

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 833**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

C08K 5/00 (2006.01)

C08L 101/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2012 PCT/JP2012/068212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO2013018545**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2012 E 12819778 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2740790**

54 Título: **Composición para el cultivo de embriones**

30 Prioridad:

03.08.2011 JP 2011169910

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

26.05.2017

73 Titular/es:

**FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
(100.0%)
7-10 Doshomachi 1-chome Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 541-0045, JP**

72 Inventor/es:

**YAO, TATSUMA;
ASAYAMA, YUTA y
MATSUHISA, AKIO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 613 833 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

Composición para el cultivo de embriones

5 **Campo técnico**

La presente invención se relaciona con una composición para el cultivo de embriones según definen las reivindicaciones.

10 **Técnica anterior**

La fertilización *in vitro*, el cultivo de embriones y el trasplante de embriones y similares son técnicas importantes en un amplio rango de campos, tales como la mejora y la producción de animales de alto valor económico, la medicina regenerativa y la medicina reproductiva. En la fertilización *in vitro* y el cultivo de embriones, se tratan gametos o embriones *in vitro*. Hasta ahora, se han desarrollado diversos medios para el cultivo de embriones, tales como los medios de cultivo secuencial, que están hechos para imitar los cambios en el ambiente de los fluidos corporales periféricos durante el desarrollo embrionario, medios de suero que están suplementados con suero y medios simples libres de suero denominados "medio simple", que pueden ser fácilmente tratados. Cuando se usa un medio simple, el cambio de medio según la fase de desarrollo de los embriones como medio de cultivo secuencial no es necesario. Cuando se usa un medio libre de suero, se pueden reducir los riesgos que aparecen en los medios de suero, tales como la variación de la calidad y la contaminación vírica debido a productos derivados de organismos.

Como medio simple libre de suero, se conoce el medio KSOM (Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(36): 14289-14293, y Manipulating the Mouse Embryo, Tercera Edición 2005; 149-193). En embriones cultivados en el medio KSOM, el número de células en blastocistos aumenta en comparación con el de los embriones cultivados en un medio anterior a la aparición del KSOM (Fertil Steril 2006; 86: 1252-1265); sin embargo, el número no alcanza el número de células en blastocistos que se desarrollan *in vivo* (Biol Reprod 1994; 50: 1027-1033, y Reproduction 2009; 137: 271-283).

Se sabe que los aminoácidos actúan como precursores biosintéticos, fuentes de energía, osmolitos orgánicos, sustancias tamponizantes del pH intracelular, antioxidantes, quelantes y similares, y la adición de aminoácidos a medios para el cultivo de embriones actúa de manera eficaz sobre el desarrollo embrionario (Semin Reprod Med 2000; 18(2): 205-218). El medio KSOM era un medio que contenía sólo glutamina como aminoácido. Se ha revelado, sin embargo, que el índice de desarrollo de los blastocistos, el índice de eclosión y el número de células en los blastocistos mejoran gracias a la adición de 20 tipos de aminoácidos al medio KSOM (Mol Reprod Dev 1995; 41(2): 232-238).

Cuando se desarrolla un medio para cultivar embriones humanos preimplantación, se recomiendan las investigaciones que utilizan embriones de ratón (Human Reproduction 1998; 13(4): 173-183, y Human Reproduction Update 2003; 9(6): 557-582). El medio KSOM o el medio KSOMaa al que se añaden 20 tipos de aminoácidos ha sido investigado usando embriones de ratón (Biol Reprod 1994; 50: 1027-1033, y Mol Reprod Dev 1995; 41(2): 232-238). Se ha verificado, sin embargo, que los medios son adecuados para cultivar no sólo embriones humanos, sino también diversos embriones animales, tales como bóvidos, conejo, mono rhesus, cerdo y rata, y actualmente los medios son ampliamente utilizados.

45 **Divulgación**

Problemas que hay que resolver

El efecto de cada componente en un medio de cultivo depende de las concentraciones de otros componentes (Human Reproduction Update 2003; 9(6): 557-582), y por ello se requiere un gran número de exámenes para establecer las concentraciones adecuadas para el desarrollo embrionario combinando individualmente 20 tipos de aminoácidos. Además, en la investigación de embriones en la fase de preimplantación, dicho análisis amplio ha resultado difícil debido a la escasez de muestras.

Por ello, la mayoría de las concentraciones de aminoácidos añadidos a un medio de cultivo de embriones, tal como el medio KSOMaa, son concentraciones que se han decidido usando la capacidad de proliferación de las células somáticas como índice y no están optimizadas para el desarrollo embrionario.

Las concentraciones de aminoácidos añadidas al medio KSOMaa, por ejemplo, son fijadas justamente a la mitad de cada concentración específica de 13 aminoácidos pertenecientes al grupo de los aminoácidos esenciales (Science 1959; 130, 432-437) y otros 7 aminoácidos pertenecientes al grupo de los aminoácidos no esenciales, habiéndose decidido esa concentración específica usando la auxotrofia de las células somáticas como índice por Eagle y otros. Además, en un líquido de cultivo G1 o G2 desarrollado para el cultivo de embriones humanos, se usan directamente las concentraciones decididas usando la auxotrofia de las células somáticas como índice por Eagle como las

concentraciones de aminoácidos que se añaden a los medios de cultivo.

