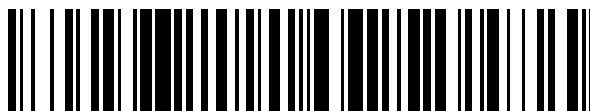


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 924**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2008** **PCT/US2008/059897**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2008** **WO08134220**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2008** **E 08745495 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016** **EP 2167644**

54 Título: **Medios de cultivo para células de desarrollo que contienen concentraciones elevadas de ácido lipoico**

30 Prioridad:

01.05.2007 US 915180 P

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

20.06.2017

73 Titular/es:

**VITROLIFE SWEDEN AB (100.0%)
BOX 9080 GUSTAF WERNERS GATA 2
400 92 GOTEBOG, SE**

72 Inventor/es:

**GARDNER, DAVID K.;
LARMAN, MARK G. y
LINCK, DONALD**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 617 924 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

Medios de cultivo para células de desarrollo que contienen concentraciones elevadas de ácido lipoico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la fecundación *in vitro* (FIV) de mamíferos y a medios de cultivo y a procedimientos útiles para llevar a cabo la fecundación y desarrollo del embrión y para llevar a cabo el crecimiento de células madre. En particular, la invención proporciona un método de cultivo de células de desarrollo en un medio de cultivo que comprende una concentración elevada de ácido lipoico que sustenta el crecimiento y desarrollo de células de desarrollo, incluyendo embriones, y aumenta significativamente la probabilidad de embarazo exitoso en FIV.

15 Antecedentes de la invención

La fecundación *in vitro* es una técnica usada para superar diversas formas de esterilidad masculina y femenina. El procedimiento implica fecundar un ovocito con un espermatozoide *in vitro* y posteriormente transferir el embrión en desarrollo al cuerpo femenino. Aunque hace casi 30 años del primer nacimiento por FIV (Steptoe, P.C. y Edwards, R.G., Lancet 2(8085): 366 (1978)), el procedimiento se enfrenta a constantes desafíos de tasas de implantación y embarazo bajas. En los primeros diez años tras el nacimiento del primer "bebé probeta", la tasa de éxito notificada para FIV era solo del 8 a 10%. Esta baja tasa de éxito se debía, al menos en parte, a la pobre calidad de los medios de cultivo para embriones. Lamentablemente, a pesar de un continuo esfuerzo por mejorar y especializar los medios de cultivo de FIV durante los últimos 30 años, la tasa de éxito solo ha aumentado hasta de aproximadamente del 30 al 35% en casos en los que se emplea transferencia única (basado en los registros nacionales de FIV en Finlandia y Suecia en 2005). Este dato de transferencia única es el dato más comparable a los datos de 1978. Este lento progreso en la mejora de las tasas de éxito de FIV refleja la dificultad e imprevisibilidad de alterar y potenciar los medios de cultivo para células de desarrollo, tales como gametos, cigotos y embriones.

Los tipos de medios actualmente usados para FIV humana se han incluido dentro de dos categorías; sencillos y complejos. Los medios sencillos son aquellos, tales como fluido tubárico humano (HTF) y de Earle, que son soluciones salinas equilibradas con fuentes de energía de hidratos de carbono añadidas tales como piruvato, lactato y glucosa. Los medios complejos, tales como F-10 de Ham, incluyen además aminoácidos esenciales y no esenciales así como otros aditivos, tales como vitaminas, antibióticos y suero o proteínas.

Aunque algunos medios de cultivo de FIV están destinados a sustentar el desarrollo del embrión hasta la fase de 8 células o más allá en un medio único, la tendencia ha sido optimizar medios de cultivo separados para sustentar el embrión en desarrollo en diferentes fases de desarrollo. Esto ha conducido al uso extendido de medios de cultivo secuenciales en FIV. Por ejemplo, un sistema de medios de cultivo secuencial puede usar un medio de cultivo para el crecimiento de un embrión desde un cigoto de una célula hasta un embrión de 8 células durante las primeras 48 horas de desarrollo y otro medio de cultivo para hacer crecer el embrión de 8 células hasta la fase de blastocisto. Como el aparato reproductor femenino proporciona un entorno cambiante para el embrión en desarrollo, los medios de cultivo secuenciales se diseñan para imitar más estrechamente el aparato reproductor femenino durante el crecimiento del embrión *in vivo*. Las composiciones de medios normalmente difieren con respecto a componentes tales como aminoácidos y azúcares para mejorar la optimización de los medios para sustentar el crecimiento y desarrollo embrionarios.

