

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 088**

21 Número de solicitud: 201231116

51 Int. Cl.:

A61K 31/201 (2006.01)

C12N 5/075 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.07.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.02.2014

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070508

71 Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (100.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla ES**

72 Inventor/es:

VILCHES FERRÓN, Miguel Angel

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

54 Título: **COMPOSICIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO QUE COMPRENDEN HIALURONA Y UN ÁCIDO GRASO ESENCIAL POLIINSATURADO SELECCIONADO DE ENTRE ÁCIDO LINOLEICO Y ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO.**

57 Resumen:

Composición y medios de cultivo que comprenden hialurona y un ácido graso esencial poliinsaturado seleccionado de entre ácido linoleico y ácido docosahexaenoico.

Composición que comprende hialurona en un rango de concentración de 0,1 a 0,4 mg/mL y un ácido graso esencial poliinsaturado que se selecciona de entre ácido linoleico (LA) en una concentración de entre 0,03 mM y 0,1 mM y ácido docosahexaenoico (DHA) en una concentración de entre 0,03 mM y 0,1 mM, y sus usos para generar células de calidad, tanto para la producción de animales transgénicos, para la producción animal, como para terapia celular o para reproducción asistida.

ES 2 443 088 A1

DESCRIPCIÓN

Composición y medios de cultivo que comprenden hialurona y un ácido graso esencial poliinsaturado seleccionado de entre ácido linoleico y ácido docosahexaenoico.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular, la Medicina y la Farmacia, y se refiere a una composición que permite aumentar la calidad embrionaria y la fluidez de las membranas plasmáticas, mejorando los medios que se utilizan actualmente para el cultivo celular, y especialmente para el cultivo de células madre, células madre embrionarias, y embriones, favoreciendo el adecuado desarrollo preimplantacional. Dicha composición comprende ácido linoleico (LA), ácido docosahexaenoico (DHA), o su combinación, y permite generar células de calidad, tanto para la producción de animales transgénicos, para la producción animal, como para terapia celular o para reproducción asistida.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Las condiciones de cultivo *in vitro* pueden influenciar significativamente el desarrollo embrionario, determinando cambios responsables de su menor calidad, comparados con los embriones producidos *in vivo*. Durante la maduración *in vitro*, aproximadamente el 90% de los ovocitos inmaduros puestos a cultivar, alcanzan la metafase II y expulsan el primer cuerpo polar entre las 16 y 24 hs de comenzada la maduración. De estos, aproximadamente el 80% es fecundado y comienzan a dividirse, al menos, hasta el estadio de 2 a 4 células. Sin embargo, sólo un 25-40% alcanza el estadio de blastocisto (B) o blastocisto expandido (Bex) luego del cultivo durante 6-7 días. Esto indica que el cultivo embrionario, correspondiente al paso más prolongado dentro del proceso de producción *in vitro*, es el período en el que se establece el mayor porcentaje de pérdidas del sistema. A su vez, durante esta etapa, se define en gran medida la calidad de los embriones obtenidos (Enrigh *et al.*, 2000. *Theriogenology* 54,659-673, Rizos *et al.*, 2002. *Mol Reprod Dev* 61,234-248, Galli *et al.*, 2003. *Theriogenology* 59,599-616, Lonergan *et al.*, 2003, *Reproduction* 126,337-346. Lonergan *et al.*, 2004. *Biol Reprod* 71,1096-1100).

30 Los medios de cultivo empleados en los inicios de la medicina reproductiva eran los mismos que se utilizaban para el cultivo de células somáticas. Se trataba fundamentalmente de soluciones salinas básicas, que con el tiempo fueron evolucionando hacia composiciones cada vez más complejas. No fue hasta mediados de los años 80 que aparecieron los primeros medios de cultivo diseñados específicamente para el cultivo de embriones. Los medios convencionales no tenían en cuenta la naturaleza dinámica del metabolismo del embrión durante su desarrollo. A mediados de los 90, surgieron los denominados medios secuenciales, cada uno de ellos diseñado para cubrir las necesidades metabólicas y nutricionales del embrión en cada fase de desarrollo.

35 Los parámetros que afectan a los medios de cultivo, y especialmente a los medios de cultivo embrionario son fundamentalmente: parámetros biofísicos y elementos inorgánicos. Varios autores (Menezo & Khatchadourian 1991. *Assist Reprod Rev* 6,136-143) coinciden en que los parámetros biofísicos y los elementos inorgánicos más importantes a controlar en los medios de cultivo embrionario son los siguientes: Osmolaridad, pH, CO₂, O₂, sales minerales (fundamentalmente los niveles de sodio y de potasio así como de magnesio, calcio, bicarbonatos, sulfatos, y fosfatos). El agua es el componente que participa en mayor proporción en la formulación de cualquier medio de cultivo y su grado de pureza está fuertemente relacionado con el desarrollo embrionario (Marquant- Leguienne & Humblot 1998. *Theriogenology* 49,3-11). Actualmente, existe una gran cantidad de información, no siempre coincidente, referida al efecto de ciertas hormonas, factores de crecimiento y compuestos macromoleculares, sobre el desarrollo embrionario. Sin embargo, dos componentes son constantes en las formulaciones finales de los medios de cultivo utilizados corrientemente en la producción *in vitro* de embriones. Estos son la fuente de energía y fuente de proteína.

