

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 689**

51 Int. Cl.:

C12N 5/02 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/075 (2010.01)

C12N 5/076 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2008 E 08866081 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2235160**

54 Título: **Productos de medios de cultivo y manipulación de embriones y gametos sin proteínas**

30 Prioridad:

21.12.2007 US 15764

21.12.2007 NO 20076604

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.08.2013

73 Titular/es:

**ALI BIN M. ABDULLAH, JAFFAR (100.0%)
A4-3 KONDO DANAU MURNI, TAMAN DANAU
DESA
58100 KUALA LUMPUR, MY**

72 Inventor/es:

ALI BIN M. ABDULLAH, JAFFAR

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 420 689 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

Productos de medios de cultivo y manipulación de embriones y gametos sin proteínas.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a medios sin proteínas (PFM) especializados y optimizados para la reproducción humana y los programas de fertilidad. Los productos de medios sustancialmente sin proteínas descritos en la presente memoria son útiles para prevenir la transmisión de patógenos unidos a proteínas incluyendo entre otros y en particular priones a pacientes que se someten a tratamiento de infertilidad, a recién nacidos concebidos por tecnologías de reproducción asistida (ART) y a trabajadores en estas áreas de trabajo, específicamente las relacionadas con la aplicación en la ART humana.

10 Antecedentes de la invención

Los medios de cultivo de embriones disponibles en el mercado convencionales para procedimientos de ART humana contienen albúmina de suero humano (HSA) obtenida de fuentes tisulares y sanguíneas humanas. En algunos laboratorios también se usa albúmina de suero bovino (BSA) como una fuente de proteína en procedimientos de cultivo de embriones humanos (Loutradis *et al.*, 1992; Quinn, 1994), obtenida de forma similar de fuentes tisulares o 15 sanguíneas de vacas. Se ha indicado que la eficacia de los medios que contienen HSA y BSA es similar (Staessen *et al.*, 1998). El uso en el medio de cultivo de proteína obtenida de donantes (humanos o bovinos) tiene el potencial de transmitir enfermedades a pacientes que se someten a tratamiento de concepción asistida. La generación de embriones humanos viables en un sistema de cultivo químicamente definido (desprovisto de proteína añadida o albúmina, o extracto de proteína derivado de ser humano o animal) que comienza con la recogida de oocitos, seguida de lavado de espermatozoides, inseminación, fertilización hasta el estadio de embrión escindido y finalmente transferencia de embriones no se ha descrito, aunque se han presentado unos medios definidos químicamente para ratón, conejo y primates en años recientes (Spindle, 1995; Li *et al.*, 1996; Schramm y Bavister, 1996). Las reivindicaciones anteriores de un medio sin proteínas definido químicamente (PFM) para aplicación humana, de hecho, no eran verdaderamente sin proteínas, debido a que el espermatozoide pretendido para 20 fertilización se preparaba aún en medio que contenía proteínas del suero (Mohr & Trounson, 1986; Serta y Kiessling 1997 (Resumen); Parinaud *et al.* 1999). Por lo tanto no se ha descrito hasta ahora un medio totalmente sin proteínas para procedimientos de ART.

La disponibilidad de un medio químicamente definido usado para generar embriones humanos de estadio de escisión temprano viables es necesaria en la técnica para asegurar la seguridad de pacientes que se someten a 30 tratamiento de reproducción asistida evitando el uso de proteína donante potencialmente peligrosa. La preocupación sobre posible transmisión de enfermedades patógenas, en particular enfermedades virales, tales como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) humano y hepatitis o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) transmitida por priones u otros en productos derivados de sangre ha conducido a que varios proveedores de servicios de atención sanitaria en el área de ART en todo el mundo busquen una alternativa o alternativas a la proteína de donante para 35 sus procedimientos de cultivo y manipulación de embriones.

La transmisión de una enfermedad viral mortal (SIDA) a hemofílicos a través de productos derivados de la sangre está bien documentada (Véase, por ejemplo, Craven *et al.*, 1997, *Med. Sci. Law* 37: 215-227; Keshavjee *et al.*, 2001, *Soc. Sci. Med.* 53.: 1081-1094; Weinberg *et al.*, 2002, *Ann. Intern. Med.* 136: 312-319; Evatt, 2006, *Semin. Hematol* 43: S4-9). Se descubrió que la hormona del crecimiento humana extraída de la hipófisis era capaz de transmitir CJD a seres humanos (Esmonde *et al.*, 1994) y las inyecciones de gonadotropina humana también podrían transmitir CJD entre personas (CDC, 1985). CJD puede transmitirse a través de la sangre (aunque el título de priones de CJD es bajo en sangre; Heye *et al.*, 1994). En el pasado se produjo una epidemia de hepatitis B en aproximadamente 200 pacientes de IVF que recibieron embriones cultivados en medio que contenía suero agrupado contaminado con virus de hepatitis B (van Os *et al.*, 1991). Recientemente la comunidad científica se enfrentó al dilema de tener que 40 informar a sus pacientes de que una preparación comercial de un medio de cultivo usado para cultivo y manipulación de embriones puede estar contaminado con albúmina donada por una persona que posteriormente murió de CJD (Kemmann, 1998).

Existen varios informes de desarrollo de blastocistos de ratón de estadios de cigoto y escindido en un medio sin proteínas. Los primeros informes incluyen los de Brinster (1965) y, Cholewa y Whitten (1970) que usaron polivinilpirrolidona (PVP), que es un coloide de alto peso molecular, como lubricante y para aumentar la viscosidad del medio. Posteriormente a este trabajo varios otros trabajadores han cultivado con éxito embriones de ratón así como otros mamíferos en medios sin proteínas (Dandekar y Glass, 1990; Spindle, 1995; Li *et al.*, 1996; Schramm y Bavister, 1996). En años recientes, además de PVP, también se ha usado alcohol polivinílico (PVA) (Bavister, 1995) para reemplazar la proteína del suero en medio de cultivo. Por ejemplo, Biggers *et al.* (1997) investigaron el efecto de reemplazar la albúmina de suero bovino (BSA) con alcohol polivinílico (PVA) y/o aminoácidos en el desarrollo de cigotos de ratón. Observaron que el PVA no podría sustituir completamente la BSA en el medio de cultivo de embrión de ratón. El efecto de PVA en la velocidad de desarrollo de blastocistos solo fue ligeramente menor que con BSA pero la velocidad de eclosión parcial fue significadamente menor. La sustitución de BSA con PVA redujo la respuesta global pero no condujo a perturbaciones importantes. 50

Además de sus muchos papeles biológicos, las proteínas del suero confieren atributos físicos útiles tales como lubricación y viscosidad en el medio de cultivo. La viscosidad y lubricación aumentada en el medio de cultivo se requiere para la facilidad de manejo y manipulación del embrión y para evitar que se adhiera a las paredes de la placa de cultivo y catéteres de transferencia de embriones. La incorporación de PVP y PVA sirve únicamente para duplicar los atributos físicos de proteínas del suero. Sin embargo, PVP y PVA no son fuentes de nitrógeno fijado y no realizan los diversos papeles biológicos de la proteína. Además, las propiedades teratológicas de PVP y PVA no se han examinado completamente, lo que hace su uso en reproducción asistida terapéutica humana cuestionable (Gardner y Lane, 1998a).

Algunos investigadores han intentado generar embriones humanos viables en un sistema de cultivo sin proteínas, más recientemente Serta *et al.* (1997) y Parinaud *et al.* (1998a). Sin embargo Serta y colaboradores (1997) prepararon sus espermatozoides para inseminación mediante un descenso a través de una columna de BSA (aunque se realizó cultivo posterior en un medio sin proteínas). Estos trabajadores consiguieron una tasa de embarazos de 31 % (n=45) algunos de los cuales han llegado a término con el nacimiento de descendencia normal. Parinaud *et al.* (1998a) obtuvieron fertilizaciones con espermatozoides preparados en un medio sin proteínas cuando se realizó inseminación en el mismo medio. Sin embargo los cigotos resultantes se cultivaron en medio BM1, y aunque esta referencia no especifica si su medio BM1 contenía proteína, una publicación previa del mismo grupo sugiere que el medio BM1 contenía HSA a 1% (Parinaud *et al.*, 1998b).

Algunos trabajadores han mostrado que el reemplazo de proteínas de suero con un único antioxidante y quelante tal como EDTA (Mehta y Kiessling, 1990; Serta *et al.*, 1997) no altera la fertilización y escisión de embriones viables en el ratón y ser humano. Sin embargo Serta *et al.* (1997) sugirieron que el catéter de transferencia de embriones se aclare exhaustivamente con el medio sin proteínas, lo que implica la tendencia en los embriones a pegarse a la pared interna del catéter de transferencia de embriones. La proteína del suero también tiene un papel en el mantenimiento del pH en el medio de cultivo (Moessner *et al.*, 1993). Además de su papel como un nutriente en sistemas biológicos, la proteína tiene varios otros papeles tales como antioxidante que rompe cadenas y un quelante de iones metálicos (Barber, 1961; Vidlakova *et al.*, 1972; Wayner *et al.*, 1987).

Las funciones fisiológicas de albúmina y proteínas del plasma en general están bien documentadas. El papel de la albúmina en la prevención de la peroxidación de membrana indica un papel directo en la estabilidad de membrana. Está implicada en la permeabilidad de membrana capilar y en osmorregulación. La albúmina proporciona 80% de la presión osmótica coloidal total en plasma. La albúmina está implicada en el transporte de dióxido de carbono y actúa como un tampón de pH, la albúmina representa la mayor proporción (95%) del valor del tampón no bicarbonato de plasma. Las proteínas también actúan como una fuente de energía. La alanina examinada es piruvato, que puede convertirse a acetil-CoA o glucosa y glicógeno. La albúmina puede ayudar a solubilizar lípidos y transporta hormonas, vitaminas y metales. Actúa como depósitos para la liberación y uso de estos componentes.

Cualquier intento de sustituir albúmina de suero en un medio de cultivo debería por lo tanto tener en consideración estos papeles *in vivo* y atributos físicos que son útiles para el manejo y manipulación de embriones *in vitro*. Un único componente puede no cumplir todas las funciones de la proteína del suero.

Aunque se han descrito previamente medios sin proteínas que permiten el desarrollo de varias especies animales, no se ha usado dicho medio sin proteínas con éxito en seres humanos, ni podría suponerse que dicho medio permite o es óptimo para el desarrollo de embriones humanos. Por lo tanto existe una clara necesidad de un medio de cultivo sin proteínas definido, especialmente adaptado para ART e IVF humana.

Antecedentes de la técnica relacionada

Existen unos medios previamente conocidos "potencialmente sin proteínas" para tratar y cultivar células humanas, particularmente células de roedores (ratones, ratas, cobayas, etc.) pero también para fertilización, desarrollo de embriones y embarazo en seres humanos para fertilización *in vitro*.

Caro *et al.* han descrito uno de dicho medios "sin proteínas" para aplicación humana; sin embargo no fueron capaces de superar la necesidad de proteínas en el medio de preparación de espermatozoides debido a que se requieren proteínas para inducir la capacitación del espermatozoide sin la cual el espermatozoide no adquirirá la capacidad de penetrar y/o fertilizar el óvulo. Por lo tanto, el sistema de medios de Caro y colaboradores no está completamente sin proteínas. De forma similar, Serta *et al.* (1997; resumen) y Parinaud *et al.* (1998a, resumen; 1999) también han descrito medios "sin proteínas" para ART humana pero ellos, igual que Caro *et al.* (1986) anteriormente, usaron proteínas en al menos un estadio de su sistema de cultivo.

