capacidad de congelación posterior de los mismos. Los óvulos fertilizados se cultivaron durante 6 a 7 días. Los embriones se cultivaron a 38,5°C en 6% de CO₂: 5% de O₂: 89% de N₂ en 500 µl de medio de cultivo. Los embriones se cultivaron en el medio G1.2 durante 72 horas seguido de 72 horas de cultivo en el medio G2.2. Los blastocistos fueron teñidos para determinar el número de células o se congelaron y posteriormente se descongelaron para evaluar la supervivencia. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

Tratamiento	Blastocistos totales Día 7	Número de células Blastocistos Día 7	Supervivencia y re-expansión después de la congelación
ASB	42,3	150±10	38,5 ^a
AHR + citrato	50,0	134±10	57,1 ^b
AHR + citrato + HYN	51,1	159±10	80 ^c

Diferentes supraíndices indican diferencias significativas, P < 0,05.

20 El medio suplementado con AHR, citrato y HYN fermentado aumentó significativamente la capacidad de los blastocistos de sobrevivir a la congelación y descongelación.

Ejemplo 10

25 Se prepararon medios de cultivo G1.2/G2.2 a partir de soluciones madre tal como se llevó a cabo en el ejemplo 1.

En este experimento se investigaron los efectos del crecimiento de embriones de ratones CF1 en cultivo en presencia de AHR y HYN sobre la capacidad de los embriones para sobrevivir a la congelación y descongelación. Los embriones de ratones CF1 se cultivaron en el estadio de blastocisto y se evaluó el desarrollo y la capacidad de sobrevivir al procedimiento de congelación.

Tabla 11

Tratamiento	Desarrollo a estadio Blastocistos (%)	Tasa eclosión Blastocistos (%)	Re-expansión después de congelación (%)	Eclosión después de congelación (%)	Completamente eclosionados después de congelación
HSA	88,2	49,0	76,1	42,9	28,6
HSA + HYN	81,8	43,2	79,5	45,5	29,6
AHR + citrato	85,0	53,4	77,5	57,5	40,0
AHR + citrato+ HYN	79,0	51,9	83,8	67,6	51,3

Diferencia significativa con respecto a HSA, P < 0,05.

35 Según estos resultados se puede ver claramente que el cultivo con AHR o AHR con HYN aumenta significativamente la eclosión de blastocistos después de la descongelación en comparación con blastocistos cultivados con HSA (P <0,05).

40 Se evaluó también la capacidad de los blastocistos de expandirse ("outgrow") en el cultivo después de la criopreservación. La expansión de MCI y TE fue puntuada entre 0 y 3 en el que 0 representa que no hay expansión y 3 representa expansión extensiva. Se ha demostrado que la expansión está relacionada con la viabilidad (Lane y Gardner, 1997).

Tabla 12

Tratamiento	Fijación (%)	Expansión MCI (%)	Expansión TE (%)
HSA	89,5	0,8±0,1	1,8±0,1
HSA + HYN	91,2	2,2±0,1*	1,7±0,1*
AHR + citrato	85,0	1,8±0,1*	1,6±0,1*
AHR + citrato+ HYN	86,8	2,1±0,1*	1,9±0,1*

*Diferencia significativa con respecto a HSA, P < 0,05.

- 5 Como se puede observar en la Tabla 12, se incrementó el desarrollo de MCI mediante el cultivo de embriones en un medio que comprende AHR o HYN en comparación con los embriones cultivados en albúmina sérica humana.

Ejemplo 11

- 10 Este ejemplo ilustra que un medio que contiene AHR, HYN y citrato permite la expansión exitosa de blastocistos supernumerarios criopreservados.

15 En este ejemplo, fueron descongelados embriones humanos pronucleados donados criopreservados y cultivados en el medio G1.3 durante 48 horas seguido por el cultivo en medio G2.3, tal como se lleva a cabo en la solicitud de patente en Estados Unidos Núm. 09/201.594 con los siguientes cambios. El medio G1.2-G1.3 tiene una concentración de MgSO₄ de 1,0 a 1,8 y una concentración de CaCl₂ de 1,8 a 1,0. Los cambios del medio G2.2-G2.3 son los mismos que los cambios en el medio de cultivo G1, con la adición de aminoácidos esenciales añadidos a la mitad de la concentración y no están presentes nicotinamida, inositol y ácido fólico.

20 A ambos medios se añadieron suplementos con 2,5 mg/ml de AHR y 0,125 mg/ml de HYN. La solución de congelación de embriones fue glicerol al 4,5% y sacarosa 0,1 M (10 min.) seguido de 9% de glicerol y sacarosa 0,2 M (7 min.). Los embriones se colocaron en un frigorífico a -6°C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento de 0,5°C por minuto hasta -32°C. Los embriones se sumergieron a continuación en nitrógeno líquido. Inmediatamente después de la descongelación, los embriones fueron incubados de forma individual en 500 µl de G2.3 fresco durante 4 horas y después se colocaron individualmente en 10 microlitros de G2.3 para un cultivo durante toda la noche. 25 Todas las incubaciones se realizaron en 5% de O₂: 6% de CO₂: 89% de N₂. Las muestras de 500 µl de medios fueron congeladas y analizadas utilizando ultramicrofluorescencia. Se midieron también glucosa y piruvato en los embriones descongelados.