50 La fluidez de la membrana plasmática está controlada por la composición de sus ácidos grasos y por su contenido en esteroides. Sin embargo, con respecto a los lípidos, poco se sabe acerca de la importancia que tendrían en la producción de energía durante el desarrollo embrionario temprano (Thompson *et al.*, 2000. *Anim Reprod Sci* 60-61,263-275). Sin embargo, en los últimos años se ha debatido la posibilidad de mejorar la viabilidad de los embriones criopreservados a través de la adición de ciertos componentes lipídicos a los medios de cultivo, específicamente ácidos grasos poliinsaturados (como el ácido linoleico) no como fuente energética, sino como fluidificador de las membranas plasmáticas (Imai *et al.*, 1997. *Theriogenology* 47,347, Hochi *et al.*, 1999. *Theriogenology* 52, 497-504). Algunos estudios (Ryan *et al.*; 1992. *J Anim Sci* 70:3505-3513, Zeron *et al.*, 2001. *Reproduction* 121: 447-454), han evidenciado que no existe un efecto positivo de la suplementación grasa sobre la calidad de los embriones recuperados de novillas superovuladas con FSH, aunque también se ha mencionado que la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados puede alterar las propiedades físicas de la membrana plasmática del embrión permitiendo mejores condiciones para su desarrollo durante el periodo previo a la implantación.

65 Se ha encontrado que el desarrollo *in vitro* de ovocitos colectados de ovejas que no recibieron suplementación grasa era superior en invierno, cuando estos tenían 2.2 veces más ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática, que en el verano (Zeron *et al.*, 2001. *Reproduction* 121: 447-454). Otros estudios sugieren que la presencia de un doble enlace en la cadena de carbonos que forma los ácidos grasos puede tener

una influencia sobre las propiedades físicas de las membranas (Decker *et al.*, 1984. *J. Cell Biol* 99:1398-1404). Igualmente otros investigadores (Crowe *et al.*, 1989. *Cryobiology* 26: 76-84) sugieren que un incremento en la insaturación de los ácidos grasos en las membranas plasmáticas, está asociado con una alta fluidez de las membranas, facilitando el intercambio de nutrientes y metabolitos necesarios para el desarrollo del ovocito y del mismo embrión (Zeron *et al.*, 2001. *Reproduction* 121: 447-454). Los embriones producidos *in vitro* presentan una alta sensibilidad a los procesos de criopreservación (Leibo & Loskutoff 1993. *Theriogenology* 39: 81-94, Pollard & Leibo 1994. *Theriogenology* 41,107-112), siendo las diferencias morfológicas y/o metabólicas observadas respecto a los obtenidos *in vivo* las que parecerían ser las responsables (Massip *et al.*, 1995. *Hum Reprod* 10,3004-3011). Leibo y Loskutoff determinaron que la densidad de los embriones producidos *in vitro* es menor que la de los obtenidos *in vivo*, y concluyeron que esto se debería a una mayor relación de lípidos: proteínas en el caso de los primeros.

Actualmente no es posible cultivar los embriones de mamíferos en condiciones *in vitro* mucho más allá de la fase de blastocito avanzado (en los seres humanos hasta el día 8 o 9 días de desarrollo), sin perder su identidad como un embrión y su potencial en el desarrollo posterior para formar un feto, sin embargo, los embriones o células embrionarias cultivadas durante largos períodos de tiempo *in vitro* tienen la capacidad de dividirse y crecer como poblaciones celulares de manera indefinida (Hogan *et al.*, 1994. *Science*. 303:1669-1674; Fléchon *et al.*, 1995. *Placenta*. 16: 643-658; van Stekelenburg- Hamers *et al.*, 1995. Tanaka *et al.*, 1998. *Science*. 282: 2072-2075. Talbot *et al.*, 2000. *Biol Reprod*. 62: 235-247; Leoni *et al.*, 2000. *J Reprod Fertil* 119: 309-314; Shimada *et al.*, 2001. *Placenta* 22: 652-662).

Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito una composición ni unos componentes concretos que aumente la fluidez de la membrana plasmática del embrión y/o células, permitiendo mejores condiciones para su desarrollo durante el periodo previo a la implantación, y que mejore la viabilidad de los embriones y/o células criopreservados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El autor de la presente invención ha desarrollado una composición útil para el desarrollo celular y embrionario previo a la implantación, que mejora la viabilidad de los embriones y de las células, y que también favorece la criopreservación de células y embriones, mejorando el desarrollo embrionario hasta estadios tardíos (blastocisto).

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición que soluciona los problemas asociados a la criopreservación de células y embriones, y mejorar las condiciones de desarrollo previo a la implantación.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se relaciona con una composición que comprende ácido linoleico (LA) y ácido docosahexaenoico (DHA).

El ácido linoleico es un ácido graso esencial para el organismo humano, lo cual quiere decir que el organismo no puede sintetizarlo y tiene que ser ingerido por la dieta. Es un ácido graso poliinsaturado, con dos dobles enlaces. $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$. Al ácido linoleico y a sus derivados se les conoce como ácidos grasos omega 6 ya que el primer doble enlace a contar desde el carbono omega, es decir el que lleva el grupo metilo (-CH₃), está en posición 6. Los ácidos grasos omega 6 se encuentran en diversos aceites vegetales, tales como el de girasol o el de soya, en los huevos y en las aves de corral.

El ácido docosahexaenoico (DHA) es un ácido graso esencial poliinsaturado de la serie omega-3. Químicamente es, como todos los ácidos grasos, un ácido carboxílico. DHA es una abreviatura que proviene de su nombre en inglés (docosa-hexaenoic-acid). Es un ácido graso vital para el desarrollo y mantenimiento óptimo de la salud. Se encuentra en el aceite de pescado y en algunas algas.