Por lo tanto, aún existe una demanda de desarrollo de medios de cultivo que tengan las concentraciones de aminoácidos adecuadas para el cultivo de embriones *in vitro*.

5

Medios para resolver los problemas

Considerando dicha demanda, los presentes inventores repitieron una intensiva investigación y, como consecuencia, encontraron las concentraciones de aminoácidos adecuadas para el cultivo de embriones.

10

En un modo de la presente invención, se proporciona una composición para el cultivo de embriones como se define en las reivindicaciones, donde dicha composición tiene la constitución mostrada en la Tabla A siguiente, y donde el derivado de glutamina es glicil-L-glutamina, L-alanil-L-glutamina, L-leucil-L-glutamina, L-valil-L-glutamina o L-isoleucil-L-glutamina. [Tabla 1]

15

Tabla A

Componente	mM
L-Alanina	0,297 ± 0,089
L-Asparaguina	0,015 ± 0,005
Ácido L-aspártico	0,120 ± 0,036
Ácido L-glutámico	0,550 ± 0,165
Glicina	0,979 ± 0,294
L(-)-Prolina	0,105 ± 0,032
L-Serina	0,176 ± 0,053
L(+)-Arginina	0,108 ± 0,032
L(-)-Cistina	0,048 ± 0,014
L-Histidina	0,053 ± 0,016
L(+)-Isoleucina	0,036 ± 0,011
L-leucina	0,081 ± 0,024
L(+)-Lisina	0,176 ± 0,053
L-Metionina	0,022 ± 0,007
L(-)-Fenilalanina	0,045 ± 0,013
L(-)-Treonina	0,109 ± 0,033
L-Triptófano	0,018 ± 0,005
L-Tirosina	0,048 ± 0,014
L-Valina	0,108 ± 0,032
L-Glutamina o derivado de glutamina	0,398 ± 0,119
Taurina	1,412 ± 0,424

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición para el cultivo de embriones según se define en las reivindicaciones, que además contiene al menos un componente seleccionado entre el grupo consistente en electrolitos, ácidos orgánicos, carbohidratos, indicadores de pH, ajustadores de pH, tampones de pH, antibióticos, vitaminas, elementos metálicos traza, quelantes, hormonas, factores de crecimiento, lípidos o constituyentes de los mismos, proteínas de soporte, componentes de la matriz extracelular, sustancias reductoras y polímeros, además de los constituyentes mostrados en la Tabla A anterior.

25

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición para el cultivo de embriones según se define en las reivindicaciones, que contiene los constituyentes mostrados en la Tabla A anterior y electrolitos. En otra realización de la presente invención, se proporciona una composición para el cultivo de embriones según se define en las reivindicaciones, que contiene los constituyentes mostrados en la Tabla A anterior, electrolitos y ácidos orgánicos y/o carbohidratos. En aún otra realización de la presente invención, también se proporciona una composición para el cultivo de embriones según se define en las reivindicaciones, que contiene los constituyentes mostrados en la Tabla A anterior, electrolitos y ácidos orgánicos y/o carbohidratos, y que además contiene al menos un componente seleccionado entre el grupo consistente en indicadores de pH, ajustadores de pH, tampones de pH, antibióticos, vitaminas, elementos metálicos traza, quelantes, hormonas, factores de crecimiento, lípidos o constituyentes de los mismos, proteínas de soporte, componentes de la matriz extracelular, sustancias reductoras y polímeros.

30

35

Tal como se usa aquí, el término "composición para el cultivo de embriones" significa una composición para tratar gametos o embriones. Como también se describe aquí, utilizando una composición para el cultivo de embriones, se pueden cultivar huevos fertilizados o blastómeros hasta la obtención de blastocistos o hasta la eclosión de los

40

blastocistos. El término "pueden cultivarse hasta la obtención de blastocistos" incluye, por ejemplo, el cultivo de huevos fertilizados o de blastómeros hasta la obtención de embriones de dos a ocho células o mórulas, pero no se limita a ello.

5 También se puede utilizar la composición para el cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención cuando se recogen espermatozoides o células huevo, se maduran, se mantienen o se lavan, o cuando se fertilizan células huevo *in vitro*. Se puede recambiar la composición para el cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención con una composición fresca para cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención durante el cultivo de embriones, pero no se limita a ello.

10 El "gameto" significa un espermatozoide o un óvulo. En la presente descripción, el "embrión" incluye embriones reconstruidos, tales como un huevo fertilizado, un embrión temprano y un embrión de trasplante nuclear, e incluye embriones derivados de mamíferos, tales como humano, ratón, bóvido, conejo, mono rhesus, cerdo y rata, pero sin limitación a éstos. Los "mamíferos" pueden ser humanos, ratones, bóvidos, conejos, monos rhesus, cerdos o ratas, pero no se limitan a éstos.

15 El blastocisto indica un embrión tras la fase de escisión en el desarrollo temprano de los mamíferos. El blastocisto consiste en una masa celular interna, un blastocele y un trofocotodermo rodeado por una zona pelúcida. La eclosión de los blastocistos indica una etapa de escape de los embriones desde la zona pelúcida y es un proceso esencial para alcanzar la implantación de los embriones.