Los medios de cultivo empleados en FIV han experimentado alguna evolución en el transcurso de los últimos 30 años. Sin embargo, en algunos aspectos los medios de cultivo han permanecido sorprendentemente sin cambios. El foco al que la mayoría de las investigaciones se dirigía en la mejora de medios de cultivo para embriones ha estado en los componentes que componen la parte central o principal de los medios (fuentes de energía de hidratos de carbono, aminoácidos, suero y sales/tampones). Otros componentes han recibido mucha menos atención. En algunos casos parece que estos componentes se han incluido en medios de cultivo para embriones simplemente porque estaban presentes en los medios de cultivo de células somáticas tempranos a partir de los que evolucionaron inicialmente los medios de cultivo para embriones. El ácido lipoico (LA) es un componente de este tipo.

El ácido lipoico, también conocido como ácido α -lipoico o ácido tióctico, se conoce ampliamente por su papel como la coenzima de la subunidad E2 (dihidrolipoato aciltransferasa) de complejos multienzimáticos que catalizan la descarboxilación oxidativa de piruvato, α -cetoglutarato y α -cetoácidos de cadena ramificada. Sin embargo, en los últimos diez años más o menos, se ha hecho evidente que el ácido lipoico también es un antioxidante. La eficacia del ácido lipoico se ha atribuido a las propiedades antioxidantes únicas del sistema lipoato/dihidrolipoato, a su capacidad de eliminación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y al efecto significativo sobre las concentraciones tisulares de formas reducidas de otros antioxidantes, incluyendo uno de los más poderosos, glutatión. Los datos a partir de la bibliografía sugieren que el ácido lipoico y dihidrolipoato (DHLLA) pueden tener o no tener efectos promotores del crecimiento sobre tipos celulares específicos como células de leucemia murina y células T Jurkat. Véase Dovinova *et al.*, Neoplasma, vol. 46, págs. 237-241 (1999); y Mizuno *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 200, págs. 1134-1136 (1994).

El ácido lipoico es un compuesto de disulfuro anfílico, que contiene un centro quiral que crea dos formas enantioméricas (R y L), siendo la más activa biológicamente el enantiómero R. El componente disulfuro proporciona la molécula con propiedades quelantes de metales mientras que las propiedades anfílicas del compuesto permiten que la molécula relativamente pequeña (PM=206,34 g/mol) se difunda fácilmente a través de la membrana celular en la que se convierte fácilmente en su ditiol, forma reducida, DHLA mediante varios complejos multienzima celulares implicados en la descarboxilación de α -cetoácidos; etapas aeróbicamente importantes en el metabolismo energético. Además, el par DHLA/LA tiene un potencial redox notificado de -0,29 V, lo que le hace una fuerte unidad eliminadora de radicales oxígeno/aceptora de electrones. Este fuerte potencial redox permite que la molécula actúe como recicladora potencial de otros antioxidantes tales como vitamina C, vitamina E, glutatión, coenzima Q10 y ubiquinona. Aunque se presupone que la reducción de ácido lipoico tiene lugar dentro de las células, se cree que el DHLA generado sale de las células al medio circundante lo que implica capacidades antioxidantes tanto intracelulares como extracelulares.

El ácido lipoico está presente generalmente en procariotas y eucariotas. El lipoato, la base sin protonar, es la forma más prevalente en condiciones fisiológicas y se cree que se sintetiza dentro de la célula mediante la ácido lipoico sintetasa a partir del ácido octanoico de los precursores y una fuente de azufre, más probablemente un residuo de cisteína. Esto hace de la molécula un nutriente no esencial, aunque se ha notificado que es un suplemento de la dieta valioso en enfermedades asociadas con estrés oxidativo excesivo, incluyendo artritis, diabetes, aterosclerosis, síndrome metabólico y Alzheimer. Véase, por ejemplo, Pershadsingh HA, Expert Opin Investig Drugs 16:291-302 (2007); Holquist *et al.*, Pharmacol Ther. 113: 154-64 (2007).