El lavado del espermatozoide previamente preparado con medio que contiene proteínas añadidas como se ha descrito en estas referencias no retira los agentes infecciosos contaminantes con completa seguridad, especialmente virus y priones. Además, esto también es desventajoso porque somete a los espermatozoides a condiciones de lavado con tensión innecesaria y puede imponer requisitos excesivos de mano de obra y recursos.

Se han descrito medios "sin proteínas" para crecimiento de células de mamífero o particularmente humanas fuera del contexto de IVF, entre otros, en Kovár *et al.*, 1987, *Biotechnology Letters*, vol. 9 nº 4, p. 259-264 "Iron Compounds at high Concentrations Enable Hybridoma Growth in a Protein-free Medium"; Keen, 1995,

Cytotechnology, vol. 17: 193-202 "The culture of rat myeloma and rat hybridoma cells in a protein-free medium"; Stoll *et al.*, 1996, *J. Biotechnology*, vol. 45, p. 111-123 "Systematic improvement of a chemically defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production". Este trabajo está relacionado específicamente con producción de anticuerpos monoclonales y no describe la adaptación de dichos medios para usos de IVF o ART.

- 5 Otras publicaciones que describen medios de cultivo sin proteínas, pero no adaptados o adecuados para procedimientos de IVF humana son: Zang *et al.*, 1995, *Biotechnology*, vol. 13, p. 389-392, "Production of Recombinant Proteins in Chinese Hamster Ovary Cells Using A Protein-Free Cell Culture Medium"; y la publicación de solicitud de patente Internacional nº WO 2005/120576 A2.

Sumario de la invención

- 10 La presente invención se refiere a nuevas formulaciones de medios de cultivo de embriones sin proteínas para la recuperación del óvulo humano (i. medio de Lavado), manipulación y almacenamiento de los espermatozoides (ii. medio de manipulación de gametos), fertilización del óvulo humano (iii. medio de cultivo de embriones), manipulación de gametos y embriones (iv. medio de manipulación de gametos y embriones) y también el desarrollo del cigoto resultante en cultivo (v. medio de cultivo de embriones) durante de 1 a 2 ciclos de escisión para aplicación humana en el tratamiento y alivio de subfertilidad e infertilidad usando procedimientos de ART. La presente invención incluye la formulación de una única solución de medio que puede reemplazar y/o usarse como un reemplazo/medio para todas las nuevas soluciones de medios anteriores. Los medios sustancialmente sin proteínas de la invención son distintos de los medios sin proteínas (denominados series ART-7 y ART-7b en dicha memoria) previamente presentados por el mismo inventor (Ali, 1997; Ali *et al.*, 2000). En informes previos, el inventor ha descrito la investigación sistemática que condujo a la formulación de tres medios precursores, concretamente, ART-1, ART-2 y ART-3. En el mismo informe el inventor ha descrito cómo la serie de medios sustancialmente sin proteínas ART-7 y ART-7b evolucionó desde el medio ART-1. Los embriones generados por inyección de espermatozoides intracitoplasmática (ICSI) en la serie de medios ART-7 y ART-7b sustancialmente sin proteínas se usó con éxito para tratar 11 de 21 (52,4 %) mujeres de 39 años de edad o menores para conseguir embarazos clínicos. La formulación de la serie de medios ART-1, ART-7 y ART-7b no se ha descrito. La presente invención proporciona un medio sustancialmente sin proteínas que se han formulado a partir de, pero son diferentes de, el medio precursor ART-3. El desarrollo del medio precursor ART-3, pero no su composición, se ha descrito por el inventor (Ali, 1997; Ali *et al.*, 2000).

- 30 En las formas de realización ejemplificativas de la presente invención, se describe específicamente una serie de medios sustancialmente sin proteínas, denominada la serie PFM-11 en la presente memoria. Estos medios tienen la ventaja específica de ser una composición uniforme desprovista de componentes biológicos no uniformes potencialmente peligrosos que pueden dañar a los gametos y embriones, y podrían transmitir potencialmente enfermedades mortales conocidas en la actualidad y desconocidas hasta el momento a los pacientes que se someten a tratamiento de ART, los bebés concebidos a través de dicho tratamiento y a trabajadores de la atención sanitaria implicados en los procedimientos de tratamiento de ART, así como cumplir con rigurosas nuevas normas y regulaciones que gobiernan las técnicas y métodos de fertilización *in vitro*.

- 40 La naturaleza completamente definida de las formulaciones de medios sustancialmente sin proteínas de acuerdo con la presente invención también es útil para facilitar la investigación sobre el metabolismo embrionario preimplantación que previamente estaba obstaculizada debido a naturaleza no definida y composición no uniforme de formulaciones de medios de cultivo de embriones disponibles en la actualidad. La calidad de los embriones humanos del día 2 generados en esta serie de medios sustancialmente sin proteínas (PFM) usando la técnica de cultivo de ultramicrogota continua (cUMD) fue estadísticamente comparable a o mejor que embriones que se desarrollaron en formulaciones de medios comerciales de control que contenían proteínas del suero. Los medios PFM no eran tóxicos para espermatozoides humanos. La fertilización y posterior desarrollo de embriones humanos por IVF convencional e inyección de espermatozoides intracitoplasmática (ICSI) fue comparable a los controles.

Los medios sustancialmente sin proteínas de la presente invención también son adecuados para su uso en medios de cultivo y manipulación de embriones humanos sustancialmente sin proteínas y asegurarán que las enfermedades unidas a proteína no se transmitan a pacientes y neonatos. Los medios sustancialmente sin proteínas de la invención pueden almacenarse congelados a -20°C durante hasta 2 años sin pérdida de eficacia.

- 50 La presente invención ha superado con éxito la necesidad de proteínas donantes añadidas en el sistema de cultivo y proporciona un sistema de medios sustancialmente sin proteínas para aplicación de ART humana que utiliza productos de medios sustancialmente sin proteínas comenzando con la recuperación del óvulo, preparación de espermatozoides, inseminación, fertilización, cultivo del embrión resultante y transferencia del embrión. Esta característica distingue provechosamente los medios de la presente invención de sistemas de cultivo "sin proteínas" previamente descritos, que utilizaban productos de medios que contenían proteínas en algún punto durante el procedimiento y por lo tanto no eran completamente sin proteínas. Como consecuencia, estos medios de cultivo anteriores pueden estar contaminados con agentes infecciosos y pueden enfrentarse a posibles restricciones reguladoras. Las composiciones, intervalos, intervalos preferidos y especificaciones particulares de los diversos componentes de la presente invención se exponen en la presente memoria.

60

La presente invención es el producto de estudios sobre el efecto, la tolerancia y la determinación de niveles óptimos de componentes individuales tales como aminoácidos, antioxidantes y quelantes, osmolitos, vitaminas, nutrientes y fuentes de energía alternativas que podrían sustituir en parte los diversos papeles de proteína *in vivo* e *in vitro* y que ejemplifica las funciones de proteínas en diversos medios de manipulación sin proteínas (por ejemplo medios de manipulación de espermatozoides y oocitos, y medio ICSI) y medios de cultivo de embriones de la presente invención que están sin proteínas de suero donante. Las concentraciones óptimas de los componentes mencionados se utilizaron para formular varios medios de cultivo de embriones. Posteriormente el mejor de estos medios que mostraba desarrollo embrionario óptimo y tasa de eclosión de blastocistos significativamente mayor se identificaron y se refinaron adicionalmente para permitir el desarrollo de embriones humanos en ausencia de proteínas del suero añadidas. Los medios sustancialmente sin proteínas de la invención son capaces de permitir la fertilización de oocitos humanos con espermatozoides preparados en el mismo medio. Los cigotos resultantes se desarrollaron posteriormente en el medio sustancialmente sin proteínas para formar embriones humanos de estadio de escisión tempranos viables. La transferencia de estos embriones condujo a embarazos normales y nacimientos vivos.

La presente invención proporciona por lo tanto con éxito medios útiles durante los procedimientos de IVF/ART (recuperación del óvulo, preparación de espermatozoides, inseminación, fertilización, cultivo del embrión resultante y transferencia del embrión) que superan la necesidad de proteínas añadidas en un sistema de cultivo.

Descripción detallada de determinadas formas de realización de la invención

La presente invención proporciona una serie de soluciones de nutrientes denominadas genéricamente medios de manipulación y cultivo de embriones que están desprovistos de cualquier proteína o componentes de tipo proteico. Estos medios son útiles en la fertilización de óvulos humanos y el desarrollo posterior de óvulos fertilizados durante hasta 2 a 6 días fuera del cuerpo *in vitro*. Estas soluciones de nutrientes se denominan "medios de cultivo de embriones". Además de IVF y ART, otras metodologías y técnicas en las que sería ventajoso usar medios de cultivo de nutrientes sustancialmente sin proteínas incluyen tecnología y terapia de células madre, regeneración celular/tisular y procedimientos de tratamiento de trasplante. El experto en la materia apreciará cómo adaptar los medios expuestos en la presente memoria para dichos usos.

Como se describe con mayor detalle a continuación, el uso de medios sustancialmente sin proteínas de la presente invención para gametos y embriones humanos aumentó la eficacia de IVF y ART. Por ejemplo, la tasa de embarazo clínico obtenida usando IVF convencional con medios sustancialmente sin proteínas (PFM-11) aumenta a 50% (14 de 28) en todos los grupos de edad y hasta 53,8% (14 de 26) en mujeres por debajo de 40 años de edad, en comparación con medios de embriones disponibles en la actualidad que contienen proteínas (33% de embarazos para todos los grupos de edad combinados, como se cita en Ali, 2004). La tasa de embarazo clínico de ICSI con medio sustancialmente sin proteínas de la presente invención aumenta de forma similar a 46,2% (12 de 26) en todos los grupos de edad y hasta 54,5% (12 de 22) en mujeres por debajo de 40 años de edad. Esta diferencia es estadísticamente significativa a favor del presente medio sustancialmente sin proteínas, lo que indica que los medios sustancialmente sin proteínas de la presente invención son al menos equivalentes a (y pueden ser superiores a) medio que contiene proteínas comercial disponible en la actualidad en el mercado. El número de bebés nacidos de embriones generados en los medios PFM-11 por IVF convencional fue de 12 y por ICSI, 12. Los bebés nacidos de embriones generados en el PFM-11 de la invención son aparentemente normales, inteligentes, habladores y activos (según informes parentales). Estos datos estadísticos se produjeron a partir de una muestra de al menos 24 niños de dichos nacimientos.

Como se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión "sin proteínas", "esencialmente sin proteínas" y "sustancialmente sin proteínas" signifique que los medios se prepararon usando componentes que no contienen proteínas (como se describe en más detalle en la presente memoria) y que no se añadieron proteínas o componentes que contuvieran proteínas al medio.