Es posible metabolizar DHA a través de la conversión en el organismo del ácido alfa-linolénico (ALA), otro ácido graso omega-3, pero el grado de conversión es reducido, por lo que es difícil obtener a través de la conversión del ALA la cantidad recomendada de 220 mg diarios de DHA.

Podemos encontrarlo en peces de agua fría (como el salmón, el arenque o la anchoa) y según estudios recientes por médicos y científicos de Europa, en un atún de calidad especial, en el aceite de hígado de bacalao y en algunas microalgas (algas microscópicas). Estas últimas son la fuente de DHA de los peces.

El ácido linoleico (LA) y ácido docosahexaenoico (DHA) se encuentran en los rangos que van de 0,03 mM a 0,1 mM, dependiendo de la concentración del medio de cultivo, quedando con respecto a éste en aproximadamente las siguientes concentraciones (Tabla 1):

Tabla 1. Concentraciones aproximadas de DHA y LA en función de la concentración del medio de cultivo.

mg/mL de medio de cultivo		
DHA	9,855	0,03 mM
	16,424	0,05 mM
	32,848	0,1 mM
LA	9,073	0,03 mM
	15,121	0,05 mM
	30,243	0,1 mM

5 Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención el ácido linoleico (LA) se encuentra en una concentración de entre 0,02 y 0,12 mM, y más preferentemente, de entre 0,03 y 0,1 mM

10 En una realización preferida de este aspecto de la invención el ácido docosahexaenoico (DHA) se encuentra en una concentración de entre 0,02 y 0,12 mM, y más preferentemente, de entre 0,03 y 0,1 mM

La suplementación con ácidos grasos aumenta la vulnerabilidad por la peroxidación de los ácidos y también de las células. Para ello se debe añadir un antioxidante.

15 Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto, la composición de la invención además comprende un antioxidante. Mas preferentemente, el antioxidante se selecciona de la lista que consiste en: cisteína, ácido cítrico, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona, glutatión, MnSO₄, selenio, hialurona, o cualquiera de sus sales y combinaciones.

20 La hialurona se añadirá según la concentración del ácido graso, aproximadamente en los rangos de la Tabla 2:

Tabla 2. Rangos aproximados de hialurona (en mg/ml), según la concentración de los ácidos grasos.

	concentración de ácido graso	Hialurona (mg)
DHA	0,03 mM	0,10-0,20
	0,05 mM	0,25-0,30
	0,1 mM	0,35-0,40
LA	0,03 mM	0,10-0,20
	0,05 mM	0,25-0,30
	0,1 mM	0,35-0,40

25 Por tanto, en otra realización preferida, la hialurona se encontrará en un rango de entre aproximadamente 0,08 a 0,50, y más preferentemente, en un rango de entre aproximadamente 0,10 y 0,40.

30 La hialurona presenta una actividad antioxidante de tal forma que protegen a embriones y células de los daños producidos por los radicales libres de oxígeno. Para producir embriones/células de buena calidad, se debe reducir el daño oxidativo causado por estos radicales. La primera consecuencia de los mencionados radicales es la fragmentación del DNA, lo cual produce la mortalidad embrionaria y en algunos casos tumores infantiles. La hialurona (HA) es un polisacárido simple con complejas funciones biológicas. Contrariamente a otros glucosaminoglucanos que son sintetizados por el aparato de Golgi citoplásmico, la HA es sintetizada por la membrana interna de las membranas celulares. Esto muestra que la interacción entre los fosfolípidos y la HA comienza muy tempranamente durante el desarrollo y resulta crucial para el funcionamiento y desarrollo normal de las membranas celulares de los mamíferos. El hecho de que la HA este presente intracelularmente en los momentos claves para la proliferación y migración celular indica que la HA es un componente clave para la regulación intracelular de estos procesos. Además la HA es un antioxidante muy efectivo y si se usa con material de origen biológico como la yema de huevo o la albúmina del suero bovino (BSA) puede prevenir muy eficazmente contra la contaminación por virus de muestras congeladas, así es el caso de la enfermedad de New Castle (transmitida por la yema de huevo) o de otros patógenos que podrían estar presentes en las muestras.

45 La hialurona se utiliza para mejorar las condiciones de cultivo *in vitro*, como por ejemplo en el caso de embriones de cerdo cultivados en medio NCSU-23. Similares resultados han sido obtenidos con ovocitos de ratón y con embriones de vaca.

50 También se ha demostrado que la suplementación del medio con fosfolípidos y/o ácidos grasos insaturados acelera la respuesta acrosomal de los espermatozoides humanos. Cuando se añade al cultivo *in vitro*, por ejemplo de embriones de vaca en sustitución del suero fetal, se producen embriones de alta calidad, que

soportan perfectamente los procesos de congelación y descongelación, eliminando los riesgos que comporta la utilización de suero fetal.

5 Por tanto, en otra realización preferida de este aspecto, la composición de la invención además comprende fosfolípidos. Más preferentemente además comprende ácidos grasos insaturados.