30

Número de blastocistos	Promedio de glucosa consumida (pmol/embrión/h)	Promedio de piruvato consumido (pmol/embrión/h)	Número de blastocistos completamente expandidos después de 24 h	Número de blastocistos completamente eclosionados después de 24 h
16	40,6	15,2	12 (75%)	5 (31%)

Ejemplo 12

- 35 En este ejemplo se utilizó el protocolo de fecundación *in vitro* (FIV) tal como se indica en Gardner y otros 1988 y Schoolcraft 1999.

Este ejemplo demuestra las ventajas de un medio que comprende ahr, HYN y citrato en el desarrollo de embriones humanos.

Tabla 14

Grupo de tratamiento	Número de pacientes	Embarazos resultantes	Tasa de implantación
HSA	10	7 (70%)	32,8 %
AHR + citrato + HYN	12	9 (66,7%)	31,9 %

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Suplemento de medios de cultivo de mamíferos que comprende albúmina humana recombinante y citrato, suplemento **caracterizado porque:**
- (a) el suplemento está libre de albúmina humana no recombinante; y
 - (b) el suplemento es capaz de ayudar a un desarrollo embrionario equivalente al de los embriones cultivados en presencia de albúmina sérica.
- 10 2. Suplemento, según la reivindicación 1, que además comprende hialuronano fermentado.
3. Suplemento, según la reivindicación 1, en el que el suplemento está libre de una o más macromoléculas no recombinantes, hialuronano derivado de un vertebrado de sangre caliente y combinaciones de los mismos.
- 15 4. Preparación que comprende el suplemento según la reivindicación 1 y un medio de cultivo seleccionado del grupo que comprende un medio de transferencia de embriones, un medio de criopreservación de embriones y un medio de fertilización *in vitro*.
- 20 5. Preparación que comprende albúmina humana recombinante, citrato y un medio de cultivo, preparación **caracterizada porque:**
- (a) la preparación está libre de albúmina humana no recombinante; y
 - (b) la preparación es capaz de aumentar la viabilidad de gametos o células embrionarias.
- 25 6. Preparación, según la reivindicación 5, que comprende de 0,1 mg/ml a 20 mg/ml de albúmina humana recombinante.
7. Preparación, según la reivindicación 5, que comprende aproximadamente de 0,5 mg/ml aproximadamente hasta 5,0 mg/ml de albúmina humana recombinante.
- 30 8. Preparación, según la reivindicación 5, que comprende además hialuronano fermentado.
9. Preparación, según la reivindicación 5, en la que está presente citrato en un intervalo aproximadamente de 0,1 mM aproximadamente hasta 1,0 mM en base al volumen total de la preparación.
- 35 10. Preparación, según la reivindicación 9, en la que está presente hialuronano fermentado en un intervalo aproximadamente de 0,1 mg/ml, aproximadamente hasta 1,0 mg/ml en base al volumen total de la preparación.
- 40 11. Preparación, según la reivindicación 5, en la que el medio de cultivo se selecciona del grupo que comprende G1.2/G2.2, KSOM/KSOMaa, M16, SOF/SOFaa, MTF, P1, HTF, Earle's, Hams F-10, M2, Hepes-G1.2, Whitten's y PBS.
- 45 12. Preparación, según la reivindicación 5, en la que la preparación es capaz de aumentar la viabilidad de los embriones.
13. Preparación, según la reivindicación 5, en la que la preparación es capaz de proporcionar un desarrollo embrionario equivalente comparado con el de los embriones cultivados en presencia de albúmina sérica.
- 50 14. Preparación, según la reivindicación 5, en la que la preparación es capaz de aumentar la capacidad de los blastocistos de sobrevivir a la congelación y descongelación.
15. Preparación, según la reivindicación 5, en la que la preparación es capaz de ayudar al desarrollo embrionario desde la etapa de blastocistos hasta la eclosión.
- 55 16. Preparación que esencialmente comprende:
- (a) un medio de cultivo;
 - (b) albúmina humana recombinante en una cantidad aproximadamente desde 0,1 mg/ml aproximadamente hasta 20,0 mg/ml;
 - (c) hialuronano fermentado en una cantidad aproximadamente desde 0,1 mg/ml aproximadamente hasta 5,0 mg/ml; y
 - (d) citrato en una concentración aproximadamente desde 0,1 mM aproximadamente hasta 5,0 mM, en la que la preparación es capaz de ayudar al desarrollo celular embrionario o de gametos y además en la que la preparación está libre de albúmina humana no recombinante.
- 60