Las formas de realización ejemplificativas de la presente invención incluyen una serie de medios sustancialmente sin proteínas denominados la serie PFM-11. Esta serie de medios tiene una serie de productos de medios específicos, concretamente:

1. Medio de lavado sustancialmente sin proteínas
2. Medio de manipulación de gametos (espermatozoides) sustancialmente sin proteínas
3. Medio de manipulación de gametos (oocito/embrión) sustancialmente sin proteínas
4. Medio de cultivo de embriones sustancialmente sin proteínas

Estos medios se usan de acuerdo con los métodos expuestos posteriormente, que se pretende que ilustren el uso de estos medios pero no son limitantes de ningún uso adicional de los medios, entre otros, en métodos de IVF o ART conocidos por los expertos en la materia. Al desarrollar los medios de la invención en experimentos como se exponen en la presente memoria, cada procedimiento se realizó en paralelo usando unos medios que contenían proteína convencional y PFM ejemplificativos de la invención.

Preparación de espermatozoides humanos

Los pacientes masculinos produjeron semen humano por masturbación. Los espermatozoides se prepararon por la técnica de descenso convencional y ocasionalmente con centrifugación por gradiente de densidad. En el procedimiento de gradiente de densidad, el sedimento recuperado se lavó dos veces y se resuspendió en medio de cultivo. Las preparaciones de espermatozoides se prepararon usando medios de ensayo o control según fuera apropiado. Específicamente, se prepararon espermatozoides para ICSI o IVF en el medio sustancialmente sin proteínas (PFM-11) para los experimentos sobre el efecto de la deficiencia proteica en el desarrollo de embriones. Los espermatozoides recogidos se incubaron en fase gaseosa de CO₂ a 5% en aire a 37°C hasta su uso.

Estimulación ovárica y recuperación de oocitos

Se indujo estimulación ovárica por inyecciones subcutáneas de agonista de hormona liberadora de gonadotropina (Buserelin; Suprefact; Hoescht, Fankfurt, Alemania) comenzando en la fase lútea media hasta que se consiguió regulación negativa o menstruación. Se consideró que se había conseguido regulación negativa cuando el grosor del endometrio era de 4 mm o menos, y cuando los niveles de estradiol, progesterona y LH en sangre alcanzaron valores de línea basal. Se administraron inyecciones de hormona foliculo estimulante (FSH; Metrodin; Serono, Roma, Italia) durante tres días para iniciar el reclutamiento de folículos. A continuación, se administró gonadotropina menopáusica humana (Pergonal 500; Serono, Roma, Italia) de acuerdo con la respuesta del paciente a la estimulación del desarrollo folicular. Se indujo ovulación mediante una inyección de 10.000 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Pregnyl; Organon, Oss, Países Bajos) después de conseguir un tamaño folicular de 16 mm o menos. Se realizó recuperación del oocito (RO) 36 horas después mediante aspiración vaginal guiada por ultrasonido.

*Técnicas de inseminación y cultivo*Fertilización *in vitro* (IVF)

Se inseminaron oocitos individualmente con espermatozoides móviles en microgotas de medio de cultivo equilibrado a una concentración de 100.000/ml en aceite mineral ensayado para embriones y equilibrado (M8410, Sigma Chemicals, Estados Unidos). Los oocitos inseminados se cultivaron en una atmósfera de CO₂ a 5% en aire a 37°C. A la mañana siguiente los oocitos se denudaron con pipetas de denudación (Stripper®, MidAtlantic Diagnostics, Estados Unidos).

Inyección de espermatozoide intracitoplasmática (ICSI)

En un procedimiento alternativo (usado, por ejemplo, para superar la subfertilidad de factor masculino humano), se realizó ICSI. Los oocitos se prepararon para ICSI mediante exposición a solución de hialuronidasa durante 30 segundos (80 UI/ml; Cat N° 10110010, Medi-Cult A/S, Letsa Parkalle 42,2100 Copenhague, Dinamarca) y después se transfirieron a Medi-Cult™ equilibrado o medio sustancialmente sin proteínas de la invención. Los oocitos humanos se incubaron durante 5-7 minutos en el medio de cultivo en fase gaseosa de CO₂ a 5% en aire a 37°C y después se denudaron con una pipeta de denudación (ART N° 1670, International Medical Products BV, Zutphen, Países Bajos). Los oocitos humanos denudados se lavaron y finalmente se incubaron en medio de cultivo durante 30-60 minutos adicionales.

Se usaron pipetas de ICSI disponibles en el mercado para micromanipulación (Agujas de Inyección, Cat N° 130340B; pipeta de Retención, Cat N° 13030013; Laboratoire CCD, 60 Rue Pierre Chanun, 75008 París, Francia o aguja de Inyección, Cat. N° 10-MIC; pipeta de retención, Cat N° 10-MPH-120; Humagen, Charlottesville, Virginia 22911, Estados Unidos). Se extendió en capa fina una ultramicrogota de 5 µl de PVP (Cat N° 1089001, Medi-Cult A/S, Dinamarca) en el centro de una placa de petri (Cat N° 1006, Falcon Plastics, Becton Dickinson, Rutherford, Nueva Jersey, 07070, Estados Unidos). La extensión de PVP se rodeó de hasta un máximo de cinco microgotas de 10 µl de medio de IVF tamponado con HEPES (Gamete-1009 Scandinavian IVF Sciences AB, Gothenberg, Suecia). Las microgotas se estratificaron con aceite mineral ensayado para embriones y equilibrado (M8410, Sigma Chemicals, Estados Unidos). Se introdujo preparación de espermatozoides (de 1 a 2 µl) en el centro de la extensión de PVP. Se realizó ICSI de oocitos maduros de forma convencional (por ejemplo, como se expone en Palermo *et al*, 1992).

Cultivo de ultramicrogotas

Se prepararon ultramicrogotas (UMD; 1,5 a 2 µl para cultivo de 3 a 7 embriones humanos) de medio de cultivo en placas de 4 pocillos previamente cargadas con aceite mineral equilibrado. Las placas se incubaron en una fase gaseosa de CO₂ a 5% en aire a 37°C. El medio se cambió diariamente (técnica de UMD) con una pipeta Pasteur finamente extraída usando medio de cultivo equilibrado en experimentos preliminares pero no se cambió (cUMD; o UMD continuo) hasta el día 3 de cultivo en experimentos posteriores.

Determinación de fertilización

La fertilización se determinó de 18 a 20 horas después de ICSI o IVF, Los oocitos se consideraron fertilizados

cuando eran visibles dos pronúcleos distintos. Los oocitos fertilizados se cultivaron en microgotas o ultramicrogotas de medio equilibrado en una atmósfera de CO₂ a 5% en aire a 37°C. La calidad de embriones y escisión se evaluaron después de 24 horas.

Tasa de detención de cigotos

- 5 Este parámetro se utilizó para determinar si el medio de cultivo de acuerdo con la presente invención provoca bloqueos del desarrollo en el estadio de una célula. La eficacia del medio puede determinarse usando este ensayo. Una proporción mayor de bloqueos de desarrollo en el estadio de una célula sugerirá que el medio es deficiente o menos eficaz.

Determinación de la calidad de embriones escindidos el día 2

- 10 Se emplearon dos parámetros para determinar la calidad embrionaria de embriones de día 2, concretamente la puntuación de blastómero media y la calidad embrionaria media. Estos se determinaron como sigue:

(i) Puntuación de blastómero media =
$$\frac{\text{Número total de blastómeros}}{\text{Número total de embriones}}$$

(ii) Calidad embrionaria media =
$$\frac{\text{Total de calidades embrionarias}}{\text{Número total de embriones}}$$

- 15 Puesto que la mayoría de los embriones humanos de día 2 sanos generalmente alcanzan el estadio de 4 células, se consideró excelente una puntuación de blastómero media de 4 y superior (en un intervalo de 2 a 6). Los embriones se clasificaron de acuerdo con una escala de 1 a 4, en la que el número 1 denota poca calidad, y 4, excelente calidad. Los embriones se clasificaron colectivamente por un mínimo de tres (pero preferentemente cuatro) trabajadores de laboratorio. Además, se incluyeron otros dos parámetros para establecer diferencias en la tasa de desarrollo de embriones de estadio de escisión. Estos fueron: (i) la proporción de embriones en o por encima del estadio de 4 células y (ii) la proporción de embriones que eran de calidad 3 y superior, el día 2 de cultivo en estudios humanos.

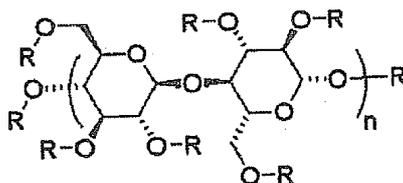
Formulación de medios

- 25 La formulación de un medio sustancialmente sin proteínas ejemplificativo de la invención descrita en la presente memoria fue la siguiente. Se sabe que la albúmina es una fuente de nitrógeno fijado y nutrientes, un antioxidante, y que también tiene varios otros papeles incluyendo estabilización de membrana. Por lo tanto, el medio sustancialmente sin proteínas de la invención sustituyó albúmina con otros componentes de medio que realizan, individualmente o colectivamente, las funciones de la albúmina en cultivo. Los componentes de medio de cultivo embrionario individual usados para estos fines incluyen aminoácidos (incluyendo pero sin limitación alanina, asparagina, aspartato, cistina, glutamato, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, taurina, treonina, triptófano, tirosina, valina, serina), antioxidantes y quelantes (por ejemplo, EDTA, glutatión reducido, tocoferol), fuentes de energía alternativas (tales como fructosa, glutamina, piruvato sódico), osmolitos (incluyendo manitol y mioinositol), vitaminas (ácido ascórbico, cianocobalamina, ácido fólico, tocoferol, etc.) y hierro elemental. La concentración de componentes individuales que permitieron el mayor desarrollo de blastocisto se consideró óptima. Se formularon tres medios (ART-1, ART-2 y ART-3) en el desarrollo de la presente invención. Se han descrito previamente los diversos experimentos realizados para formular el medio sustancialmente sin proteínas, la serie ART-7 y ART-7b del medio de cultivo ART-1 (Ali, 1997; Ali *et al.*, 2000). En la presente invención, se formuló la serie de medios sin proteínas PFM-11 a partir del medio de cultivo ART-3 (Ali, 1997; Ali *et al.*, 2000).

- 40 Las formulaciones finales para los diversos productos de medios de la serie PFM-11 se proporcionan en tablas como se expone posteriormente. Las concentraciones de HEPES y bicarbonato en estas preparaciones de medios varían, como se expone en la presente memoria.

- 45 El medio sustancialmente sin proteínas de la invención comprende sales minerales, aminoácidos, antioxidantes, antibióticos, componentes de energía y componentes de tampón (HEPES y bicarbonato para incubación en condiciones complementadas con CO₂) que son similares a pero distintos en sus detalles de medios que contienen proteínas disponibles en el mercado. Los medios sustancialmente sin proteínas de la invención comprenden únicamente una especie macromolecular (metilcelulosa y polímeros relacionados) y opcionalmente un alcohol de azúcar no metabolizado (D-manitol).

La macromolécula que comprende el medio sustancialmente sin proteínas de la invención es metil celulosa de Fórmula I:



en la que cada R es independientemente CH₃ o H y n está entre aproximadamente 34 y aproximadamente 43.