10 En otra realización preferida de este aspecto, la composición de la invención además comprende carbohidratos, especialmente del tipo de los presente en las trompas y útero, y aminoácidos esenciales para la división y no esenciales. Preferentemente, también posee EDTA para secuestrar los cationes divalentes tóxicos y
 15 contrarrestar la actividad glicolítica del embrión. Más preferentemente, la composición de la invención además comprende: adenina, alanina, arginina, asparagina, acetato de sodio, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido fólico, ácido málico, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio, cloruro de calcio, colesterol, cloruro de colina, cloruro de potasio, cistina, cisteína, citosina, D-biotina, EDTA, etanolamina, fenilalanina, fosfato de sodio, fosfato de potasio, glicina, glucosa, glutamina, guanina, histidina, hipotaurina, inositol, isoleucina, lactato cálcico, leucina, lisina, metionina, N-acetil glutamina, niacinamida, prolina, pantotenato de calcio, piridoxina, piruvato sódico, riboflavina, serina, sulfato de gentamicina, SSR® (suero reemplazo sintético), solución de albúmina humana, sulfato de magnesio, taurina, tiamina, treonina, timina, triptófano, tirosina, uracilo, valina.

20 Otros requerimientos de cultivo son la temperatura, el pH, dióxido de carbono y tensión de oxígeno, osmolaridad y humedad relativa. La osmolaridad óptima en medios de cultivo de embriones humanos está en el rango de 275 a 285 mOsm. El pH del medio de cultivo debe estar entre 7,2 y 7,4, mientras que en los medios de fecundación, se recomienda ligeramente superior (7,6-7,8). Las condiciones habituales de las distintas etapas de cultivo de
 25 embriones son 5-6% de CO₂ y 95% de aire. El dióxido de carbono resulta necesario para la regulación del pH intracelular. La temperatura tanto para fertilización de ovocitos, como para desarrollo embrionario, es de 37°C. Estas condiciones de cultivo son conocidas por el experto en la materia, y variarán en función de la especie a la que pertenezca el embrión, así como de las distintas finalidades.

Uno de los aspectos para asegurar el éxito de los programas de FIV tiene que ver con los componentes químicos y la calidad con la que se preparan, independientemente de la formulación de los medios de cultivo. Valores altos
 30 de conductividad (medidos en µS/cm) reflejan un alto grado de contaminación iónica. La conductividad eléctrica del medio, así como la de cualquier fluido acuoso, depende del contenido en iones disueltos. Los rangos a 25°C para los medios de cultivo en Reproducción Asistida, no deben de superar el valor de 400 µS/cm (300-400 µS/cm), aunque como bien se expresó anteriormente dependerá de la concentración de iones disueltos (aniones y cationes).

35 Concentración de sales:

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la concentración de sales se encuentra
 40 aproximadamente entre los rangos recogidos en la Tabla 3:

Tabla 3. Rangos de concentración de sales.

SALES	mM	g/L
NaCL	101-137	5.9-8.0
KCL	4.69-5.30	0.35-0.40
MgSO4	0.20-0.80	0.022-0.97
KH2PO4	0.34-0.37	0.04-0.05
CaCL2 2H2O	1.8-2.04	0.27-0.30
NaHCO3	24-25	2.0-2.1
MgCL2 2H2O	0.48-0.49	0.08-0.10

45 En otro aspecto, la composición de la invención además comprende un principio activo. Dicho principio activo puede tener un efecto terapéutico o de diagnóstico aplicado, por ejemplo, al embrión. Dicho o dichos principios activos, tienen un objetivo terapéutico o de diagnóstico que se aplican al embrión y que le son útiles, junto con los demás componentes de la invención, constituyen una composición farmacéutica, de ahora en adelante
 50 composición farmacéutica de la invención.

En una realización preferida de este aspecto, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Las composiciones de la invención podrían emplearse como medios de cultivo para células o embriones, o podrían emplearse como un suplemento que se adiciona a otros medios de cultivo válidos para el cultivo de células o embriones. Así, medios de cultivo estándar podrían ser, pero sin limitarnos, Universal IVF Medium (Origio nº 10301010, medio para fertilización y desarrollo embrionario hasta estadio de 2 a 8 células); ISM1™

(Origio nº 11500010, medio para desarrollo embrionario hasta estadio de 2 a 8 células); BlastAssist® (Origio nº 12150010, medio para desarrollo embrionario hasta estadio de 4 a ocho células e incluso estadio de blastocisto).

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de cultivo que comprende la composición de la invención.

5

USO DE LAS COMPOSICIONES Y DEL MEDIO DE CULTIVO DE LA INVENCION

La fluidez de la membrana plasmática está controlada por la composición de sus ácidos grasos y por su contenido en esteroides. Las composiciones de la invención aumentan la fluidez de dicha membrana en el embrión o en las células, pudiendo emplearse para suplementar medios de cultivo ya establecidos, para su uso en el cultivo de células y embriones, y en particular, para el cultivo de células y embriones previamente criopreservados. Es decir, podría suplementar tanto a los medios de cultivo tempranos (medios de maduración ovocitaria), así como a los medios de cultivo embrionario (medio de desarrollo celular hasta 2-4 células o medio de desarrollo celular hasta blastocisto).

15

Las composiciones y el medio de cultivo de la invención, aumentan las tasas de éxito de implantación de embriones para la fertilización *in vitro*, lo que puede ser usado en animales, incluyendo mamíferos, y preferentemente, pudiendo ser mamíferos humanos o no humanos.

20

Por tanto, otro aspecto se refiere al uso de la composición o de la composición farmacéutica de la invención, o al medio de cultivo de la invención, para el cultivo de células o embriones.

Preferentemente, las células son células madre. En otra realización preferida son células madre pluripotentes. En otra realización preferida, las células son ovocitos. Más preferiblemente son células de mamífero.