17. Preparación, según la reivindicación 16, en la que el medio de cultivo se selecciona del grupo que comprende G1.2/G2.2, KSOM/KSOMaa, M16, SOF/SOFaa, MTF, P1, HTF, Earle's, Hams F-10, M2, Hepes-G1.2, Whitten's y PBS.
- 5 18. Preparación, según la reivindicación 16, en la que la preparación está libre de una o más macromoléculas no recombinantes, albúmina humana no recombinante, hialuronano derivado de vertebrados de sangre caliente y combinaciones de los mismos.
- 10 19. Suplemento que esencialmente comprende:
- (a) albúmina humana recombinante en una cantidad aproximadamente desde 0,125 mg/ml aproximadamente hasta 20,0 mg/ml;
- (b) hialuronano fermentado en una cantidad aproximadamente desde 0,1 mg/ml aproximadamente hasta 5,0 mg/ml; y
- 15 (c) citrato en una concentración aproximadamente desde 0,1 mM aproximadamente hasta 5,0 mM, en el que el medio de cultivo que comprende el suplemento es capaz de ayudar al desarrollo celular embrionario o de gametos y además en el que el suplemento está libre de albúmina humana no recombinante.

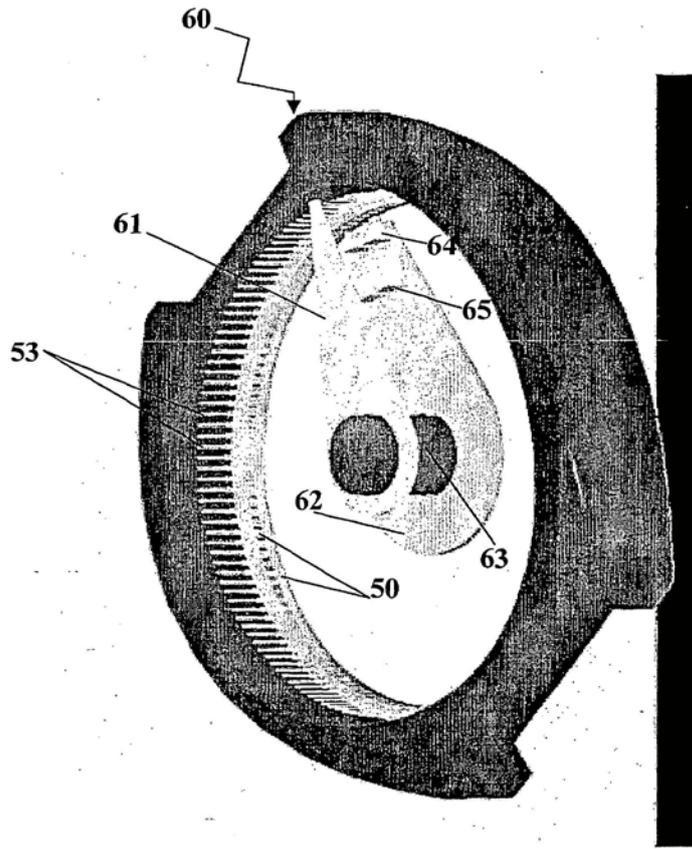


Fig. 1

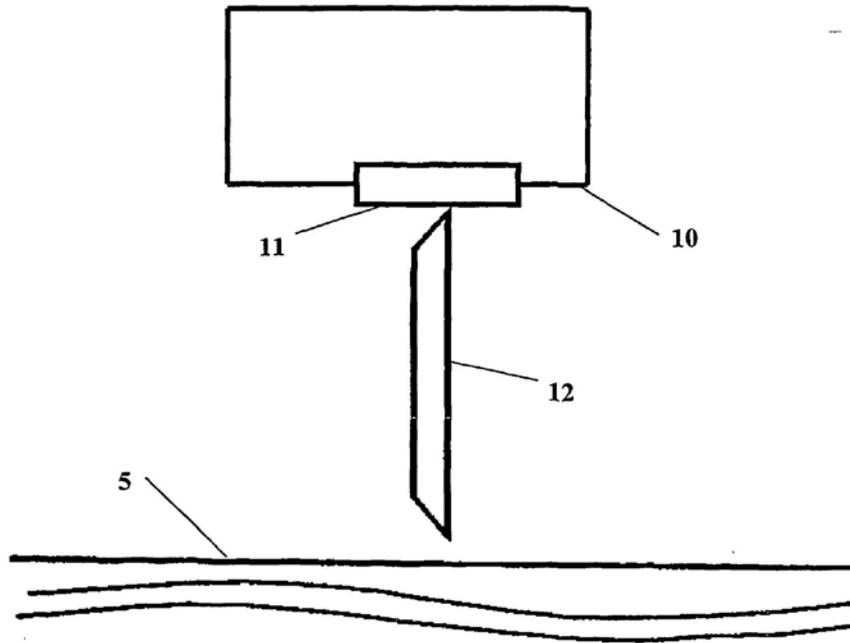


Fig. 2A

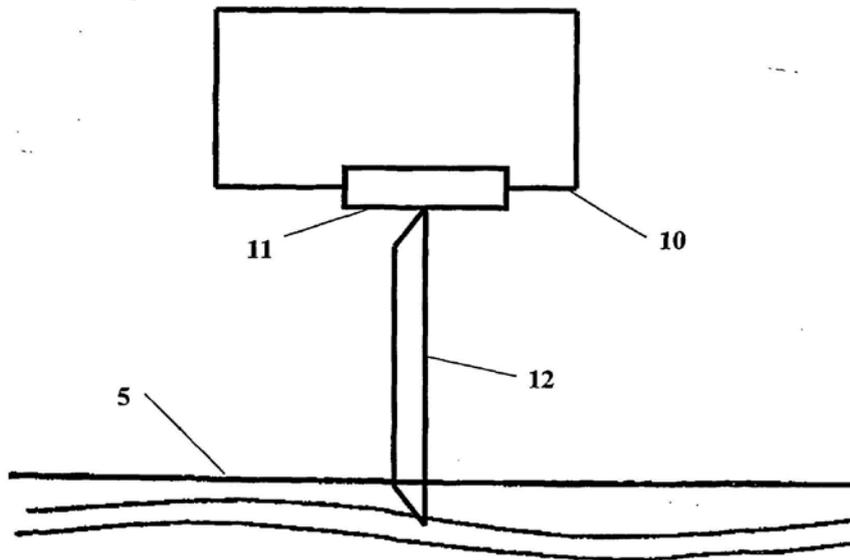