En la fórmula de metilcelulosa anterior, R puede ser H o CH₃. El alcance de la sustitución de metoxi varía entre 27,5 y 31.5% en peso. El grado de sustitución (D.S., número medio de grupos sustituyentes unidos al anillo de hidroxilo) es de 1,5-1,9. Este intervalo proporciona solubilidad en agua máxima. La sustitución de metoxi inferior da como resultado mayor solubilidad en agua y se prefiere. El código "n" designa el nivel de polimerización, y óptimamente corresponde a un peso molecular de 14.000 Dalton en relación con un índice de viscosidad aproximado de 15 cPS para una solución a 2% en agua a 20°C (está disponible en el mercado metilcelulosa que tiene estas especificaciones de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO Estados Unidos; www.sigmaldrich.com): este corresponde a un valor de "n" que está entre aproximadamente 34 y aproximadamente 43, preferentemente 36 a 39. El intervalo de este componente en el PFM es de 0,01 a 0,15 g/l y el intervalo más preferido es de 0,09 a 0,1 g/l. La concentración óptima es de 0,1 g/l.

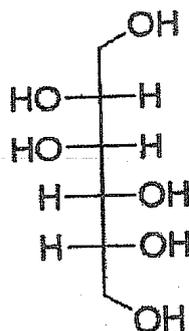
La metilcelulosa puede actuar como un antioxidante y osmolito, no es tóxica, es resistente a enzimas y no es permeable en células (Stewart *et al.*, 1995). Ayuda a proteger los gametos y embriones contra lesiones ambientales, en particular el ataque por radicales libres y cambios de presión osmótica. Protege la membrana celular de daño y ayuda a mantener la homeostasis. También es un tensioactivo y lubricante. Contribuye a viscosidad aumentada del medio, de modo que los gametos y embriones no se pegan a los laterales de las placas y dentro de las pipetas y catéteres. Estos atributos físicos se proporcionan en ausencia de proteínas del suero que normalmente realizan estas funciones. Esta sustancia es inerte y segura para aplicación humana.

La metilcelulosa se ha usado en otras partes en la industria farmacéutica y alimentaria humana durante más de 25 años sin ningún efecto secundario en estudios animales o humanos. La FAO/OMS y directivas de la UE permiten el consumo de metilcelulosa, y se ha usado como un control negativo en investigación de cáncer ya que se sabe que no es carcinogénico.

La metilcelulosa también se usa como un espesante y emulsionante en diversos productos cosméticos y alimentarios, y tiene usos medicinales, tales como para tratamiento de estreñimiento. Es digerible, no tóxica y no alérgica. Sus usos farmacológicos/clínicos son como excipientes y un material de vehículo. Se usa en colirios, como un agente de masificación y laxante, se usa para diarrea en enfermedad funcional del intestino, para controlar el resultado de ileostomía y como absorbente de sustancias tóxicas que provocan diarrea infecciosa. También es un antioxidante.

Los medios sustancialmente sin proteínas de la invención también comprenden D-manitol. Este compuesto se absorbe escasamente y se excreta casi sin cambios en la orina. Como un antioxidante y un osmolito esta sustancia puede proteger al embrión de efectos ambientales perjudiciales. Puede por lo tanto sustituir adicionalmente proteínas del suero, en parte, para proteger a los embriones contra condiciones adversas. Es de interés observar que D-manitol ejerce un efecto positivo en el desarrollo de blastocistos humanos *in vitro* incluso en presencia de proteína en el medio.

En el medio sustancialmente sin proteínas ejemplificativo de la presente invención (PFM-11), D-manitol está presente a una concentración preferida de 2,8 micromolar (la concentración más preferida) dentro del intervalo de 0,056 a 6,9 micromolar. El intervalo más preferido es de 1,4 a 5,5 micromolar, aún más preferido dentro del intervalo de 2,5 a 3,0 micromolar. La concentración más preferida es aproximadamente 2,7 micromolar. La fórmula empírica de D-manitol es C₆H₁₄O₆ y tiene la fórmula estructural:



5 El D-manitol es un aditivo alimentario, usado en tartas, confitería y dulces; siendo más dulce que la sacarosa, se considera un edulcorante alternativo para diabéticos. Es un osmolito y antioxidante. Se ha usado en altas concentraciones para tratar ictus agudo durante más de 30 años. Se usan concentraciones hipermolares de este compuesto para tratar daño cerebral grave y presión intracraneal elevada. Es un diurético y se usa para diéresis en casos de envenenamiento, o para medir el compartimento de fluido extracelular. También tiene efectos laxantes en mamíferos incluyendo el hombre. No se han presentado efectos adversos en el hombre como resultado de la aplicación clínica de D-manitol como un agente terapéutico. Tampoco es citotóxico y no es mutagénico en varias especies. El D-manitol se absorbe escasamente y se excreta (Milde, 1965; Widdowson y Dickerson, 1965). La inclusión de esta sustancia en medio de cultivo aumentó el desarrollo de blastocistos en el ratón incluso en presencia de proteínas del suero, lo que sugiere un papel positivo en el cultivo de embriones como un antioxidante y osmolito (Ali, observaciones no publicadas). Su uso está permitido por la FDA y la UE, y FAO/OMS han concluido que es seguro para el consumo humano.

15 En las soluciones y formulaciones de la invención, D-manitol de Fórmula II está presente a una concentración de aproximadamente 0,05 micromolar a aproximadamente 6,9 micromolar. El intervalo más preferido es de 1,4 a 5,5 micromolar. La concentración más preferida es de aproximadamente 2,8 micromolar.

20 El experto en la materia apreciará que los papeles de las proteínas del suero son numerosos, y en su ausencia, uno o dos componentes por sí mismos pueden no proporcionar un sustituto completo de proteínas en el medio. Por lo tanto, el experto en la materia reconocerá que la invención no proporciona únicamente medio complementado con metilcelulosa y D-manitol. En su lugar, la invención proporciona medio que comprende además una mezcla compleja de componentes adicionales, preferentemente en concentraciones óptimas, y la exclusión selectiva de componentes de medios usados habitualmente que se ha demostrado que son perjudiciales para embriones en cultivo. Algunos de estos incluyen:

25 (i) Incluir concentraciones únicas para dos aminoácidos (L-aurina y glutamina) que son los proveedores principales de nutrición y equilibrio osmótico. Estos aminoácidos se proporcionan a concentraciones dentro del intervalo de 1 mM a 30 mM de L-aurina y 1 mM a 50 mM de L-glutamina, más preferentemente 10 mM a 30 mM de L-aurina y 10 mM a 30 mM de L-glutamina y más preferentemente 20 mM de cada uno de L-aurina y L-glutamina.

30 (ii) Incluir como fuentes de energía uno cualquiera o una pluralidad de compuestos (incluyendo D-glucosa, fructosa o piruvato) que es menos probable que provoquen bloqueos del desarrollo en embriones humanos. Las concentraciones óptimas de fructosa son de aproximadamente 0,5 mM a 6,0 mM de fructosa, siendo una concentración más preferida de aproximadamente 1 mM a 5,6 mM, y una concentración más preferida de aproximadamente 5,1 mM. Las concentraciones óptimas de las dos fuentes de energía restantes se proporcionan en otra parte en la presente memoria.

(iii) Incluir las siguientes concentraciones de ciertos aminoácidos.

Nombre	Intervalo de concentración óptimo en PFM (mM)	Intervalo preferido (mM)	Concentración más preferida (mM)
L-alanina	0,1-10	0,45-0,55	0,5
L-arginina	0,018-0,18	0,072-0,125	0,072
L-cistina.2HCl	0,0025-0,025	0,01-0,02	0,01
L-glutamato	0,01-1,0	0,45-55	0,5
L-glicina	0,1-1,0	0,2-0,3	0,25
L-histidina HCl.H ₂ O	0,005-0,05	0,02-0,04	0,02
L-isoleucina	0,01-0,1	0,04-0,08	0,04
L-leucina	0,01-0,1	0,04-0,08	0,04
L-lisina HCl	0,0125-0,125	0,05-0,1	0,05
L-metionina	0,0025-0,025	0,01-0,02	0,01
L-fenilalanina	0,005-0,05	0,02-0,04	0,02
L-treonina	0,01-0,1	0,04-0,08	0,04
L-triptófano	0,00125-0,0125	0,005-0,01	0,005

ES 2 420 689 T3

L-tirosina.2Na2H2O 0,005-0,05 0,02-0,04 0,02

L-valina 0,01-0,1 0,04-0,08 0,04

(iv) Incluir las siguientes concentraciones de vitaminas solubles en agua.

Nombre	Intervalo (mM)	óptimo	Intervalo de concentración preferido (mM)	Concentración más preferida (mM)
Cloruro de colina	0,004 - 0,007		0,004-0,005	0,004
D-Biotina	0,0024-0,004		0,0024-0,003	0,0024
Ácido fólico	0,0014-0,0023		0,0014-0,0016	0,0014
Mioinositol	0,0067-0,011		0,0067- 0,0078	0,0067
Niacinamida	0,005-0,008		0,005-0,0057	0,005
Ácido D-pantoténico. ½ Ca	0,0025 - 0,004		0,0025-0,003	0,0025
Piridoxina HCl	0,003-0,005		0,003 - 0,0034	0,003
Riboflavina	0,00016-0,00027		0,00016-0,00019	0,00016
Tiamina HCl	0,0018-0,003		0,0018-0,002	0,0018

El intervalo para la vitamina B12 es el siguiente:

Nombre	Intervalo de concentraciones óptimo en PFM (pM)	Intervalo preferido (pM)	Concentración más preferida (pM)
Vitamina B12	443-885	590-738	616

- 5 (v) Incluir vitamina E (Vitamina E Tipo 6, Sigma Chemical Co.) a una concentración de 5 micromolar a 20 micromolar, más preferentemente 8 micromolar a 12 micromolar, aún más preferentemente 10 micromolar.
- (vi) Excluir L-asparagina, L-aspartato y L-serina que pueden ser perjudiciales para el desarrollo de cigotos y embriones de estadio de escisión temprana.
- (vii) Excluir hierro elemental, que puede ser perjudicial para el desarrollo de embriones.
- 10 (viii) Incluir glutatión reducido (GSH) a una concentración de 60 micromolar a 500 micromolar, y más preferentemente 250 micromolar a 350 micromolar y aún más preferentemente 300 micromolar.