25

Por tanto, la composición, la composición farmacéutica de la invención, o el medio de cultivo de la invención, puede emplearse para el desarrollo preimplantacional del embrión. El medio de cultivo cumple un rol fundamental para el desarrollo preimplantación de embriones para que sean viables y puedan ser transferidos. Así, por ejemplo, se ha determinado que el cocultivo embrionario bovino con células somáticas, tales como células de la granulosa, vesículas trofoblásticas y, principalmente, células del epitelio oviductal bovino (BOEC), mejorarían el proceso.

30

Únicamente y en el caso particular de no utilizar embriones humanos o células pluripotentes con fines industriales o comerciales en el entorno de la Unión Europea, aún más preferiblemente, las células y/o los embriones son células de mamífero no humano o embriones no humanos. Así, las composiciones y el medio de cultivo de la invención se emplearán para la reproducción asistida en animales, como por ejemplo, pero sin limitarnos, en bovinos.

35

Sin embargo, en el caso particular de que el cultivo de las células tenga una finalidad terapéutica o de diagnóstico para el propio embrión, las células y/o los embriones son de mamífero humano. Así, por ejemplo, la composición, la composición farmacéutica de la invención, o el medio de cultivo de la invención puede emplearse en el diagnóstico genético preimplantacional.

40

Por tanto, otro aspecto se refiere al uso de la composición, la composición farmacéutica de la invención, al medio de cultivo de la invención, en la elaboración de un medicamento, o alternativamente, a la composición, la composición farmacéutica de la invención, al medio de cultivo de la invención, para su uso como medicamento.

45

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición, la composición farmacéutica de la invención, o el medio de cultivo de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad embrionaria, o alternativamente, a la composición, la composición farmacéutica de la invención, o al medio de cultivo de la invención para su uso en el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad embrionaria. Más preferiblemente, se refiere al uso de la composición, la composición farmacéutica de la invención, el medio de cultivo de la invención, en la elaboración de un medicamento para el diagnóstico genético preimplantacional, o alternativamente a la composición, la composición farmacéutica de la invención, el medio de cultivo de la invención, para su uso en el diagnóstico genético preimplantacional.

50

55

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a la composición, composición farmacéutica o medio de cultivo de la invención, que tiene un objetivo terapéutico o de diagnóstico que se aplican al embrión y que le son útiles.

60

Las células madre pluripotentes son células indiferenciadas, inmaduras y con capacidad de autorrenovación capaces de diferenciarse a células que constituyen tejidos derivados de cualquiera de las tres capas embrionarias, el ectodermo, el endodermo y el mesodermo, que darán lugar a los tejidos y estructuras conocidas en los animales superiores.

65

5 Estas células se pueden obtener bien de una célula somática adulta sobre la cual se induce la expresión de ciertos genes con la finalidad de generar un tipo de célula madre con características pluripotenciales (CMP inducidas, iPS) o aislándolas de la masa celular interna de un embrión en estado de blastocisto, es decir, de una semana o de 5 días (células madre embrionarias, ESC), para crear líneas celulares cultivadas *in vitro*, que podrán suministrar grandes cantidades de células.

10 En otra realización preferida de la invención, las células madre pluripotentes se han obtenido a partir de cigotos triploides no viables. En otra realización preferida de la invención, las células madre pluripotentes se han obtenido mediante transferencia nuclear alterada (Meissner & Jaenisch, Nature 439, 212-215, 2006). En otra realización preferida, las células madre pluripotentes se han obtenido mediante la biopsia de una sola célula de un embrión ((Chung et al., Nature 439, 216-9, 2006).

15 La recuperación de oocitos inmaduros junto con la maduración *in vitro*, la fertilización y el cultivo posterior es un procedimiento ampliamente empleado en los procedimientos de fecundación *in vitro*. El éxito de la fecundación *in vitro* requiere tanto la preparación adecuada tanto del espermatozoide como del ovocito, así como unas condiciones de cultivo que sean favorables para la actividad productiva de ambos gametos. Así, en otra realización preferida, la célula es un oocito u ovocito.

20 Los mamíferos pertenecen al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Craniata*, Clase *Mammalia*.

25 Los organismos de la especie *Homo sapiens* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, (grupo *Metazoa/Fungi*), Reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, Subphylum *Craniata*, Clase *Mammalia*, Orden *Primates*, Familia *Hominidae* y Género *Homo*.

30 En otra realización preferida, pero no limitante, las células son de mamífero, como por ejemplo, primates, ovinos, caprinos, porcinos, bovinos, equinos. Sin embargo, la presente invención también es de aplicación en otras especies, como por ejemplo, pero sin limitarnos, en peces óseos u osteictios (*Osteichthye*), como por ejemplo los peces del orden *Salmoniformes*.

El hombre es un mamífero humano que pertenece a la especie *Homo sapiens*.

35 En esta memoria, el término célula incluye también a los ovocitos u oocitos. El término "ovocito u oocito" se refiere a una célula germinal femenina que está en proceso de convertirse en un óvulo maduro.

40 La composición, la composición farmacéutica o el medio de cultivo de la invención favorece el adecuado desarrollo preimplantacional del embrión durante el período de vida libre, evitando problemas como un retardo en la implantación y la muerte del embrión. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención, de la composición farmacéutica de la invención, o de un medio de cultivo de la invención, para el cultivo de embriones. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los embriones son humanos. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los embriones no son humanos.

45 La criopreservación es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas.

50 Uno de los principales problemas de la criopreservación es la formación de cristales de hielo durante la congelación del agua. Estos cristales se forman tanto fuera como dentro de la célula y son los cristales intracelulares los que comportándose como cuchillas cortan las estructuras internas de la célula, especialmente las membranas.