20 Se sabe que, en embriones cultivados que tienen anomalías en su estructura y sus funciones fisiológicas, la eclosión se retrasa o no se produce (Reprod Biomed Online 2003; 7: 228-234). Mientras tanto, se sabe que, por ejemplo, un blastocisto que eclosiona dentro de un período fijado de tiempo tiene un elevado índice de implantación en comparación con un blastocisto que no eclosiona dentro de un período fijado de tiempo (Fertil Steril 2000; 74: 163-165).

25 Se sabe que el número de células en los blastocistos guarda una correlación positiva con el índice de desarrollo fetal (J Reprod Fertil 1997; 109: 153-164) y una correlación positiva con el índice normal de cromosomas (Hum Reprod; 2010: 1916-1926).

30 Como métodos de evaluación de la calidad de los embriones cultivados, existe un método para evaluar las características morfológicas de los embriones usando un microscopio, tales como la velocidad de desarrollo, el índice de desarrollo de blastocistos y el índice de eclosión desde la zona pelúcida, un método de evaluación por medición del número de células en los blastocistos por tinción nuclear y similares.

35 Entre estos métodos de evaluación, el método de evaluación basado en la eclosión es uno de los métodos de evaluación favorables para seleccionar embriones cultivados de gran calidad. El número de células en los blastocistos es también uno de los métodos de evaluación importantes para evaluar la calidad de los embriones cultivados.

40 Los aminoácidos contenidos en una composición para cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención pueden estar en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los aminoácidos contenidos en una composición para cultivo de embriones implicada en otra realización de la presente invención pueden también ser los que se pueden descomponer por hidrólisis y similar y convertirse en aminoácidos libres. Dichos aminoácidos pueden estar, por ejemplo, en forma de éster, en forma de N-acilo, de oligopéptido y similar.

45 La glutamina, por ejemplo, puede ser un derivado de glutamina. El derivado de glutamina es, según la invención, glicil-L-glutamina, L-alanil-L-glutamina, L-leucil-L-glutamina, L-valil-L-glutamina o L-isoleucil-L-glutamina. Estos derivados de glutamina pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más derivados de glutamina en combinación. En una realización de la presente invención, el derivado de glutamina es así, por ejemplo, glicil-L-glutamina o L-alanil-L-glutamina. En otra realización de la presente invención, el derivado de glutamina es glicil-L-glutamina. En otra realización de la presente invención, el derivado de glutamina es L-alanil-L-glutamina.

50 Además, por ejemplo, en la cistina, una porción de la misma o toda ella puede ser cisteína.

55 En una realización de la presente invención, la taurina contenida en una composición para el cultivo de embriones puede estar en forma libre o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra realización de la presente invención, la taurina contenida en una composición para el cultivo de embriones puede ser la que se puede convertir en taurina por deshidrogenación y similares. Dicha taurina, por ejemplo, puede ser hipotaurina.

60 La composición para el cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención puede contener al menos un componente seleccionado entre el grupo consistente en electrolitos, ácidos orgánicos, carbohidratos, indicadores de pH, ajustadores de pH, tampones de pH, antibióticos, vitaminas, elementos metálicos traza,

quelantes, hormonas, factores de crecimiento, lípidos o sus constituyentes, proteínas de soporte, componentes de la matriz extracelular, sustancias reductoras y polímeros y similares, según sea necesario.

5 Los electrolitos no están limitados, e incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, dihidrógeno fosfato de sodio, cloruro de calcio dihidrato, sulfato de magnesio heptahidrato, hidrógeno carbonato de sodio, cloruro de calcio, gluconato de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio e hidrógeno fosfato dipotásico y similares. Estos electrolitos pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más electrolitos en combinación.

10 Los ácidos orgánicos no están limitados, e incluyen ácido pirúvico, ácido acético, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico, ácido α -cetoglutárico, ácido fumárico, ácido oxaloacético, ácido isocítrico, ácido oxalosuccínico, ácido tartárico, ácido adípico, ácido láctico y sus sales. Estos ácidos orgánicos pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más ácidos orgánicos en combinación.

15 Los carbohidratos no están limitados, e incluyen glucosa, maltosa, fructosa, xilitol, sorbitol y trehalosa y similares. Estos carbohidratos pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más carbohidratos en combinación.

Los indicadores de pH no están limitados, e incluyen rojo fenol y similares.

20 Los ajustadores de pH no están limitados, e incluyen ácido clorhídrico, ácido acético, hidróxido de sodio y similares.

25 Los tampones de pH no están limitados, e incluyen HEPES (ácido *N*-2-hidroxiethylpiperazino-*N'*-2-etanosulfónico), MOPS (ácido 3-morfolinopropanosulfónico), tris[hidroximetil]aminometano, ácido *N*-tris[hidroximetil]metil-2-aminoetanosulfónico y similares. Estos tampones de pH pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más tampones de pH en combinación.

Los antibióticos no están limitados, e incluyen penicilina, estreptomina, kanamicina, gentamicina, eritromicina, anfotericina B, nistatina y similares. Estos antibióticos pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más antibióticos en combinación.