Otros compuestos

Concentración en solución final

Descripción	Intervalo	Intervalo preferido	Concentración más preferida
D-glucosa	0,75-1,0	0,75-0,90	0,78 g/l
Cloruro sódico	6,12-6,95	6,12-6,19	6,171 g/l
Cloruro potásico	0,35-0,4	0,35-0,36	0,355 g/l
Cloruro cálcico	0,23-0,27	0,23-0,24	0,235 g/l
Sulfato de magnesio	0,086-0,098	0,086-0,087	0,087 g/l

Dihidrógeno fosfato sódico	0,107-0,122	0,107-0,109	0,108 g/l
EDTA, Sódico	0,0416-0,043	0,0416-0,042	0,0418 g/l
Bicarbonato sódico*	2,2	2,2	2,2g/l
Lactato sódico, jarabe a 60 %	1,9	1,9	1,9 ml/l
Rojo fenol	0,011	0,011	0,011 g/l

*Bicarbonato sódico

En medio de fertilización y cultivo	2,2 g/l (26,2 mM)	2,2g/l (26,2 mM)	2,2 g/l (26,2 mM)
En medio de manipulación de gametos	2,2g/l (26,2 mM)	2,2 g/l (26,2 mM)	2,2g/l (26,2 mM)
En medio de lavado	2,2g/l (26,2 mM)	2,2g/l (26,2 mM)	2,2 g/l (26,2 mM)

** HEPES

En medios de fertilización y cultivo de embriones	0 mM
En medios de manipulación de gametos	15 mM
En medio de lavado	25 mM

La serie de medios PFM-11 expuesta en la presente memoria difiere de medios de cultivo de embriones convencionales en al menos los siguientes aspectos:

- 5 1. Ausencia de adición de proteínas del suero donante a los medios – esto elimina el potencial de transmisión de enfermedades, haciendo la serie de medios PFM-11 de acuerdo con la presente invención no peligrosa.
2. La presencia de metilcelulosa y D-manitol.
3. Alteraciones en la composición de los medios con respecto a especie y concentraciones de aminoácidos, antioxidantes, vitaminas, fuentes de energía y sales minerales, todas optimizadas para cultivo embrionario.
- 10 Entre las ventajas de los medios de la invención están los riesgos reducidos a pacientes/trabajadores de atención sanitaria. El medio sustancialmente sin proteínas de la invención también es ventajoso porque reduce los riesgos para pacientes, sus bebés y trabajadores de la atención sanitaria expuestos a los medios. Aunque permanecen ciertos riesgos, estos son menores en comparación con los riesgos infecciosos evitados usando los medios sustancialmente sin proteínas de la invención. Estos riesgos incluyen alergias a los componentes
- 15 usados. La probabilidad de que esto suceda es muy baja debido a que los ingredientes excepto para antibióticos son principalmente inertes y no reactivos. Todos los ingredientes están en concentraciones mínimas que probablemente no induzcan una respuesta alérgica.

Ensayo clínico

- 20 Se aprobó un ensayo clínico para transferencia de embriones generados en las formulaciones finales de la serie de medios PFM-11. El ensayo clínico también investigó la diferencia de eficacia de la serie de medios PFM-11 cuando se realizó fertilización por IVF e ICSI convencional.

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones estadísticas con el ensayo de t de 2 muestras o tablas de dos por dos. Un valor de $p < 0,05$ o menos se consideró estadísticamente significativo.

25 Resultados

Características de cultivo de oocitos humanos hermanos cuando se inseminan por IVF convencional en medio sin proteínas PFM-11 y medio de cultivo de embriones MediCult™

- 30 La tasa de fertilización de oocitos hermanos después de IVF convencional fue similar en el MediCult™ de control y el medio PFM-11 (Tabla A). Se detuvo una mayor proporción de cigotos en el medio de control MediCult™ (8,1%) en comparación con el PFM (2,2%) pero esto no fue estadísticamente significativo. La calidad de embriones hermanos cIVF humanos de día 2 escindidos generados en el PFM-11 en cultivo de ultramicrogota fue significativamente superior con respecto al número y calidad de blastómeros en comparación con los generados en el medio de control. En el medio PFM-11 el número de blastómeros medio fue de 3,4 y la calidad embrionaria media fue de 3,1 (n=116). En el medio de control (MediCult™) el número de blastómeros medio fue similar ($p=0,865$) a 3,4 y la calidad embrionaria media fue significativamente menor ($p=0,001$) a 2,7 (n=118). La proporción de embriones que habían
- 35

alcanzado el estadio ≥ 4 fue similar en ambos grupos pero la proporción de embriones que estaban por encima de calidad ≥ 3 fue significativamente mayor en el grupo de PFM-11 sin proteínas.

Tabla A: Calidad de embriones hermanos humanos de día 2 generados por IVF convencional en medio PFM-11 sin proteínas

Medio	% de fertilidad	% de detención en estadio de una célula	Media del número de Blastos (ISD)	Media de Calidad (ISD)	% de células ≥ 4	% de calidad ≥ 3
PFM-11	85,3	2,2	3,4	3,1	58,4	74,3
(- proteína)	(116/136)		(1,0)	(0,9)		
MediCult™	79,2	8,1	3,4	2,7	56,2	58,1
(+ proteína)	(118/149)		(1,0)	(0,8)		
Significación	p=0,235	p=0,052	P=0,865	p=0,001	p=0,847	p=0,017

5

[Calidad de embrión: 4=excelente; 3=buena; 2= regular, 1=escasa]; Embriones de controles generados por ICSI o IVF; Blastos = blastómero; Hallazgo: Medio de ensayo superior al control

Características de cultivo de oocitos humanos hermanos cuando se inseminan por IVF convencional en medio PFM-11 sin proteínas y medio de cultivo embrionario MediCult™

10 La tasa de fertilización de oocitos hermanos después de ICSI fue estadísticamente superior en el medio PFM-11 sin proteínas en comparación con el MediCult™ de control (77,8% frente a 69,4 %, p=0,043 Tabla B). La detención del desarrollo en el estadio del cigoto fue menor en el medio PFM-11 en comparación con el medio MediCult™ pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (2,8 frente a 6,3% respectivamente, p=0,088). La calidad de embriones hermanos de ICSI humanos de día 2 escindidos generados en el medio PFM-11 cultivados en ultramicrogotas fue significativamente superior con respecto a puntuación de blastómero en comparación con los generados en el medio de control (3,8 frente a 3,3 respectivamente, p=0,001). La calidad embrionaria media de los embriones generados en el medio PFM-11 fue similar a la de embriones generados en el medio de control (2,9 frente a 2,8, p=0,080). La proporción de embriones que habían alcanzado el estadio ≥ 4 fue similar en ambos grupos pero la proporción de embriones que estaban por encima de calidad ≥ 3 fue significativamente superior en el grupo sin proteínas de PFM-11.

15

20

Tabla B: Calidad de embriones hermanos humanos de día 2 generados por ICSI en medio PFM-11 sin proteínas

Medio	% de fertilidad	% de detención en estadio de una célula	Media del número de Blastos (ISD)	Media de Calidad (ISD)	% de células ≥ 4	% de calidad ≥ 3
PFM-11	77,8	2,8	3,8	2,9	71,4	63,5
(- proteína)	(196/252)		(1,2)	(0,7)		
MediCult™	69,4	6,3	3,3	2,8	54,8	58,6
(+ proteína)	(175/252)		(1,1)	(0,8)		
Significación	<u>p=0,043</u>	p=0,088	<u>p=0,001</u>	p=0,080	<u>p=0,002</u>	p=0,413

(Calidad embrionaria: 4=excelente; 3=buena; 2= regular, 1=escasa); Blastos = blastómero; Embriones de control generados por ICSI/IVF; Hallazgos: Medio de ensayo superior al control

25 *Ensayo clínico*

La tasa de embarazo clínico de IVF convencional con medio PFM-11 sustancialmente sin proteínas aumenta a 50% (14 de 28) en todos los grupos de edad y hasta 53,8% (14 de 26) en mujeres por debajo de 40 años de edad; en comparación con medios embrionarios disponibles actualmente que contienen proteínas (33% de embarazos para todos los grupos de edad combinados; citado de Ali, 2004). La tasa de embarazo clínico de ICSI con medio PFM-11 sustancialmente sin proteínas aumenta de forma similar a 46,2% (12 de 26) en todos los grupos de edad y hasta 54,5% (12 de 22) en mujeres por debajo de 40 años de edad. Esta diferencia es estadísticamente significativa a favor del presente medio PFM-11 sustancialmente sin proteínas, lo que indica que el medio sustancialmente sin proteínas de la presente invención es al menos equivalente a (y puede ser superior a) medio que contiene proteína

30

comercial disponible en la actualidad actualmente disponible en el mercado. El número de bebés nacidos de embriones generados en los medios PFM-11 por IVF convencional fue de 12 bebés (30,8%, es decir 8 de las 26 mujeres tratadas dieron a luz; o 61,5%, 8 de 13 de las mujeres embarazadas dieron a luz; un embarazo se perdió en el seguimiento) y por ICSI, también 12 bebés (36%, es decir 8 de 22 mujeres tratadas dieron a luz o 66,7% (8 de 12) de las mujeres embarazadas dieron a luz). Los bebés nacidos de embriones generados en el PFM-11 de la invención son aparentemente normales, inteligentes, habladores y activos (según informes parentales). Estos datos estadísticos se produjeron a partir de una muestra de al menos 24 niños de dichos nacimientos.

Importancia de los resultados

La disponibilidad de un medio definido químicamente para generar embriones de estadio de escisión temprano viables mejora la seguridad de los pacientes que se someten a tratamiento de reproducción asistida (ART) debido a que, entre otros, puede eliminarse proteínas donantes potencialmente peligrosas del medio. Esta es una preocupación particular con respecto a la transmisión de enfermedades patógenas, en particular enfermedades virales, tales como síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y hepatitis, o enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) transmitida por priones, u otros en productos derivados de sangre que ha conducido a varios embriólogos en todo el mundo a buscar (sin éxito) una alternativa o alternativas a proteínas donantes para sus procedimientos de manipulación y cultivo de embriones. El peligro es ciertamente real: en el pasado se produjo una epidemia de hepatitis B en aproximadamente 200 pacientes de IVF que recibieron embriones cultivados en medio que contenía suero agrupado contaminado con virus de hepatitis B (van Os *et al.*, 1991). Más recientemente la comunidad científica se enfrentó al dilema de tener que informar a sus pacientes de que una preparación comercial de un medio de cultivo usado para cultivo y manipulación de embriones puede estar contaminado con albúmina donada por una persona que después murió de CJD (Kemmann, 1998).

Además de patógenos y priones, el suero o las proteínas derivadas de suero tales como albúmina pueden contener factores embriotóxicos, como en pacientes con endometriosis, aborto recurrente y los que padecen de infertilidad inexplicada (Miller *et al.*, 1995). Se ha mostrado que estos factores embriotóxicos, la naturaleza de los cuales aún debe dilucidarse, son perjudiciales para embriones *in vitro* (Miller *et al.*, 1995; Fein *et al.*, 1995). Además, el uso de suero o albúmina plantea el problema de la reproducibilidad, debido a que la variación entre lotes en suero o albúmina está bien reconocida. Una incapacidad para controlar la calidad de diferentes lotes de sueros puede afectar a la calidad de los embriones generados. Los problemas asociados con embriotoxicidad y/o no reproducibilidad de la calidad de las proteínas de suero se evitan, por supuesto, cuando se usa medio definido químicamente en lugar de medio de cultivo que contiene proteínas donantes.

La calidad de los embriones generados en el medio de cultivo PFM-11 en condiciones de cultivo de ultramicrogotas fue similar a o algo mejor que los generados en el medio de control que contiene proteínas cuando se realiza en condiciones de cultivo similares. Resulta más importante que la tasa de fertilización, la tasa de detención de cigotos y la calidad de los embriones generados en el nuevo medio sustancialmente sin proteínas PFM-11 no es inferior a la observada en el medio de control que contiene proteínas para ninguno de los parámetros ensayados. Por otro lado se ha demostrado que el medio de control es inferior en algunos de los parámetros ensayados. El ensayo clínico mostró que el medio PFM-11 es tan eficaz o mejor que el medio de cultivo de embriones de control que contiene proteínas para embriones de día 2. Además es completamente seguro ya que está desprovisto de proteínas donantes peligrosas de origen biológico.