55 Tanto las células, incluyendo los ovocitos, como los embriones pueden ser sometidos a un proceso de criopreservación. Así, preferentemente, las células o embriones han sido previamente criopreservados.

60 Los ovocitos es el material más sensible a la criopreservación. Este hecho se debe probablemente a que su placa metafásica es muy sensible. Los ovocitos sobreviven poco y mal a la congelación, siendo la tasa de gestación por ciclo de descongelación sólo del 10%.

Por tanto, en otra realización preferida las células o embriones han sido previamente sometidos a un proceso de vitrificación.

65 El término "embrión" como se usa en el contexto de la presente invención está destinado a incluir en su ámbito de aplicación de las diversas etapas de desarrollo del embrión, incluyendo la fase de blastocisto como así como

la fase de mórula anterior. En ocasiones en todo el texto los términos "embrión" y "blastocisto" se utilizan indistintamente, pero a partir de la descripción proporcionada será evidente para los expertos en la técnica lo que se entiende por estos términos y su alcance.

5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la expansión de células madre. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para el mantenimiento de las células madre en forma indiferenciada.

10 El término "cuerpo embrionario" hace referencia a los agregados derivados de células madre pluripotentes en proceso de diferenciación. El cultivo de estos cuerpos embrionarios bajo diferentes condiciones da lugar a los diversos tipos de células indiferenciadas. La formación de estos cuerpos embrionarios se realiza por cualquier técnica descrita en el estado de la técnica y que conoce el experto en la materia.

15 Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para el cultivo de cuerpos embrionarios.

20 A menos que el contexto requiera otra cosa claramente, a lo largo la descripción y las reivindicaciones, las palabras 'comprenden', 'comprende', y similares, se han de interpretar en un sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo o exhaustiva; es decir, en el sentido de "incluye, pero no limita a".

25 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 **Figura 1: (A), (B) y (C).** Ovocitos con membranas intactas tras desvitrificación y cultivo en medios suplementados con la composición de la presente invención.

35 **Figura 2: (A), (B) y (C).** Ovocitos con membranas con pérdida de fluidez y presencia de rotura o inclusiones citoplasmáticas anómalas (Figura 2B), tras desvitrificación y cultivo en medio no suplementado con la composición de la invención.

EJEMPLOS

40 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por el inventor, que ponen de manifiesto la efectividad de la composición de la invención.

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

45 Los ejemplos que se describen a continuación, ilustran las formas particulares de realización de la presente invención, y no se pretende en absoluto con ello limitar el alcance de protección de la misma.

Ejemplo 1: Producción de embriones en estadio 2-8 células suplementando el medio de fertilización/cultivo (Universal IVF, Origio) con DHA y hialurona.

Obtención de ovocitos

50 Tras estimulación ovárica, por protocolo de análogo largo (de 9 a 12 días de estimulación), se realiza punción y aspiración folicular (aquellos con un tamaño adecuado entre 16 a 18mm de diámetro), los CCOs (complejos cumulus-ovocito) una vez localizados (citoplasma granulado uniforme) y se lavaron con HEPES/MOPS y se seleccionan para la maduración o para el análisis de lípidos.

Cultivo *in vitro*

60 Los CCOs seleccionadas fueron madurados en IVF Universal (Origio, ref. 10300060), este medio fue suplementado con 100 µM de DHA (Matreya, PA, EE.UU., ref. 001136, Pereira et al. 2007) y con 0,5 mg/mL de hialurona (Sigma-Aldrich, ref. S9825 Select-HA™ Hyaluronan) o sin suplemento lipídico (control). La maduración se llevó a cabo en una incubadora de 2 a 4 h. Tras maduración, los CCOs por tratamiento químico (acción de la Hialurinasasa, SynVitro® Hyadase, Origio ref. 15115001), y posteriormente físico, se desnuda el ovocito observándose la presencia del corpúsculo polar, característica del ovocito en Metafase II. La inseminación de los ovocitos se realizó mediante la técnica de microinyección de espermatozoides intracitoplasmática (ICSI) con semen fresco de la pareja recogido en el mismo día. Tras inseminación, el presunto cigoto se cultiva en 50µL del medio de fertilización, que se trata del denominado ISM1™ (Origio, ref. 11500010) que fue suplementado con

100 μM de DHA (Matreya, PA, EE.UU., ref. 001136, Pereira et al. 2007) y con 0,5 mg/mL de hialurona (Sigma-Aldrich, ref. S9825 Select-HA™ Hyaluronan) o sin suplemento (control). En el medio de fertilización se mantiene hasta que el embrión tiene de 6-8 células. Las condiciones atmosféricas para la maduración de los ovocitos, la fecundación y el embrión de co-cultivo fueron 37,0 ° C y 6% CO₂ en el aire con la atmósfera húmeda.

5

Evaluación embrionaria

Los signos de fecundación se evaluó 18 horas después de la inseminación (FIV = día 1), presencia o no de 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares (2 PN y 2 CP). El día 2, los preembriones son evaluados en términos de desarrollo y estado morfológico, basado en los criterios de Lindner y Wright (1983), como siguiente: grado 1 = muy buena calidad, sin defectos; grado 2 = buena calidad, con sólo las imperfecciones trivial, con muy pocos blastómeros extruidos; grado 3 = regular calidad, con algunas células extruidas o degeneradas, el aspecto más oscuro; grado 4 = pobre calidad, falta de cohesión o con muchas células degeneradas. El porcentaje de preembriones fue del grado 1 del 35% y del grado 2 del 43%, siendo solo del grado 3 del 22%, de grado 4 no se obtuvieron preembriones. Si lo comparamos con el control, se observa que del grado 1 se obtuvo un 19%, de grado 2 un 26%, de grado 3 un 34% y de grado 4 un 22%.