30 Las vitaminas no están limitadas, e incluyen vitamina A, grupo de las vitaminas B, vitamina C, grupo de las vitaminas D, vitamina E, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico y similares. Estas vitaminas pueden ser usadas solas o se pueden usar dos o más vitaminas en combinación.

35 Los elementos metálicos traza no están limitados, e incluyen zinc, hierro, manganeso, cobre, yodo, selenio y cobalto. Estos elementos metálicos traza no están limitados y pueden ser usados en forma libre o pueden ser usados como compuestos farmacéuticamente aceptables que contienen estos elementos metálicos traza. Estos elementos metálicos traza pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más elementos metálicos traza en combinación.

40 Los quelantes no están limitados, e incluyen EGTA (ácido etilenglicol-bis-tetraacético), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EDDA (ácido etilendiaminodiacético) y DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y similares. Estos quelantes pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más quelantes en combinación.

45 Las hormonas no están limitadas, e incluyen insulina, hidrocortisona, dexametasona, triyodotironina, gonadotropina, estrógeno, progesterona y similares. Estas hormonas pueden ser usadas solas o se pueden usar dos o más hormonas en combinación.

50 Los factores de crecimiento no están limitados, e incluyen el factor de crecimiento epidérmico, los factores de crecimiento de los fibroblastos, los factores de crecimiento derivados de plaquetas, los factores de crecimiento de tipo insulina, la hormona del crecimiento y similares. Estos factores de crecimiento pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más factores de crecimiento en combinación.

55 Los lípidos o sus constituyentes no están limitados, e incluyen ácidos grasos, tales como ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido mirístico y sus sales, o colesterol, etanolamina, colina, esfingomiélna, cardiolipina y similares. Estos lípidos o sus constituyentes pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más de ellos en combinación.

60 Las proteínas de soporte no están limitadas, e incluyen albumina, transferrina, ceruloplasmina y similares. Estas proteínas de soporte pueden ser usadas solas o se pueden usar dos o más proteínas de soporte en combinación. La albúmina no está limitada, y puede ser seroalbúmina bovina, seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina recombinante o seroalbúmina humana recombinante, o una mezcla de las mismas.

65 Los componentes de la matriz extracelular no están limitados, e incluyen fibronectina, colágeno, gelatina, hialuronano y similares. Estos componentes de la matriz extracelular pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más componentes de la matriz extracelular en combinación.

Las sustancias reductoras no están limitadas, e incluyen 2-mercaptoetanol, ditioneitol, glutatión reducido y similares. Estas sustancias reductoras pueden ser usadas solas o se pueden usar dos o más sustancias reductoras en combinación.

5 Los polímeros no están limitados, e incluyen PVP (polivinilpirrolidona), PVA (alcohol polivinílico), dextrano y similares. Estos polímeros pueden ser usados solos o se pueden usar dos o más polímeros en combinación.

10 La composición para el cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención puede ser producida combinando los constituyentes mediante un método convencional. Una composición para el cultivo de embriones, por ejemplo, puede ser producida o suministrada en forma de solución estéril, en forma de solución concentrada estéril de tipo dilución o en forma de un producto liofilizado estéril de tipo disolución mediante un método convencional.

15 Por lo tanto, la composición para el cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención puede estar en forma de solución estéril, en forma de solución concentrada estéril o en forma de producto liofilizado estéril. Cuando la composición para el cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención está en forma de solución concentrada estéril o en forma de producto liofilizado estéril como se ha descrito anteriormente, diluyendo o disolviendo la composición con agua estéril antes de su uso se puede obtener una composición para el cultivo de embriones en forma de solución estéril, pero no se limita a esto.

20 **Ejemplos**

Ejemplo 1

25 Constitución del medio

La Tabla 2 muestra, en la constitución del medio KSOMaa (Ejemplo comparativo 1) como control y la constitución del medio del Ejemplo 1, los nombres de los componentes contenidos en el medio, los pesos moleculares (P.M.) y sus contenidos desde la columna de la izquierda.

30

Tabla 2

Nombre del componente	P.M.	Ejemplo comparativo 1		Ejemplo 1	
		mM	g/l	mM	g/l
L-Alanina	89,09	0,050	0,004	0,297	0,026
L-Asparaguina monohidrato	150,13	0,050	0,008	0,015	0,002
Ácido L-aspártico	133,10	0,050	0,007	0,120	0,016
Ácido L-glutámico	147,13	0,050	0,007	0,550	0,081
Glicina	75,07	0,050	0,004	0,979	0,073
L(-)-Prolina	115,13	0,050	0,006	0,105	0,012
L-Serina	105,09	0,050	0,005	0,176	0,018
L(+)-Arginina clorhidrato	210,66	0,300	0,063	0,108	0,023
L(-)-Cistina	240,30	0,050	0,012	0,048	0,012
L-Histidina clorhidrato monohidrato	209,63	0,100	0,021	0,053	0,011
L(+)-Isoleucina	131,17	0,200	0,026	0,036	0,005
L-Leucina	131,17	0,200	0,026	0,081	0,011
L(+)-Lisina clorhidrato	182,65	0,200	0,037	0,176	0,032
L-Metionina	149,21	0,050	0,007	0,022	0,003
L(-)-Fenilalanina	165,19	0,100	0,017	0,045	0,007
L(-)-Treonina	119,12	0,200	0,024	0,109	0,013
L-Triptófano	204,23	0,025	0,005	0,018	0,004
L-Tirosina	181,19	0,100	0,018	0,048	0,009
L-Valina	117,15	0,200	0,023	0,108	0,013
Glicil-L-glutamina monohidrato	221,21	1,000	0,221	0,398	0,088
Taurina	125,15	-	-	1,412	0,177
Cloruro de sodio	58,44	95,000	5,552	114,718	6,704
Cloruro de potasio	74,55	2,500	0,186	5,200	0,388
Dihidrógeno fosfato de potasio	136,09	0,350	0,048	0,300	0,041
Cloruro de calcio dihidrato	147,01	1,710	0,251	1,117	0,164
Sulfato de magnesio heptahidrato	246,48	0,200	0,049	0,467	0,115
Hidrógeno carbonato de sodio	84,01	25,000	2,100	25,000	2,100
D-Glucosa	180,16	0,200	0,036	2,998	0,540