Se ha mostrado previamente que la calidad mejorada de embriones generados en microgotas se debe a efectos autocrinos y paracrinos de ciertos factores de crecimiento liberados por el embrión al medio (Paria y Dey, 1990; Paria *et al.*, 1991; Canesco *et al.*, 1992). De hecho, se descubrió que la adición de hIFG-1 al medio de cultivo potenciaba el desarrollo preimplantación humano, en particular, se mejoró significativamente la formación de blastocistos (Lighten *et al.*, 1998). Recientemente se ha indicado que el cultivo comunal de embriones humanos da como resultado unas mayor implantación y tasa de embarazo en reproducción asistida humana (Almagor *et al.*, 1996). El efecto de los factores de crecimiento en el desarrollo preimplantación se ha revisado exhaustivamente por Kane *et al.* (1997). Las pruebas de estudios previos sobre el efecto de factor de crecimiento indican una falta de patrón de crecimiento claro en el desarrollo embrionario *in vitro*. Los factores de crecimiento autocrinos pueden ser esenciales para el desarrollo de embriones en condiciones de cultivo con tensión. Los factores de crecimiento que pueden mostrar efectos positivos en el desarrollo preimplantación embrionario incluyen CSF-1; IGF-1; IGF-11; TGF- α , y posiblemente LIF.

Se descubrió que se producía fertilización en oocitos humanos en PFM-11 con espermatozoides preparados en un PFM-11. La capacitación no se vio afectada. Se ha mostrado en la presente memoria que PFM-11 es eficaz en la promoción de la fertilización en ausencia de proteínas del suero en el medio. La alta tasa de fertilización durante IVF convencional usando PFM-11 indicó que la ausencia de proteína en el medio no alteraba la capacitación de los espermatozoides, fertilización y desarrollo embrionario *in vitro* y posterior viabilidad en el útero. A pesar de una deficiencia de proteínas en el medio, se produjo capacitación del espermatozoide, penetración del espermatozoide en el oocito y fertilización.

Las tasas de embarazo clínico, parto y aborto fueron significativamente mejores en el grupo de ensayo (usando medios sustancialmente sin proteínas de la invención) en comparación con el control (usando medio que contenía

proteínas convencional). Además, la proporción de mujeres embarazadas en el grupo de ensayo que dieron a luz fue similar a la media mundial presentada para transferencia de embrión de estadio de escisión (DeMouzon y Lancaster, 1997).

5 Los resultados de los experimentos descritos en la presente memoria revelaron que: (i) la penetración de espermatozoides en los oocitos durante IVF convencional, interacción de gametos y posterior fertilización en el ser humano después de IVF o ICSI convencional no resultaron alteradas usando unos medios sustancialmente sin proteínas PFM-11 de la invención, (ii) los embriones de estadio de escisión temprana resultantes fueron viables y capaces de inducir embarazos clínicos, (iii) la calidad de los embriones del estadio de escisión temprana generados en el PFM-11 fue en general similar o algo superior a los generados en medio de control que contenía proteínas del suero.

10 Las medidas de purificación y esterilización rigurosas empleadas para preparaciones de origen animal no pueden excluir con absoluta certeza la posibilidad de transmisión de patógenos desconocidos (Truyen *et al.*, 1995). Con la formulación de medios sustancialmente sin proteínas y la sustitución de hialuronidasa con una hialuronidasa recombinante tal como Cumulase®, ahora es posible realizar los procedimientos de reproducción asistida por laboratorio completos sin riesgo aparente de transmisión de enfermedad a pacientes de IVF.

15 En conclusión, se demostró que el medio PFM-11 sustancialmente sin proteínas de la presente invención era eficaz, no resultando comprometida la penetración en el oocito durante IVF convencional y la fertilización después de ICSI o IVF convencional. Los embarazos tampoco resultaron comprometidos cuando se transfirieron embriones generados en el PFM, con una tasa de embarazo clínico de más del 50% en mujeres de 39 años y menos. En general el medio PFM-11 fue igualmente eficaz si no superior al medio que contenía proteínas del suero en la generación de embriones humanos viables. El uso rutinario de PFM en procedimientos de concepción asistida humana puede eliminar el riesgo potencial de transmisión de enfermedades a través de patógenos unidos a proteínas o priones peligrosos. Este estudio mostró que es posible generar embriones humanos viables en un medio desprovisto de proteína añadida en un sistema de cultivo sin células.

25 **Preparación de PFM-11 de la invención**

Solución madre 1 de solución salina basal (BSS):

La preparación de solución madre de sales basales (Solución Salina Basal – BSS) para usar es una formulación final de medio de Cultivo PFM, medio de manipulación de Gametos y medio de Lavado.

	Componente de materia prima	Cantidad (g/l)
1.	Cloruro cálcico • 2 H ₂ O	2,65 (23,8 mM)
2.	Sulfato de magnesio (anhid.)	0,9767 (8,1 mM)
3.	Cloruro potásico	4,0 (53,7 mM)
4.	Cloruro sódico	69,53 (1,2 M)
5.	Fosfato sódico monobásico (anhid.)	1,22 (10 mM)
6.	D-glucosa	10,517 (58,4 mM)
7.	Rojo fenol	0,11 (0,31 mM)
8.	WFI (Agua para inyección)	950 ml

30 **Procedimiento de preparación:**

1. Aclarar el recipiente de mezcla con WFI (Agua para inyección, resistividad de 18,2 MegaOhmios) antes de la preparación de solución madre.

2. Añadir el componente 1 a 1000 ml de agua WFI ya que es extremadamente hidrocófico.

35 3. Añadir los componentes 2-7 en orden, mezclando continuamente y componiendo el volumen final hasta 1000 ml usando WFI.

4. La filtración estéril debe llevarse a cabo inmediatamente después de que todos los solutos se hayan disuelto completamente. No filtrar si sigue habiendo solutos. Pueden usarse filtros de 0,1 micrómetros pero evitar presión excesiva cuando se filtre. La solución madre 1 puede prefiltrarse con filtro de 0,2 micrómetros seguido de filtro de 0,1 micrómetros.

5. No debería haber precipitado o turbidez después de la filtración.
6. Llenar recipientes de volumen adecuado, por ejemplo frascos.
7. Tapar los frascos (preferentemente frascos con sello a prueba de manipulación).
8. Almacenar en oscuridad entre 2 y 6 grados Celsius.

Almacenamiento y periodo de caducidad.

10. La solución madre de solución salina basal (BSS) fue estable durante dos meses cuando se almacenó entre 2 y 6 grados Celsius. Comprobar siempre la solución madre de BSS almacenada cuidadosamente con respecto a precipitados o turbidez antes de su uso. Descartar si aparecen precipitados o la solución ha devenido turbia durante el almacenamiento.

Volúmenes de inclusión de solución madre de BSS 1 en el producto final:

15. Cuando el bicarbonato sódico es el componente de tampón predominantemente activo en la formulación (productos de medio de cultivo), deben estar presentes 70 ml** de BSS en cada 1000 ml de formulación final preparada.

Quando HEPES es el componente de tampón predominantemente activo en la formulación (productos de medio de lavado/espermatozoide), se añaden 50 ml de BSS por cada 1000 ml de formulación final preparada.

20. Ajustar la osmolalidad del medio final con BSS o agua WFI para aumentar o reducir (respectivamente) la osmolalidad del medio:

Si la osmolalidad del medio final es de 285 mOsmoles cuando el volumen final es menor de 1000 ml (es decir después de añadir BSS, BAAS y BVS); entonces diluir por separado una cantidad pequeña de BSS con WFI. Usar un volumen de BSS con 9 volúmenes de agua WFI para proporcionar una BSS de trabajo (WBSS). Ajustar la osmolalidad de WBSS a 285 mOsmoles. Componer el volumen final de medio final hasta 1000 ml con WBSS ajustada.

25. Para la composición de formulación final de todas las soluciones madre – véase instrucciones de solución madre 4.

Solución madre 2 de solución de aminoácidos basal (BAAS):

Este protocolo se usó para preparar 1 litro de solución madre de aminoácidos basales en solución (solución de Aminoácidos Basales 5 – BAAS) para inclusión en formulaciones finales de medio de Cultivo PFM, medio de Manipulación de Gametos y medio de Lavado.

- 30.

Reactivos

	Componente de materia prima	Cantidad (g/l)
1.	L-arginina HCl	1,26 (6,0 mM)
2.	L-cistina (L cistina.2HCl)*	0,313 (1,0 mM)
3.	L-histidina HCl.H2O	0,42 (2,0 mM)
4.	L-isoleucina	0,52 (4,0 mM)
5.	L-leucina	0,52 (4,0 mM)
6.	L-lisina.HCl	0,752 (4,1 mM)
7.	L-metionina	0,15 (1,0mM)
8.	L-fenilalanina	0,32 (1,9mM)

9.	L-treonina	0,48 (4,0 mM)
10.	L-triptófano	0,1 (0,49 mM)
11.	L-tirosina (L-tirosina.2Na 2H ₂ O)*	0,519 (2,0 mM)
12.	L-valina	0,46 (3,9 mM)

13.	WFI (Agua para inyección)	1000 ml
-----	---------------------------	---------

Instrucciones para preparación de BAAS de solución madre 2

1. Aclarar los recipientes de mezcla con WFI (Agua para inyección, resistividad de 18,2 MegaOhmios)
2. Disolver los componentes 1, 2 y 4-11 en 400 ml de WFI.
- 5 Se requiere cumplimiento de las recomendaciones de almacenamiento del proveedor ya que pueden experimentarse dificultades con la solubilidad con condiciones menos que óptimas. Si se produce un precipitado descartar y comenzar de nuevo usando 25 ml de NaOH 0,11 N y 275 ml de WFI. El hidróxido sódico se usa solamente como última opción.
- 10 3. L-histidina HCl-H₂O y L-valina puede ser difícil de disolver y en dichas circunstancias puede conseguirse solubilidad usando HCl 1 N. Los componentes 3 y 12 deberían disolverse en sus propios volúmenes de 300 ml por separado de WFI. Usar solamente el volumen más pequeño posible de HCl 1 N para conseguir solubilización. La cantidad máxima de HCl 1 N (ensayado para embriones) que debería usarse es de 25 ml en 300 ml de WFI. Evitar calentar el agua, álcalis y ácidos por encima de 37 grados Celsius para disolver todos los componentes.
- 15 4. Una vez que los componentes 3 y 12 están completamente disueltos, componer el volumen final de 1000 ml añadiendo gradualmente por etapas, una parte de 200 ml de los aminoácidos solubles en agua realizados en la etapa 2 a:
 - (a) 300 ml de solución de L-histidina HCl.H₂O proporcionando 500 ml en volumen total.
 - (b) 300 ml de solución de L-valina proporcionando 500 ml en volumen total.
- 20 5. Combinar ambos volúmenes de 500 ml, gradualmente por etapas con mezclado constante para evitar la precipitación.
6. Esterilizar por filtración la solución con filtro de 0,2 micrómetros inmediatamente.
7. Llenar recipientes de volumen adecuado (por ejemplo, frascos).
8. Tapar los frascos (preferentemente frascos con sello a prueba de manipulación).
9. Almacenar en oscuridad entre 2-6 grados Celsius.
- 25 **Almacenamiento y periodo de caducidad.**

La solución madre de solución de aminoácidos basal (BAAS) se mantendrá durante dos meses cuando se almacene entre 2 y 6 grados Celsius. Comprobar siempre la solución madre de BAAS almacenada cuidadosamente con respecto a precipitados o turbidez antes de su uso. Descartar si aparecen precipitados o turbidez durante el almacenamiento.
- 30 **Volúmenes de inclusión de solución madre de BAAS en el producto final:**

Deberían usarse 10 ml de solución madre de BAA por cada 1000 ml en la preparación de todas las formulaciones finales.