10

15

Lípidos de extracción y análisis de los ácidos grasos

Para la extracción de lípidos, células del cumulus fueron retirados de los ovocitos antes y después de la maduración por agitación hasta 10 min. Después de agitación, los ovocitos desnudados y cúmulos. Las células fueron lavadas tres veces con el 1% de sodio citrato. La concentración celular se determinó mediante un hemocitómetro cámara después de la tinción de células del cumulus con Tripán azul (0,4%, w / v). Después de conteo de células del cumulus, muestras de ovocitos inmaduros o maduros y sus cúmulos células en suspensión, así como los medios de cultivo utilizados para la FIV se analizaron posteriormente. En cada procedimiento, las muestras frescas (75-150 ovocitos inmaduros; 75-150 ovocitos maduros del control; 75-150 DHA ovocitos maduros; de 0,1 a 2,5 x 10⁵ cúmulos inmaduros; de 1,5 a 10 x 10⁵ cúmulos maduros control; 2,2 a 6,5 10 x 10⁵ DHA cúmulos maduros; 500 μL de medio de cultivo antes de la maduración de los ovocitos, 500 μL de medio de cultivo después de la maduración de los ovocitos con DHA) se homogeneizaron inmediatamente en tubos que contienen 15 mL de cloroformo: metanol (2: 1, v / v) y 4 μg del estándar interno (ácido nonadecanoico, C19:0, Sigma, ref N5252.). Los lípidos totales fueron extraídos según lo descrito por Folch et al. (1957). Además, los lípidos totales se extrajeron del mismo modo a partir de alícuotas (500 μL) de ovocitos y células del cumulus (1% solución de citrato de sodio). Después de la extracción de lípidos, FA ésteres metílicos (FAME) se preparado por metilación con 1% de ácido sulfúrico en metanol (Christie 2003). El disolvente se eliminó en atmósfera de nitrógeno y el residuo final se disolvió en 100 μL n-hexano (grado GC> 99%). Las muestras fueron analizadas inmediatamente por duplicado. La FAME resultantes fueron inyectados (2 μL), mediante un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (Avondale, PA, EE.UU.), HP 6890 Series, con columna de 30 metros de longitud y de diámetro interno de 0,25 mm y la columna capilar con 0,25 μm de espesor (Omegawax 250; Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU.). La inyección se realizó con una temperatura programada y un método split-less. Los picos se identificaron comparando con los del FAME estándar (Sigma, y Matreya Supelco 37 componet Mix) y posteriormente se calcularon las cantidades de cada uno de FA (cálculo realizado por referencia a la norma interna). Además, la identificación de un pico desconocido, así como la confirmación del FAME, fueron realizadas por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un Varian Saturn 2200 del sistema (Varian Inc., Nogal Creek, CA, EE.UU.) equipado con un CP-Sil 88 capilar columna.

20

25

30

35

40

45

El contenido en FA no difirió en ovocitos y células del cumulus, independientemente del tratamiento. Además, la concentración de FA total en ovocitos inmaduros y en ovocitos maduros suplementado o no con DHA no fueron diferentes ($p > 0,05$). Independientemente de los tratamientos, la concentración de FA saturados (SFA) fue alta ($p = 0,05$) tanto en las células del cumulus como en los ovocitos. Por el contrario, ácido grasos poliinsaturados (PUFAs), el contenido era más abundante ($p = 0,02$) en ovocitos que en las células del cumulus, independientemente de los tratamientos. Un total de 16 diferentes FA se detectó en el COCs al extraer los lípidos, pero sólo cuatro de estos constituían más del 5% (w / w) del total contenido de ácidos grasos. En tanto los ovocitos y células del cumulus, ácido palmítico (C16: 0) fue la más abundante, seguido de por el ácido oleico (C18: 1n-9) y el ácido esteárico (C18: 0). El ácido linoleico (C18: 2n-6) fue el cuarto más abundante FA en ambos tipos celulares. Al igual que en los ovocitos y células del cumulus, los cuatro FA más abundante en los medios de cultivo de FIV, fueron C16: 0, C18: 1n-9 y C18: 2n-6, pero en diferente orden de abundancia. A diferencia de los ovocitos y los cúmulos celulares, el 18:2 n-6 fue el ácido graso más abundante en el medio FIV medios de cultivo que contribuye a la elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados (que van de 33,1 a 40,8%). El C16: 0 fue el segundo más abundante seguido por el C18: 0 y C18: 1n-9.

50

55

60

En conclusión, la presencia de DHA durante la maduración, interfiere en el metabolismo lipídico y mejora la competencia de los ovocitos, generando embriones de una mayor calidad.

65

Ejemplo 2: Sustitución del suero fetal de origen animal por LA en el medio de cultivo y vitrificación de preembriones .

Tras estimulación ovárica de la paciente, por protocolo de análogo largo (de 9 a 12 días de estimulación), se realiza punción y aspiración folicular (aquellos con un tamaño adecuado entre 16 a 18mm de diámetro), los CCOs (complejos cumulus-ovocito) una vez localizados (citoplasma granulado uniforme) y se lavaron con HEPES/MOPS, suplementado con 100 μ M de LA y 0,5 mg/L de hialurona. Se siguió el mismo protocolo que en el ejemplo 1, para obtener preembriones con 4-8 células (D+3) con medio suplementado con LA/hialurona y sin suplemento lipídico (control).