Piruvato de sodio	110,04	0,200	0,022	0,183	0,020
L-Lactato de sodio	112,06	10,000	2,186	4,540	0,992
Citrato trisódico dihidrato	294,10	-	-	0,127	0,037
EDTA·2Na	372,24	0,010	0,004	-	-
Rojo fenol	354,38	0,003	0,001	0,003	0,001
Sulfato de gentamicina	-	-	0,010	-	0,010

Recogida de esperma

5 Tras el sacrificio de ratones ICR machos (Japan SLC, Inc.), se cortó la cola del epidídimo. Se recogió una masa de esperma obtenida por incisión del conducto del epidídimo en el centro de la cola del epidídimo en 300 μ l de medio TYH suplementado con un 0,4% de seroalbúmina bovina preparado bajo aceite mineral. Se precultivó la masa de esperma recogida en condiciones de 37°C y 6% de CO₂ durante una hora.

10 Recogida de óvulos

15 Se administraron a ratones ICR hembras (Japan SLC, Inc.) 7,5 unidades internacionales de PMSG (gonadotropina sérica de hembras gestantes, ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., SEROTROPIN (Marca Registrada)) por vía intraperitoneal. Después de 48 horas, se administraron 7,5 unidades internacionales de hCG (gonadotropina coriónica humana, ASKA Pharmaceutical CO., Ltd., GONATROPIN (Marca Registrada)) por vía intraperitoneal para inducir superovulación, y se sacrificó a dichos ratones 15 horas tras la administración de hCG. Se cortó el conducto uterino inmediatamente después del sacrificio. Se recogieron de la ampolla del conducto uterino complejos cúmulo-oocito en 300 μ l de medio TYH suplementado con un 0,4% de seroalbúmina bovina preparado con aceite mineral. Se cultivaron los complejos cúmulo-oocito recogidos en condiciones de 37°C y 6% de CO₂ hasta la fertilización *in vitro*.

20 Fertilización *in vitro*

25 Se añadió al medio TYH que contenía los complejos cúmulo-oocito recogidos el esperma precultivado, de manera que hubiera 150 espermatozoides/ μ l. Tras fertilización *in vitro* en condiciones de 37°C y 6% de CO₂ durante 6 horas, se escogió un óvulo en el que se podían observar el segundo cuerpo polar y dos pronúcleos como huevo fertilizado y se usó directamente para el siguiente experimento.

Prueba de cultivo de embriones

30 Usando el medio del Ejemplo 1 y el medio del Ejemplo comparativo 1, se preparó una gota de 100 μ l de cada medio suplementado con un 0,1% de seroalbúmina bovina en una placa de cultivo de un diámetro de 60 mm bajo aceite mineral y se dejó reposar en condiciones de 37°C, 5% de O₂ y 6% de CO₂ durante la noche para que se equilibrara.

35 Se transfirió un huevo fertilizado a la gota de cada medio tras la equilibración. Se lavó el huevo fertilizado moviendo para obtener varias gotas. Se transfirió el huevo fertilizado lavado a una gota fresca de cada medio y se cultivó en condiciones de 37°C, 5% de O₂ y 6% de CO₂ durante 4 días. Se observó el embrión en el 4º día de cultivo con un microscopio y se calculó el porcentaje de embriones que evolucionaron de huevos fertilizados a blastocistos o la fase de eclosión. En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos.

40 [Tabla 3]

Medio	Número de huevos fertilizados cultivados (frecuencia de repetición)	Índice de desarrollo de blastocistos (%)	
		Total	Eclosión
Ejemplo comparativo 1	104 (6)	95,8±2,2	72,8±3,0
Ejemplo 1	104 (6)	98,1±1,3	87,8±2,9*

Valor medio \pm error estándar

* Diferencia significativa en comparación con el medio del Ejemplo comparativo 1 ($p = 0,0065$, prueba de Wilcoxon)

45 Se tiñeron fluorescentemente los blastocistos obtenidos el 4º día de cultivo usando DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2'-fenilindol) (Roche Diagnostics K.K.) y se midió el número de células en los blastocistos. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos.