Fig. 2B

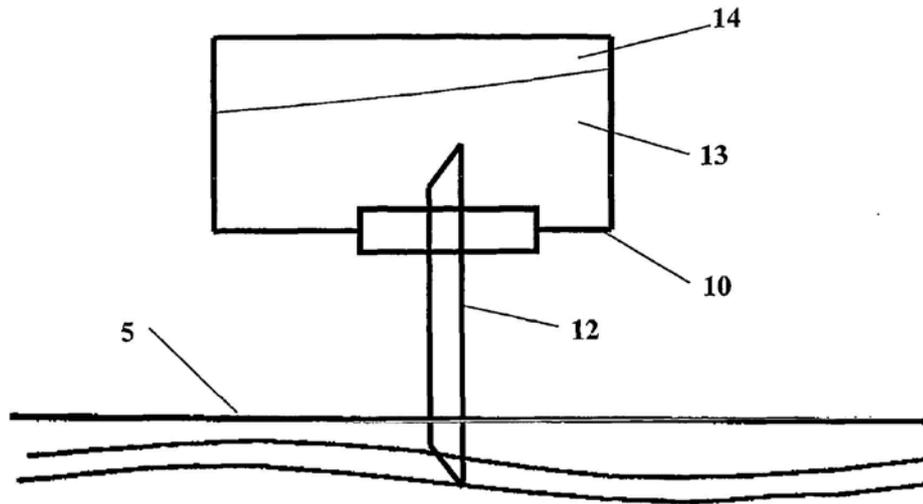


Fig. 2C

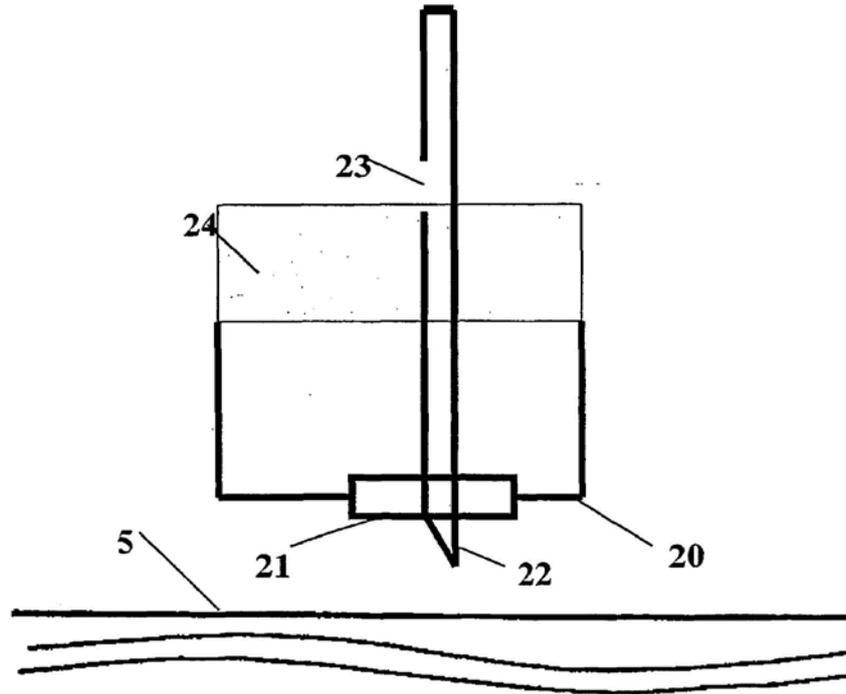


Fig. 3A

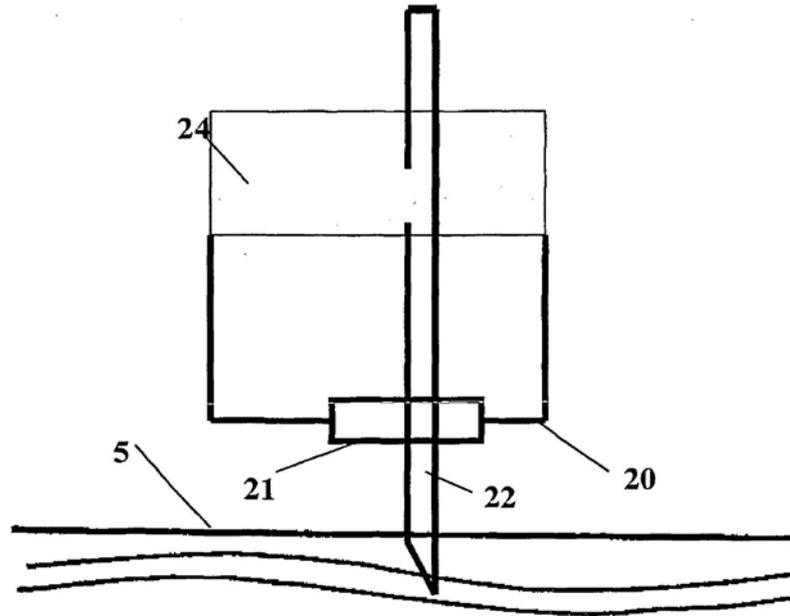


Fig. 3B

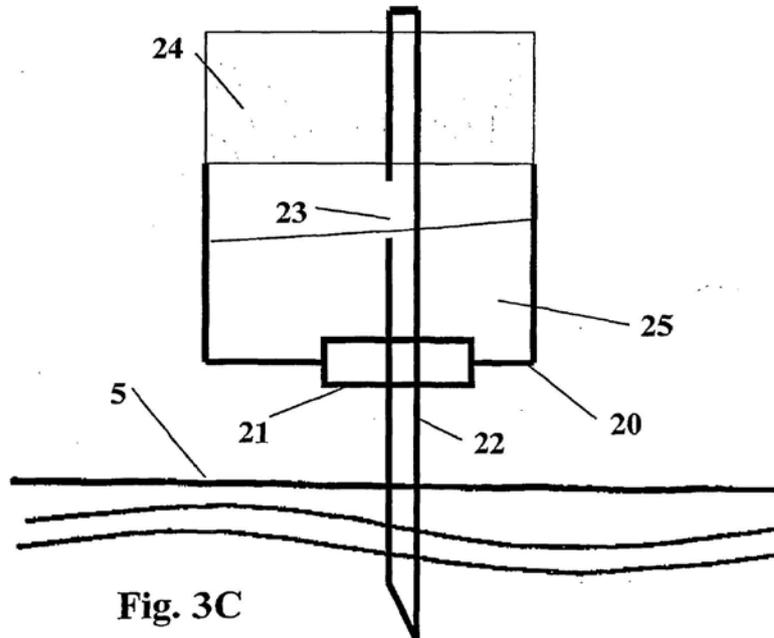


Fig. 3C

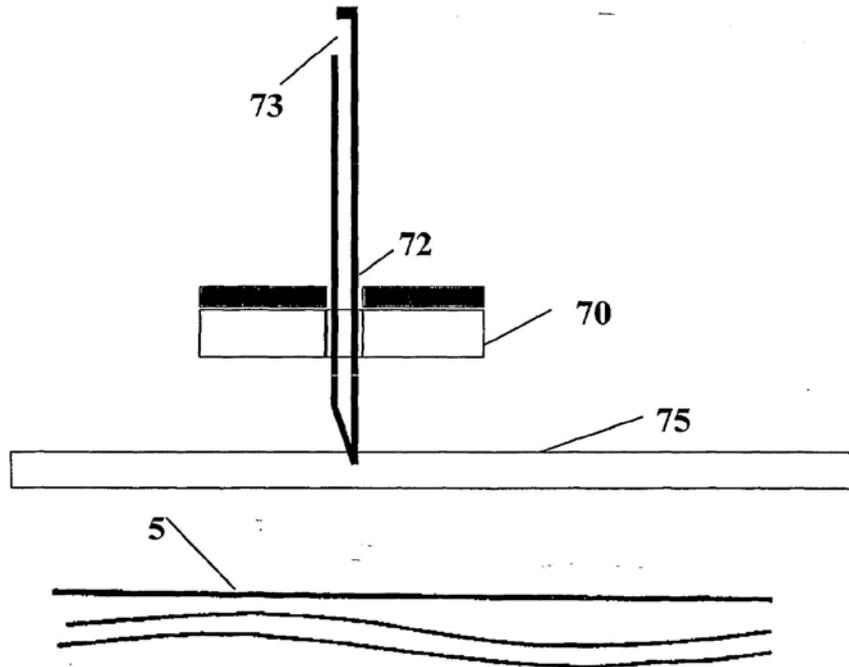


Fig. 4A

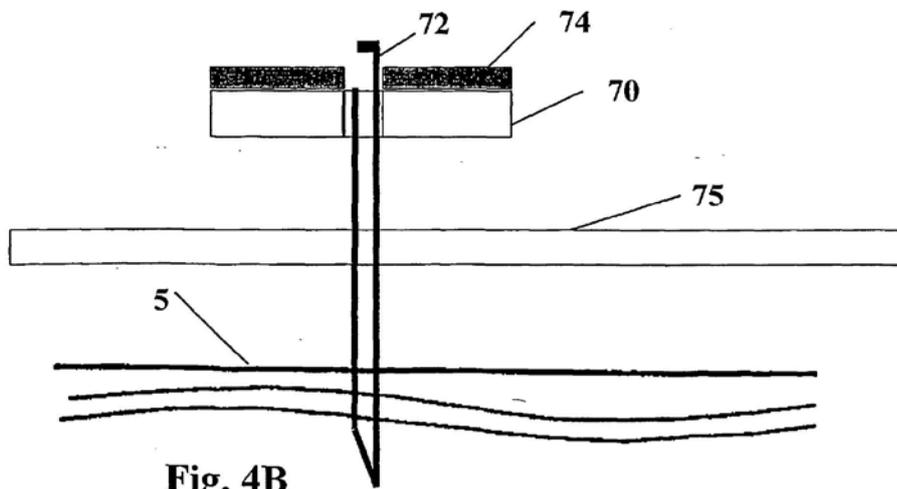
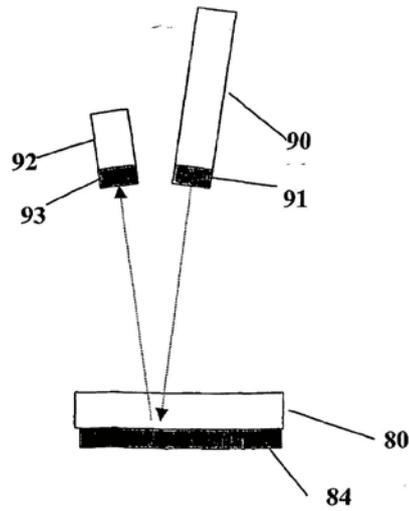
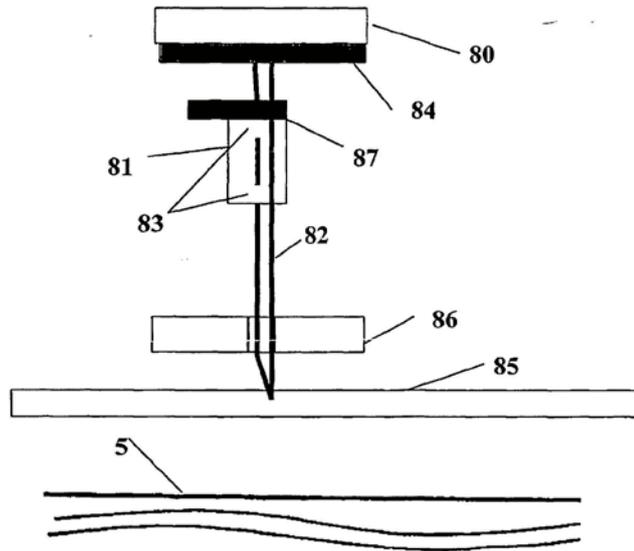