En este segundo experimento, embriones en día 3 de desarrollo, se vitrifican para estudiar su criotolerancia. En primer lugar, los embriones se mantienen a temperatura de 22° C durante 1 hora en el medio conteniendo LA/hialurona o medio sin suplemento lipídico (control). Posteriormente, los preembriones se vitrifican siguiendo el protocolo estandarizado de MediCult Vitrification Cooling (Origio, ref. 1218400). Finalmente, los embriones se disponen en el soporte de vitrificación McGill Cryoleaf™ Open System for Vitrification (Origio, ref. 40771401) y se trasfiere a los tanques de almacenamiento a -196°C hasta el momento de la desvitrificación. La desvitrificación se realiza siguiendo el protocolo estandarizado MediCult Vitrification Warming (Origio, ref. 12195002), y posteriormente se cuantifica el porcentaje de supervivencia pos-desvitrificación y posterior desarrollo *in vitro*.

Tabla 4. Recuperación de embriones con PBS conteniendo LA/hialurona y sin suplemento lipídico (control).

Tratamiento	Nº pacientes	Nº total de CL	Nº total de preembriones	Porcentaje de recogida (%)
PBS + LA	10	190	104	54.7
PBS + control	10	219	117	53.4

Tabla 5. Desarrollo de preembriones de Día 3 en medio ISM1 (Origio) suplementado con LA/hialurona y control.

Tratamiento	Nº de preembriones	Nº preembriones vivos 48 h (%)	Preembriones evolutivos 72 h (%)
ISM1 + LA	37	36/37 (97.3)	19/36 (52.8)
ISM1	41	32/41 (78.1)	14/32 (43.8)

Tabla 6. Supervivencia y desarrollo de embriones cultivados y vitrificados en medio conteniendo LA/hialurona o sin suplemento lipídico.

Tratamiento	Nº embriones recuperados/congelados	Nº embriones vivos 48 h (%)	Preembriones evolutivos 72 h (%)
ISM1+LA	25/28	23/25 (92.0)	12/23 (52.2)
ISM1	26/32	21/26 (80.8%)	10/21 (47.6)

REIVINDICACIONES

5 1. - Una composición que comprende hialurona en un rango de concentración de 0,1 a 0,4 mg/mL y un ácido graso esencial poliinsaturado que se selecciona de entre ácido linoleico (LA) en una concentración de entre 0,03 mM y 0,1 mM y ácido docosahexaenoico (DHA) en una concentración de entre 0,03 mM y 0,1 mM.

10 2.- La composición según la reivindicación anterior, que además comprende las sales en un rango aproximado de concentración que se recoge en la tabla siguiente:

SALES	mM	g/L
NaCL	101-137	5.9-8.0
KCL	4.69-5.30	0.35-0.40
MgSO4	0.20-0.80	0.022-0.97
KH2PO4	0.34-0.37	0.04-0.05
CaCL2 2H2O	1.8-2.04	0.27-0.30
NaHCO3	24-25	2.0-2.1
MgCL2 2H2O	0.48-0.49	0.08-0.10

15 3.- Una composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.

4.- La composición farmacéutica según la reivindicación 3, que además comprende otro principio activo.

20 5.- Un medio de cultivo que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, o una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4.

6.- Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o de un medio de cultivo según la reivindicación 5, en la elaboración de un medicamento.

25 7.- Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o de un medio de cultivo según la reivindicación 5, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o el diagnóstico de una enfermedad embrionaria.

30 8.- Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o de un medio de cultivo según la reivindicación 5, en la elaboración de un medicamento para el diagnóstico genético preimplantacional.

35 9.- Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o de un medio de cultivo según la reivindicación 5, para el cultivo de células.

10.- Uso de la composición, de la composición farmacéutica, o de un medio de cultivo según la reivindicación anterior, donde las células son células madre.

40 11.- Uso de la composición, de la composición farmacéutica, o de un medio de cultivo según la reivindicación 10, donde las células madre son células madre embrionarias no humanas.

45 12.- Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o de un medio de cultivo según la reivindicación 5, para el cultivo de embriones.

50 13.- Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, o de un medio de cultivo según la reivindicación 5, para el cultivo de embriones no humanos.

14.- Uso de la composición, de la composición farmacéutica, o de un medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, donde las células o embriones han sido previamente criopreservados.

55 15.- Uso de la composición, de la composición farmacéutica, o de un medio de cultivo según cualquiera de las reivindicaciones 9-13, donde las células o embriones han sido previamente vitrificados.



A

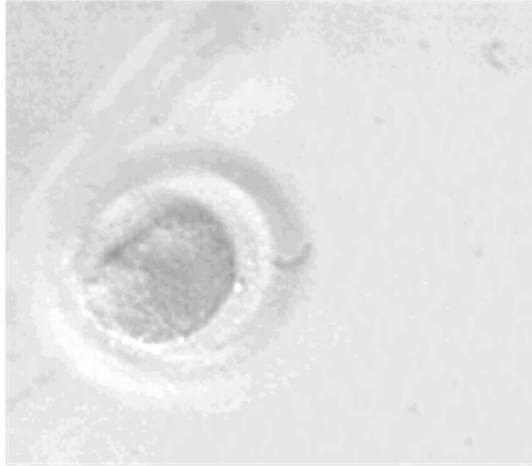


B



C

Fig.1



A



B



C

Fig. 2