[Tabla 4]

Medio	Número de blastocistos analizados	Número total de células
Ejemplo comparativo 1	98	80,2±1,5
Ejemplo 1	94	90,2±2,0**

Valor medio ± error estándar
 ** Diferencia significativa en comparación con el medio del Ejemplo comparativo 1 (p = 0,0003, prueba de Wilcoxon)

5 Tal como se muestra en la Tabla 3 y en la Tabla 4, en el grupo cultivado en el medio del Ejemplo 1 el índice de eclosión mejoraba significativamente y el número de células de los blastocistos era significativamente mayor en comparación con los del grupo cultivado en el medio del Ejemplo comparativo 1. Este resultado muestra que el medio del Ejemplo 1 implicado en una realización de la presente invención es más excelente en cuanto a ser capaz de ejercer una acción estimuladora y una mejora de la calidad sobre el desarrollo embrionario que el medio del Ejemplo comparativo 1.

10

Ejemplo 2

15 Se preparó un medio (Ejemplo 2) substituyendo la constitución de aminoácidos del medio del Ejemplo comparativo 1 mostrada en la Tabla 2 anterior con la constitución de aminoácidos que incluye taurina del medio del Ejemplo 1 mostrada en la Tabla 2 (Tabla 5).

]Tabla 5]

Nombre del componente	P.M.	Ejemplo comparativo 1		Ejemplo 2	
		mM	g/l	mM	g/l
L-Alanina	89,09	0,050	0,004	0,297	0,026
L-Asparaguina monohidrato	150,13	0,050	0,008	0,015	0,002
Ácido L-aspartico	133,10	0,050	0,007	0,120	0,016
Ácido L-glutámico	147,13	0,050	0,007	0,550	0,081
Glicina	75,07	0,050	0,004	0,979	0,073
L(-)-Prolina	115,13	0,050	0,006	0,105	0,012
L-Serina	105,09	0,050	0,005	0,176	0,018
L(+)-Arginina clorhidrato	210,66	0,300	0,063	0,108	0,023
L(-)-Cistina	240,30	0,050	0,012	0,048	0,012
L-Histidina clorhidrato monohidrato	209,63	0,100	0,021	0,053	0,011
L(+)-Isoleucina	131,17	0,200	0,026	0,036	0,005
L-Leucina	131,17	0,200	0,026	0,081	0,011
L(+)-Lisina clorhidrato	182,65	0,200	0,037	0,176	0,032
L-Metionina	149,21	0,050	0,007	0,022	0,003
L(-)-Fenilalanina	165,19	0,100	0,017	0,045	0,007
L(-)-Treonina	119,12	0,200	0,024	0,109	0,013
L-Triptófano	204,23	0,025	0,005	0,018	0,004
L-Tirosina	181,19	0,100	0,018	0,048	0,009
L-Valina	117,15	0,200	0,023	0,108	0,013
Glicil-L-glutamina monohidrato	221,21	1,000	0,221	0,398	0,088
Taurina	125,15	-	-	1,412	0,177
Cloruro de sodio	58,44	95,000	5,552	95,000	5,552
Cloruro de potasio	74,55	2,500	0,186	2,500	0,186
Dihidrógeno fosfato de potasio	136,09	0,350	0,048	0,350	0,048
Cloruro de calcio dihidrato	147,01	1,710	0,251	1,710	0,251
Sulfato de magnesio heptahidrato	246,48	0,200	0,049	0,200	0,049
Hidrógeno carbonato de sodio	84,01	25,000	2,100	25,000	2,100
D-Glucosa	180,16	0,200	0,036	0,200	0,036
Piruvato de sodio	110,04	0,200	0,022	0,200	0,022
L-Lactato de sodio	112,06	10,000	2,186	10,000	2,186
Citrato trisódico dihidrato	294,10	-	-	-	-
EDTA·2Na	372,24	0,010	0,004	0,010	0,004
Rojo fenol	354,38	0,003	0,001	0,003	0,001
Sulfato de gentamicina	-	-	0,010	-	0,010

20 Usando el medio del Ejemplo comparativo 1 y el medio del Ejemplo 2, se realizó la prueba de cultivo de embriones en las mismas condiciones que en la prueba de cultivo de embriones descrita en el Ejemplo 1. En la Tabla 6 se

muestran los resultados obtenidos.

[Tabla 6]

Medio	Número de blastocistos analizados	Número total de células
Ejemplo comparativo 1	131	86,2±1,4
Ejemplo 2	131	90,2±1,6*

Valor medio ± error estándar
* Diferencia significativa en comparación con el medio del Ejemplo comparativo 1 (p = 0,0467, prueba de Wilcoxon)

5 Tal como se muestra en la Tabla 6, en el grupo cultivado en el medio del Ejemplo 2 implicado en una realización de la presente invención, el número de células en los blastocistos era significativamente mayor en comparación con el del grupo cultivado en el Ejemplo comparativo 1. Como se ha descrito anteriormente, la constitución de aminoácidos que incluye taurina de una composición para el cultivo de embriones implicada en una realización de la presente invención ejerce una acción de estimulación del desarrollo de embriones independientemente de constituciones de medio distintas de la anterior constitución.

Ejemplos 3 y 4

15 Se prepararon un medio que tenía una constitución con 0,7 veces la concentración de la constitución de aminoácidos que incluía taurina contenida en el medio del Ejemplo 1 mostrada en la Tabla 2 (Ejemplo 3) y un medio que tenía una constitución con 1,3 veces su concentración (Ejemplo 4) (Tabla 7).