Se usaron L-Tirosina.2Na 2H₂O y L-Cistina-2HCl debido a que no estaban disponibles en el mercado L-Tirosina y L-Cistina en forma libre.
- 35 Solución madre 3 de solución de vitamina basal (BVS).

El protocolo de acuerdo con este ejemplo prepara una solución madre de 1 litro de vitaminas basales en solución

(Solución de Vitamina Basal – BVS) para inclusión en formulaciones finales de medio de cultivo de PFM, medio de manipulación de gametos y medio de lavado.

Reactivos

	Componente de materia prima	Cantidad (g/l)
1.	Cloruro de colina	0,1 (0,7 mM)
2.	D-biotina	0,1 (0,4 mM)
3.	Mioinositol	0,2 (1,1 mM)
4.	Niacinamida	0,1 (0,82 mM)
5.	Ácido D-pantoténico	0,1 (0,46 mM)

6.	Piridoxina HCl	0,1 (0,49 mM)
7.	Riboflavina	0,01 (26,5 mM)
8.	Tiamina HCl	0,1 (0,33 mM)
9.	Ácido fólico	0,1 (0,23 mM)
10.	WFI (Agua para inyección)	1000 ml

5 Instrucciones para preparación de solución madre 3 (BVS)

1. Disolver los componentes 1-7 en 800 ml de agua (Agua para inyección, resistividad de 18,2 MegaOhmios). Si no se disolviera ningún componente, pueden usarse cantidades pequeñas de NaOH 0,1 N o 1 N para conseguir la solvatación como una última opción.
2. Disolver el componente 8 en 2,5 ml de NaOH 0,1 N y añadir cuidadosamente por etapas, con mezclado constante a 800 ml que contiene componentes 1-7.
3. Componer el volumen hasta 1000 ml usando agua WFI con mezclado constante y esterilizar por filtración inmediatamente con filtro de 0,2 micrómetros en recipientes adecuados (por ejemplo, frascos Nalgene de 60 ml, frascos a prueba de manipulación).
4. Tapar los frascos.
5. Almacenar en oscuridad a -20 grados Celsius.

Almacenamiento y periodo de caducidad.

- La solución madre de solución de vitamina basal (BVS) puede almacenarse durante dos meses cuando se almacena a -20 grados Celsius en alícuotas de 60 ml. Comprobar siempre la solución madre de BVS 3 descongelada cuidadosamente con respecto a precipitados o turbidez antes de su uso. Descartar si aparecen precipitados o la solución descongelada parece turbia.

Volúmenes de inclusión de solución madre de BVS en el producto final:

Deberían usarse 6,0 ml de solución madre BVS por cada 1000 ml en la preparación de todas la formulaciones finales preparadas – véase solución madre 4.

Solución madre 4 y combinaciones de formulación finales

- La preparación de la solución madre 4 permite la adición final de los compuestos químicos únicos en esta formulación y la adición de volúmenes específicos tomados de solución salina basal madre 1 (BSS), solución de

ES 2 420 689 T3

aminoácidos basal madre 2 (BAAS) y solución de vitamina basal madre 3 (BVS). El protocolo describe la adición de tampones y antibióticos que son específicos para la formulación de medios que se preparan, es decir medios de cultivo, manipulación de gametos y lavado.

- 5 El siguiente protocolo prepara 1 litro de formulación final de medio de cultivo, manipulación de gametos o medio de lavado. Pueden prepararse lotes mayores aumentando de forma apropiada las cantidades.

Reactivos

	Componente de materia prima	Cantidad (g/l)
1.	Piruvato sódico	0,02975 (0,27 mM)
2.	Fructosa	0,92125 (5,1 mM)
3.	Glicina	0,01875 (0,25 mM)
4.	Glutación (Reducido)	0,09225 (0,30 mM)
5.	D-manitol	0,0911 (0,5 mM)
6.	EDTA (sódico tetra)	0,04175 (0,10 mM)
7.	L-alanina	0,04455 (0,5 mM)

	Componente de materia prima	Cantidad (g/l)		
8.	L-taurina	1,251 (1,0 mM) 20 mM		
9.	Ácido L-glutámico monosódico	0,0735 (0,39 mM)		
10.	Sal sódica de ácido láctico	1,9 ml por litro		
11.	Vitamina B-12	100 µl/l		
12.	Vitamina E Tipo 6	333 µl/l		
13.	Solución madre 1 BSS	70 ml		
14.	Solución madre 2 BAAS	10 ml		
15.	Solución madre 3 BVS	6 ml		
		Cantidad g/l de medio de Cultivo	Cantidad g/l de Medio de manipulación de Gametos	Cantidad g/l de medio de Lavado
16.	Sulfato de gentamicina	1,5	4 (espermatozoide) 1,5 (oocito)	1,5
17.	Penicilina G	75	0 (espermatozoide) 75 (oocito)	75
18.	L-glutamina	1,461 (20mM)	1,461 (20 mM)	1,461 (20 mM)

19.	Bicarbonato sódico	2,2 (26,2 mM)	2,2 (26,2 mM)	2,2 (26,2 mM)
20.	HEPES	0,0	3,5745 (15 mM)	5,9575(25 mM)
21.	Metil celulosa	0,1	0,1	0,1

22.	WFI (Agua para inyección)	1000 ml	1000 ml	1000 ml
-----	---------------------------	---------	---------	---------

Instrucciones para preparación de solución madre 4 y combinación de formulación final.

1. Aclarar el recipiente de mezclado con WFI (Agua para inyección, resistividad de 18,2 MegaOhmios).
2. Disolver los componentes 1-11 en 700 ml de WFI mezclando continuamente mientras se realizan las adiciones.
- 5 3. Añadir los componentes 12-15 y componer hasta 900 ml con WFI y continuar mezclando.
4. Añadir los componentes 16-21 dependiendo de la preparación del tipo de formulación básico es decir medio de cultivo PFM, medio de manipulación de medios de Gametos PFM y medio de Lavado PFM.
5. Ajustar la osmolalidad de los tres medios y esterilizar por filtrado por separado usando filtros de tamaño de poro de 0,2 micrómetros, también puede usarse filtro de 0,1 micrómetros pero evitar usar presión. No usar filtro de 0,1 micrómetros si se requiere alta presión para filtrar la solución.
- 10 6. Esterilizar por filtración inmediatamente en el envasado final (frascos Nalgene):
 - Se llenan frascos de 60 ml con medio de cultivo PFM
 - Se llenan frascos de 60 ml con medio de manipulación de gametos PFM
 - Se llenan frascos de 125 ml con medio de lavado PFM.
- 15 (Los frascos usados son preferentemente frascos a prueba de manipulación)
7. Tapar frascos
8. Etiquetar frascos
9. Almacenar en oscuridad a entre 2 y 6 grados Celsius.

Nota para solución madre 4 y combinación de formulación final.

- 20 Comprobar la osmolalidad. Si la osmolalidad es alta, ajustar entonces a 285 mOsmoles añadiendo agua pura WFI. La cantidad para añadir se calcula como sigue:
 [Osmolalidad del medio – osmolalidad deseada (es decir, 285)/Osmolalidad del medio] x volumen del medio.
 Ejemplo: Si la osmolalidad del medio es de 300 y el volumen del medio es 900 ml como anteriormente, entonces se calcula como se muestra a continuación:
- 25 $[300 - 285/300] \times 900 = 15/300 \times 900 = 45$
 Por lo tanto si se añaden 45 ml de agua al medio y después se mide la osmolalidad de nuevo, teóricamente debería tenerse una osmolalidad de aproximadamente 285 más/menos 2 o 3 unidades. Tener mucho cuidado de no añadir demasiada agua debido a que los ingredientes importantes en el medio se diluirán y afectarán a la eficacia del medio, incluso si se recupera la osmolalidad del medio añadiendo más solución BSS madre 1.
- 30 Sin embargo, si la osmolalidad es menor de 285 mOsmoles, añadir BSS madre 1 solamente al medio, aumenta aproximadamente 2 a 3 mOsmoles por ml de solución madre 1 BSS pero esto no siempre puede ser predecible. Ser por lo tanto muy cuidadoso de no añadir demasiada. Añadir un poco cada vez y medir la osmolalidad.

Referencias

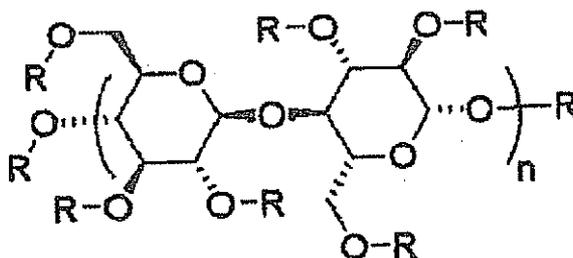
- Ali J. (1997) Formulation of a protein-free culture system for the culture of human embryos: preliminary findings and pregnancies. In: Programme and abstract book of the 16th Annual Scientific meeting of the Fertility Society of Australia, 2-4 December 1997, Adelaide, Australia, p34 (Abstract)
- 5 Ali J. (2000) Investigation into the nutrient requirement of the human embryos: Successful formulation and clinical trial of a novel protein-free embryo culture medium. *Emirates Med J.* 18:195-202
- Ali, J (2004) Generation of viable human embryos in a protein-free embryo culture (ART-7b) medium enhances clinical pregnancy rate and prevents disease transmission in assisted reproduction. *Middle East Fertil Soc. J.* 9:118-127
- 10 Ali, J., Abdulkader, A., Shahata, M.A.M. *et al.* (1998) Term deliveries from human embryos conceived in a novel culture medium devoid of added protein. *Middle East Fertil. Soc. J.* 3,40 (Abstract)
- Ali, J., Whitten, W.K. and Shelton, J.N. (1993). Effect of culture systems on mouse early embryo development. *Hum. Reprod.* 8,1110-1114
- 15 Almagor, M., Bejar, C, Kafka, I. *et al.* (1996) Pregnancy rates after comunal growth of pre-implantation human embryos in vitro. *Fertil. Steril.* 66,394-397
- Balakier, H. (1993) Tripronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development *Hum. Reprod.* 8,1892-1897
- Barber, A. A. (1961) Inhibition of lipid peroxide formation by vertebrate blood serum. *Arch. Biochem. Biophys.* 92,38-43
- 20 Barnes, RI-, Crombie, A., Gardner, D.K. *et al.* (1995) Blastocyst development and pregnancy after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum. Reprod.* 10,3243-3247
- Bavister, B.D. (1995) Culture of pre-implantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update* 1,91-148
- Biggers, J.D., Summers, M.C. and McGinnis, KX. (1997) Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse pre-implantation embryos. *Hum. Reprod. Update* 3,125-135
- 25 Boyers, S.P., Diamond, MP., Lavy, G. *et al.* (1987) The effect of polyploidy on embryo cleavage after in vitro fertilization in humans. *Fertil. Steril.* 48,624-627
- Canesco, R.S., Sparks, A., Pearson, RE. *et al.* (1992) Embryo density and medium volume effects on early marine embryo development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 9, 454-457
- 30 Caro, CM. and Trounson, A. (1986) Successful Fertilization, Embryo Development, and Pregnancy in Human in Vitro Fertilization (IVF) Using a Chemically Defined Culture Medium Containing No Protein. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, vol. 3, no. 4. p. 215-217
- Carrillo, A.J., Lane, 13., Pridham, D.D. *et al.* (1998) Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from. 48 to 72 hours after oocyte retrieval; use of glucose- and phosphate-free media. *Fertil. Steril.* 69,329-334
- 35 Centers for Disease Control. (1985) Fatal degenerative neurologic disease in patients who received pituitary derived human growth hormone. *MMWR Morb Moral Wkly Rep* 34:359-60,365-6.
- Cholewa, J.A. and Whitten, W.K. (1965) Development of 2-cell mouse embryos in the absence of a fixed nitrogen source. *J. Reprod. Fertil.* 22,553-555
- 40 Cockle SM, Aitken A, Beg F, Morrell JM, Smyth DG. (1989) The TRH-related peptide by pyroglutamylglutamylprolinamide is present in human semen. *FEBS Lett* 1989; 252:13-7
- Dandekar, P.V. and Glass, R.H. (1990) Development of two-cell mouse embryos in protein-free and protein-supplemented media. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer* 7, 107113
- De Mouzon, J. and Lancaster, P. (1997). World collaborative report on in vitro fertilization. Preliminary data for 1995. *J. Assist. Reprod. Genet.* (suppl.) 14,250S-265S
- 45 Drakakis, P., Loutradis, D., Milingos, S. *et al.* (1996) The in vitro development of mouse embryos beyond the blastocyst stage into the hatching and outgrowth stage using different energy sources. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13,786-792
- Du, Z.F. and Wales, R.G. (1993) Effect of culture from the zygote stage on the metabolism of glucose and glutamine