Fig. 4B



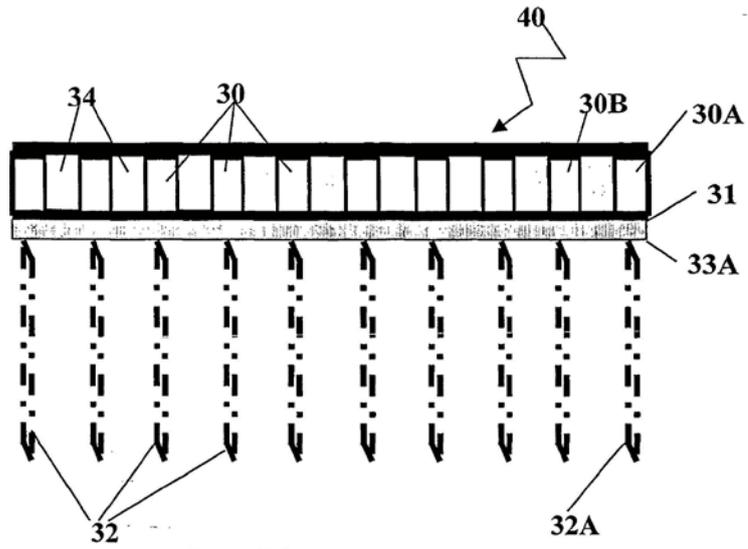


Fig. 7A

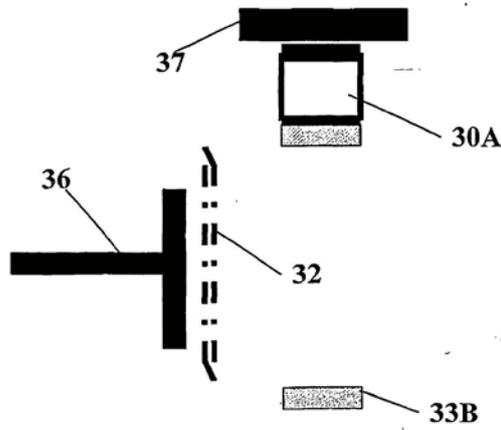


Fig. 7B

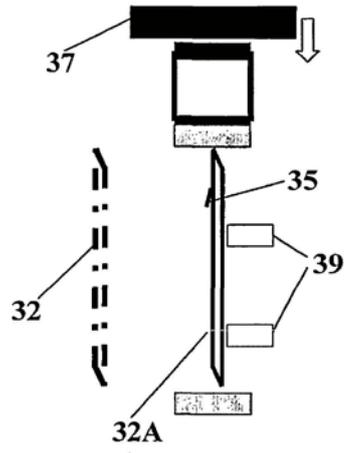


Fig. 7C

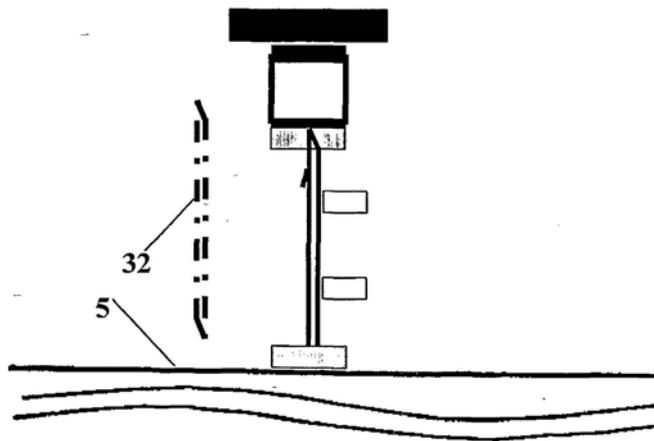


Fig. 7D

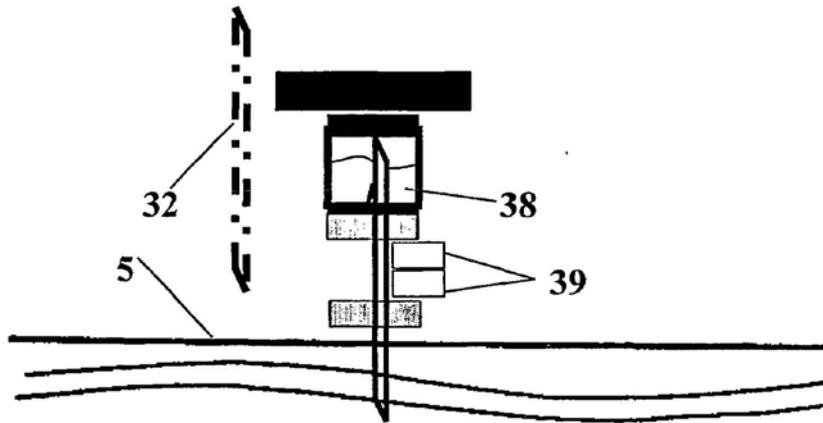