[Tabla 7]

Nombre del componente	Ejemplo 1	Ejemplo 3	Ejemplo 4
	mM	mM	mM
L-Alanina	0,297	0,208	0,386
L-Asparaguina monohidrato	0,015	0,011	0,020
Ácido L-aspártico	0,120	0,084	0,156
Ácido L-glutámico	0,550	0,385	0,715
Glicina	0,979	0,685	1,273
L(-)-Prolina	0,105	0,074	0,137
L-Serina	0,176	0,123	0,229
L(+)-Arginina clorhidrato	0,108	0,076	0,140
L(-)-Cistina	0,048	0,034	0,062
L-Histidina clorhidrato monohidrato	0,053	0,037	0,069
L(+)-Isoleucina	0,036	0,025	0,047
L-Leucina	0,081	0,057	0,105
L(+)-Lisina clorhidrato	0,176	0,123	0,229
L-Metionina	0,022	0,015	0,029
L(-)-Fenilalanina	0,045	0,032	0,059
L(-)-Treonina	0,109	0,076	0,142
L-Triptófano	0,018	0,013	0,023
L-Tirosina	0,048	0,034	0,062
L-Valina	0,108	0,076	0,140
Glicil-L-glutamina monohidrato	0,398	0,279	0,517
Taurina	1,412	0,988	1,836
Cloruro de sodio	114,718	114,718	114,718
Cloruro de potasio	5,200	5,200	5,200
Dihidrógeno fosfato de potasio	0,300	0,300	0,300
Cloruro de calcio dihidrato	1,117	1,117	1,117
Sulfato de magnesio heptahidrato	0,467	0,467	0,467
Hidrógeno carbonato de sodio	25,000	25,000	25,000
D-Glucosa	2,998	2,998	2,998
Piruvato de sodio	0,183	0,183	0,183
L-Lactato de sodio	4,540	4,540	4,540
Citrato trisódico dihidrato	0,127	0,127	0,127
EDTA·2Na	-	-	-
Rojo fenol	0,003	0,003	0,003
Sulfato de gentamicina	0,010 (g/l)	0,010 (g/l)	0,010 (g/l)

En la Tabla 7, la unidad de concentración de cada componente es mM, a menos que se describa algo diferente.

5 Usando el medio del Ejemplo 1, el medio del Ejemplo 3 y el medio del Ejemplo 4, se realizó la prueba de cultivo de embriones en las mismas condiciones que la prueba de cultivo de embriones descrita en el Ejemplo 1. En la Tabla 8 y la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos.

[Tabla 8]

Medio	Número de huevos fertilizados cultivados (frecuencia de repetición)	Índice de desarrollo de blastocistos (%)	
		Total	Eclosión
Ejemplo 1	150 (15)	92,7±3,0	72,7±3,6
Ejemplo 3	150 (15)	94,0±2,4	74,7±4,1
Ejemplo 4	150 (15)	94,0±2,4	72,0±3,9
Valor medio ± error estándar			

10 No había diferencias significativas entre los grupos (prueba de Steel-Dwass).

[Tabla 9]

Medio	Número de blastocistos analizados	Número total de células
Ejemplo 1	124	102,1±2,0
Ejemplo 3	142	99,4±1,4
Ejemplo 4	137	101,4±1,6
Valor medio ± error estándar		

15 No había diferencias significativas entre los grupos (prueba de Steel-Dwass).

20 Tal como se muestra en la Tabla 8 y la Tabla 9, incluso con el medio que tenía la constitución con 0,7 veces la concentración de la constitución de aminoácidos que incluía taurina del medio del Ejemplo 1 (Ejemplo 3) y el medio que tenía la constitución con 1,3 veces su concentración (Ejemplo 4), no se observaron diferencias significativas en cuanto a validez. Esto revela que la validez de la constitución de aminoácidos que incluye taurina del medio del Ejemplo 1, que es la composición para cultivo de embriones implicada en la presente realización, no se pierde dentro de un rango de concentración de al menos 0,7 a 1,3 veces.

Ejemplo 5

25 El Ejemplo 5 es un ejemplo de referencia que no forma parte de la invención tal como la definen las reivindicaciones.

Prueba de cultivo de embriones humanos

30 La Tabla 10 muestra, en la constitución de un medio del Ejemplo 5, los nombres de los componentes contenidos en el medio, los pesos moleculares (P.M.) y sus contenidos desde la columna de la izquierda.