- by 2-cell embryos and blastocysts recovered from, outbred or H female mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 5,555-565
- Esmonde T, Lueck CJD, Symon L, Duchon LW, Will RG. (1994) Creutzfeldt-Jakob disease and lyophilised dura mater grafts: report of two cases. *J. Neurol Neurosurg Psychiat* 56:999-1000.
- 5 Gardner, D K.. (1994) Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol. Int.* 18,1163-1179
- Gardner, D. K. and Lane, M. (1998a) Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum. Reprod, (suppl.)* 13,148-160
- Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L. *et al.* (1998b) A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 13,3434-3440
- 10 Green CM, Cockle SM, Watson PP *et al.* (1996) A possible mechanism of action for fertilization promoting peptide, aTRH-related tripeptide that promotes capacitation and fertilizing ability in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 45:244-52.
- Heyc, N., Henson, S., and Muller.N. (1.994) Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Lancet* 343:298299,
- 15 Kane, K.T., Morgan, PM. and Coonan, C. (1.997) Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum. Reprod, Update* 3:137-157
- Kemmann, E. (1998) Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and assisted reproductive technology (ART). *Hum. Reprod.* 13,1777
- Lane, M. and Gardner, D.K. (1997) Non-essential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14,398-403
- 20 Li, J., Foote, R.H., Liu, Z. *et al.* (1996) Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology* 47,1103-1113
- Lighten, A.D., Moore, GI., Winston, *et al.* (1998). Routine addition of human insulinlike growth factor-1 ligand could benefit clinical in vitro fertilization culture. *Hum. Reprod.* 13,3144-3150
- 25 Loutradis, D., Rallianidis, K., Drakkis, P. *et al.* (1992) Successful pregnancy in human IVF using BSA as a protein source in the transfer medium. *Assist. Reprod. Technol. Androl.* 3,233-238
- Mehta, T.S. and Kicssling, A.A. (1990) Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with and without amino acids or serum. *Biol. Reprod.* 43,600-606
- Milde, MD. (1965). *Ann. Rev. Pharmac.* 5:125
- 30 Moessner, J. and Dodson, W.C. (1993) The role of growth factors and proteins in media for in vitro fertilization. *Assist. Reprod. Rev.* 3,63-67
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into oocyte. *Lancet.* 340:17-18
- Paria, B.C. and Dey, S.K. (1990) Pre-implantation embryo development in vitro: cooperative interactions among embryos and the role of growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87,4756-4760
- 35 Paria, B.C, Tsukamura, H. and Iley, S.K. (1991) Epidermal growth factor-specific protein tyrosine phosphorylation in pre-implantation embryo development *Biol. Reprod.* 45,711-718
- Parinaud, J., Milhet, P., Vieitez, G. *et al.* (1998a) Human sperm capacitation and in vitro fertilization in a chemically defined and protein-free medium (SMART 1), Proceedings of the 16th World Congress on Fertility and Sterility and the 54th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. October 4-9,1998, San Francisco, California, United States of America, *Fertil. Steril, (suppl.)* p.S195-S196 (Abstract)
- 40 Parinaud, J., Vieitez, Milhet, P., *et al.* (1998b) Use of plant enzyme preparation (coronase) instead of hyaluronidase for cumulus cell removal before intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 13,1933-1935
- Poiley, S.M. (1960) A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animal colonies. *Proc. Anim. Care Panel*, 10,159-166
- 45 Quinn, P. (1994) Use of co-culture with cumulus cells in insemination medium in human in vitro fertilization (IVF). *J. Assist. Reprod. Genet.* 11,270-277
- Saito, H., Hirayama, T., Koike, K. *et al.* (1994) Cumulus mass maintains embryo quality. *Steril.* 62,555-558.

- Schramm, R.D. and Bavister, B.D. (1996) Development of in-vitro-fertilized primate embryos into blastocysts in a chemically defined, protein-free culture medium. *Hum. Reprod.* 1,1690-1697.
- 5 Serta, R.S., Sakellariou, M., Kiessling, A.A. *et al.* (1997) Outcome of human embryos conceived and cleaved in protein-free culture conditions. Proceedings of the 53rd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. October 1.
- Stewart GJ, Wang Y, Niewiarowski S. (1995) Methylcellulose protects the ability of anchorage-dependant cells to adhere following isolation and holding in suspension. *Biotechniques.* 19(4):598-604
- Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. October 188-22,1997, Cincinnati, Ohio, United States of America, (suppl.) 5214-5215 (Abstract)
- 10 Spindle, A. (1995) Beneficial effect of taurine on mouse zygotes developing in protein-free culture medium. *Theriogenology* 44,761-772
- Staessen, C, Janssenswillen, C, De Clerck, E. *et al.* (1998) Controlled comparison of commercial media for human in-vitro fertilization: Menezo B2 medium versus Medi-Cult universal and BM1 medium. *Hum. Reprod.* 13,2548-2554
- 15 Tesarik, J., Pilka, L., Drahorad, J. *et al.* (1988) The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implications in IVF. *Hum. Reprod.* 3,129-132
- Parinaud, J., Milhet, P., Vieitez, G. and Richoilley, G. (1999). Use of a medium devoid of any human or animal compound (SMART2I) for embryo culture in intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16:13-16.
- Truyen, U., Parrish, C.R., Harder, T.C. *et al.* (1995) There is nothing permanent except change. The emergence of new viral diseases. *Vet. Microbiol.* 43,103-122. Cited in: Parinaud *et al.*, 1998b
- 20 Van Os, H.C., Drogendijk, Aat, C. Fetter, W.P.F. *et al.* (1991) The influence of contamination of culture medium with hepatitis B virus on the outcome of in vitro fertilization pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165,152-159
- Vidlakova, Erazimova, J., Horky, J. *et al.* (1972) Relationship of serum antioxidative activity to tocopherol and serum inhibitor of lipid peroxidation, China. *Acta* 36,61-66
- 25 Wayner, Dam, Burton, G.W., Ingold, K.U. *et al.* (1987) The relative contribution of vitamin E, ascorbate and proteins to total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 408-419
- Widdowson, E.M. and Dickerson, J.W.T. (1964). In: Comar, L.C. and Brommer, F. (eds.), *Mineral Metabolism*, New York- London, Vol. IIA, p. 13.

REIVINDICACIONES

1. Medio de cultivo celular sustancialmente sin proteínas para células reproductoras humanas, adecuado para su utilización durante el tratamiento *in vitro* de células reproductoras humanas para su utilización en fertilización *in vitro* y otras tecnologías de reproducción asistida, que comprende sales minerales, aminoácidos, antioxidantes, vitaminas, nutrientes, antibióticos, D-manitol y metilcelulosa que presenta un peso molecular de 14.000 Daltons.
2. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, en el que dicha metilcelulosa está caracterizada de manera que una solución al 2% presente una viscosidad de 15 centipoises a 25°C.
3. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, en el que dicha metilcelulosa es de fórmula I:



- en la que cada R es independientemente H o CH₃ y n es un número entero que presenta un valor de 34 a 43 y en la que la sustitución de metoxi es de 27,5% a 31,5% en peso.
4. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 3, en el que el número medio de sustituyentes de CH₃ unidos a cada resto de azúcar del compuesto de fórmula I es de 1,5 a 1,9.
5. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4 en el que dicha metilcelulosa está presente en la solución a una concentración de 0,01 g/l (0,71 micromolar) a 0,5 g/l (0,036 mM).
6. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en el que los aminoácidos son L-arginina, L-cistina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptófano, L-tirosina, L-valina, L-alanina, L-aurina, L-ácido glutámico, L-glutamina o glicina o cualquier combinación de los mismos.
7. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4 en el que las sales minerales que comprenden el medio son cloruro cálcico, sulfato de magnesio, cloruro potásico, cloruro sódico y fosfato sódico.
8. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en el que las vitaminas que comprenden el medio son cloruro de colina, mioinositol, niacinamida, ácido D-pantoténico, piridoxina HCl, riboflavina, tiamina HCl, ácido fólico, vitamina B12, vitamina E o cualquier combinación de los mismos.
9. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en el que los nutrientes que comprenden el medio son D-glucosa, piruvato, fructosa, ácido láctico o cualquier combinación de los mismos.
10. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, en el que el antioxidante en la solución es el glutatión.
11. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, que comprende además EDTA.
12. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, que comprende además HEPES.
13. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, que comprende además rojo fenol u otro indicador de pH.
14. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, que comprende además sulfato de gentamicina, en el que el sulfato de gentamicina está presente en la solución a una concentración de 1,5 mg/l a 4 mg/l.
15. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, que comprende además penicilina G, en el que la penicilina G está presente a una concentración de 75 mg/l.
16. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, que comprende además D-manitol.
17. Medio sustancialmente sin proteínas según la reivindicación 1, 2, 3 o 4, que comprende además bicarbonato sódico.

18. Medio según la reivindicación 1 para la utilización en un método de tecnología de reproducción asistida que comprende la etapa de manipular las células reproductoras humanas con el medio de cultivo sustancialmente sin proteínas.

5 19. Medio para la utilización según la reivindicación 18, en el que la célula reproductora humana es un óvulo no fertilizado o una pluralidad de espermatozoides o un óvulo fertilizado y en el que el medio es específico para la inseminación interuterina.

10 20. Procedimiento para realizar el medio de cultivo celular sustancialmente sin proteínas para células reproductoras humanas según la reivindicación 1, en el que el medio se prepara a partir de al menos una o una pluralidad de soluciones madre de sales minerales, aminoácidos, antioxidantes, vitaminas, nutrientes, antibióticos, D-manitol y metilcelulosa que presentan un peso molecular de 14.000 Daltons, en el que dichas soluciones madre se diluyen con agua para formar el medio de cultivo celular sustancialmente sin proteínas.