Fig. 7E

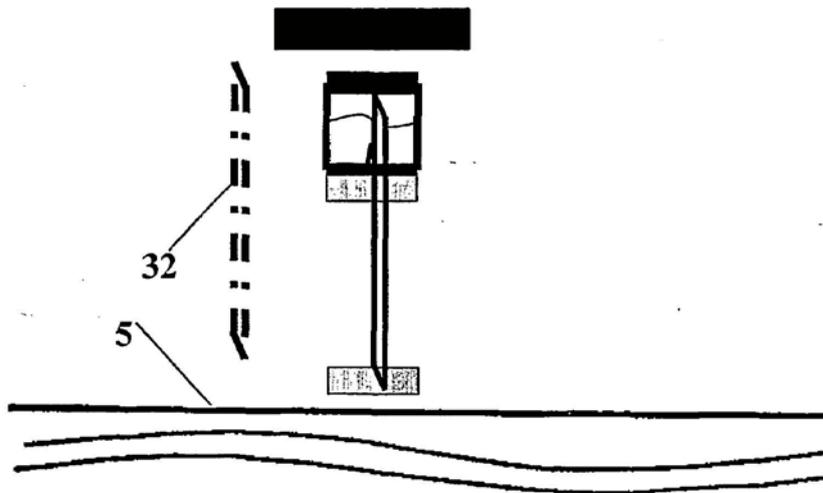


Fig. 7F

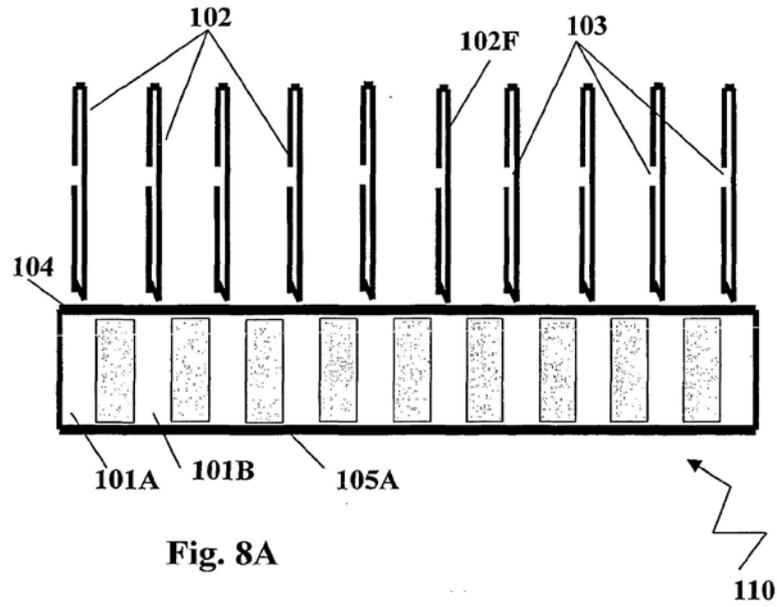


Fig. 8A

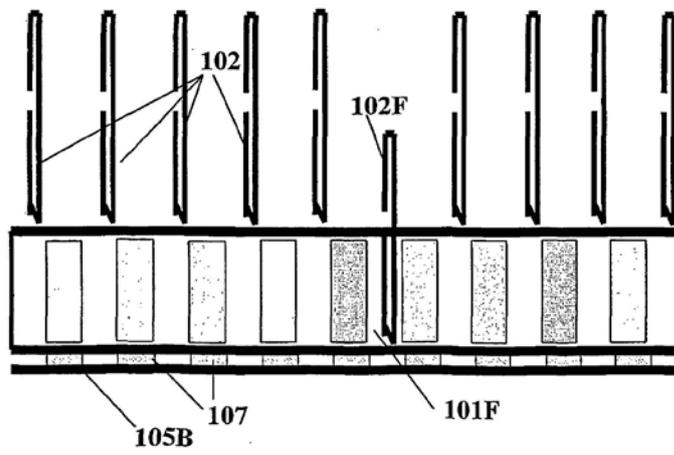


Fig. 8B

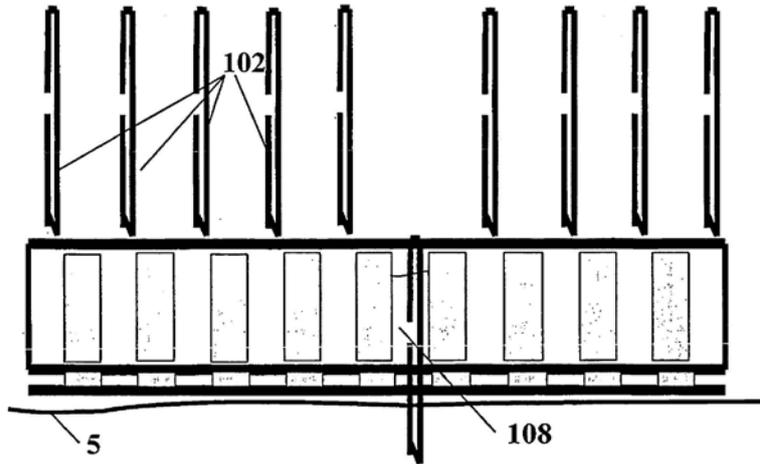


Fig. 8C

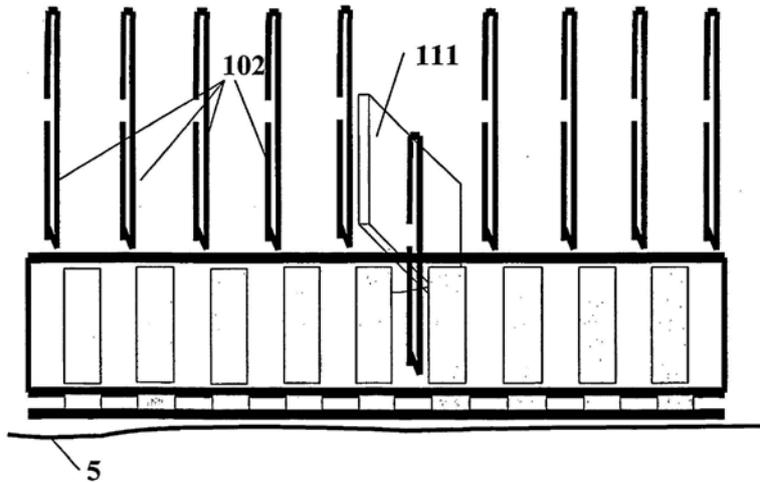


Fig. 8D