[Tabla 10]

Nombre del componente	P.M.	Ejemplo 5	
		mM	g/l
L-Alanina	89,09	0,297	0,026
L-Asparaguina monohidrato	150,13	0,015	0,002
Ácido L-aspártico	133,10	0,120	0,016
Ácido L-glutámico	147,13	0,550	0,081
Glicina	75,07	0,979	0,073
L(-)-Prolina	115,13	0,105	0,012
L-Serina	105,09	0,176	0,018
L(+)-Arginina clorhidrato	210,66	0,108	0,023
L(-)-Cistina	240,30	0,048	0,012
L-Histidina clorhidrato monohidrato	209,63	0,053	0,011
L(+)-Isoleucina	131,17	0,036	0,005
L-Leucina	131,17	0,081	0,011
L(+)-Lisina clorhidrato	182,65	0,176	0,032
L-Metionina	149,21	0,022	0,003
L(-)-Fenilalanina	165,19	0,045	0,007

L(-)-Treonina	119,12	0,109	0,013
L-Triptófano	204,23	0,018	0,004
L-Tirosina	181,19	0,048	0,009
L-Valina	117,15	0,108	0,013
Glicil-L-glutamina monohidrato	221,21	0,398	0,088
Taurina	125,15	1,412	0,177
Cloruro de sodio	58,44	114,718	6,704
Cloruro de potasio	74,55	5,200	0,388
Dihidrógeno fosfato de potasio	136,09	0,300	0,041
Cloruro de calcio dihidrato	147,01	1,117	0,164
Sulfato de magnesio heptahidrato	246,48	0,467	0,115
Hidrógeno carbonato de sodio	84,01	25,000	2,100
D-Glucosa	180,16	2,998	0,540
Piruvato de sodio	110,04	0,183	0,020
L-Lactato de sodio	112,06	4,540	0,992
Citrato trisódico dihidrato	294,10	0,127	0,037
EDTA·2Na	372,24	0,010	0,004
Rojo fenol	354,38	0,003	0,001
Sulfato de gentamicina	-	-	0,010

Se preparó una gota de 20 µl del medio del Ejemplo 5 al que se añadió un 0,05% de albúmina humana recombinante en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro bajo aceite mineral y se dejó reposar en condiciones de 37°C, 4% de O₂ y 6% de CO₂ durante la noche para que se equilibrara.

5 Como huevos fertilizados humanos, se usaron huevos fertilizados tras congelación y descongelación, los cuales no estaban destinados a ser usados para tratamiento después de ello y se acordó que tuvieran un uso en investigación. Se transfirió cada uno de los huevos fertilizados humanos tras congelación-descongelación a cada medio tras la
 10 equilibración. Después de ello, se lavó el huevo fertilizado humano moviendo hasta obtener varias gotas. Se transfirió el huevo fertilizado lavado a una gota fresca de cada medio y se cultivó en condiciones de 37°C, 4% de O₂ y 6% de CO₂ durante 5 a 6 días. Se observó el embrión con un microscopio cada día a partir del segundo día después del inicio del cultivo y se observó el estadio de desarrollo del embrión. En la Tabla 11 se muestran los resultados típicos obtenidos.

15 [Tabla 11]

Medio del embrión	Nº	Estadio de desarrollo			
		Día 2	Día 3	Día 4	Días 5-6
Ejemplo 5	1	estadio de 4 células	estadio de 8 células	estadio de mórula	estadio de blastocisto
	2	estadio de 4 células	estadio de 6 células	estadio de 8 células	estadio de mórula
	3	estadio de 2 células	estadio de 6 células	estadio de 9 células	estadio de blastocisto
	4	estadio de 2 células	estadio de 4 células	estadio de 5 células	estadio de mórula

Como se muestra en la Tabla 11, está claro que el medio del Ejemplo 5 es un excelente medio de cultivo para
 20 embriones humanos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para el cultivo de embriones, que tiene la constitución mostrada en la siguiente Tabla A.

5

Tabla A

Componente	mM
L-Alanina	0,297 ± 0,089
L-Asparaguina	0,015 ± 0,005
Ácido L-aspártico	0,120 ± 0,036
Ácido L-glutámico	0,550 ± 0,165
Glicina	0,979 ± 0,294
L(-)-Prolina	0,105 ± 0,032
L-Serina	0,176 ± 0,053
L(+)-Arginina	0,108 ± 0,032
L(-)-Cistina	0,048 ± 0,014
L-Histidina	0,053 ± 0,016
L(+)-Isoleucina	0,036 ± 0,011
L-leucina	0,081 ± 0,024
L(+)-Lisina	0,176 ± 0,053
L-Metionina	0,022 ± 0,007
L(-)-Fenilalanina	0,045 ± 0,013
L(-)-Treonina	0,109 ± 0,033
L-Triptófano	0,018 ± 0,005
L-Tirosina	0,048 ± 0,014
L-Valina	0,108 ± 0,032
L-Glutamina o derivado de glutamina	0,398 ± 0,119
Taurina	1,412 ± 0,424

donde el derivado de la glutamina es glicil-L-glutamina, L-alanil-L-glutamina, L-leucil-L-glutamina, L-valil-L-glutamina o L-isoleucil-L-glutamina.

10

2. La composición para el cultivo de embriones según la reivindicación 1, que además contiene electrolitos.

3. La composición para el cultivo de embriones según la reivindicación 2, que contiene ácidos orgánicos y/o carbohidratos.

15

4. La composición para el cultivo de embriones según la reivindicación 3, que además contiene al menos un componente seleccionado entre el grupo consistente en indicadores de pH, ajustadores de pH, tampones de pH, antibióticos, vitaminas, elementos metálicos traza, quelantes, hormonas, factores de crecimiento, lípidos o sus constituyentes, proteínas de soporte, componentes de la matriz extracelular, sustancias reductoras y polímeros.