A pesar del conjunto de conocimientos en aumento con respecto al papel del ácido lipoico en el cuerpo, se sabe muy poco sobre su efecto sobre el crecimiento de células de desarrollo, tales como embriones, en cultivo. Aunque el ácido lipoico se incluye a veces a bajas concentraciones en medios de cultivo para embriones, habitualmente está ausente. Los dos estudios que han estudiado sistemáticamente el papel del ácido lipoico en medios de cultivo para embriones concluyeron que la omisión de ácido lipoico en medios de cultivo para embriones no tenía efecto sobre el resultado. El primer estudio examinó el efecto de 11 vitaminas solubles en agua, incluyendo ácido lipoico, a partir de medio F10 de Ham sobre el desarrollo de embriones de hámster de 8 células con respecto a blastocistos en eclosión y eclosionados *in vitro* (Kane *et al.*, Biology of Reproduction, 39, 1137 (1988)). El estudio concluyó que la omisión de ácido lipoico en el desarrollo de embriones de hámster de 8 células dio como resultado un efecto no significativo sobre el desarrollo en cualquier fase de cultivo. El segundo estudio observó el efecto de la omisión de las 11 vitaminas solubles en agua, incluyendo ácido lipoico, de medio F10 de Ham sobre el cultivo de mórulas de conejo con respecto a blastocistos expandidos (Kane, J. of Expt. Zoology, 245, 220 (1988)). Este estudio también concluyó que no había un efecto significativo debido a la omisión de ácido lipoico. Sin embargo, se ha incluido ácido lipoico en algunos medios de cultivo para embriones.

Por motivos que no están claros a partir de la bibliografía publicada, aquellos medios de cultivo para embriones que incluyen ácido lipoico limitan la concentración a 1 μ M o menos. Esto se debe probablemente al hecho de que muchos medios de cultivo para embriones evolucionaron inicialmente a partir de medios F10 y F12 de Ham, medios de cultivo somáticos antiguamente y todavía comunes, que incluían ácido lipoico a una concentración de 1 μ M. Sin embargo, queda claro a partir de los estudios citados anteriormente que la necesidad o incluso conveniencia de incluir ácido lipoico en tales medios no era una consideración durante la adopción temprana de medios F10 y F12 de Ham como base para medios de cultivo para embriones tempranos. Esto se muestra también claramente por el hecho de que ninguno de los actuales productos de medios de cultivo para embriones comerciales principales parece contener nada de ácido lipoico. De hecho, la tendencia en la evolución de medios de cultivo de F10 y F12 de Ham demuestra que el papel del ácido lipoico en medios de cultivo se ha pasado por alto y no se ha apreciado.

El ácido lipoico se ha incluido también en medios de cultivo de células somáticas a otras concentraciones, sin embargo, la concentración de ácido lipoico usada en tales medios varía en muchos órdenes de magnitud y se ha reconocido que "el cultivo *in vitro* con éxito de diferentes tipos celulares requerirá a menudo el uso de diferentes formulaciones de medios" (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud PCT número WO 98/08934). Esto es particularmente cierto para medios de cultivo para células de desarrollo, tales como embriones, que tienen requisitos muy diferentes que células somáticas. Además, incluso dentro del campo de cultivo de células somáticas, hay desacuerdo en cuanto a si el ácido lipoico es beneficioso en un medio de cultivo (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud PCT número WO 99/35242, página 44, que declara que el "ácido α -lipoico (ácido tióctico) se añade a veces a medios de cultivo, pero hay pocas pruebas de que en realidad se necesite"). Como tal, la bibliografía con respecto al uso de ácido lipoico en medios de cultivo de células somáticas no arroja luz en la conveniencia o efecto del ácido lipoico en medios de cultivo para células de desarrollo, tales como gametos, cigotos y embriones.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos mejorados para el cultivo de células de desarrollo de mamíferos, particularmente embriones, y células madre de mamíferos. Los medios de cultivo usados en los métodos se caracterizan por un intervalo de concentración de ácido lipoico y/o derivado de ácido lipoico bien definido que es al menos 5 veces, y más deseablemente al menos 10 veces, el de cualquier otro medio de cultivo para embriones

conocido. Los medios de cultivo que incluyen ácido lipoico o derivados de ácido lipoico a concentraciones dentro del intervalo identificado por los inventores pueden proporcionar blastocistos con supervivencia aumentada, números de células aumentados, masas celulares internas aumentadas y/o porcentaje aumentado de la masa total compuesta por las células internas en relación con los blastocistos cultivados en un medio de control. Esto es significativo porque estos factores se reconocen como indicadores de bienestar del embrión y desarrollo futuro exitoso hacia un feto dentro del útero.

En un método de la invención, el medio de cultivo usado incluye agua, sales inorgánicas, al menos una fuente de energía, y ácido lipoico a una concentración de 5 μ M a 40 μ M. En una realización, el medio incluye además uno o más aminoácidos. Esto incluye medios de cultivo que tienen concentraciones de ácido lipoico de 5 μ M a 20 μ M, además incluye medios de cultivo que tienen concentraciones de ácido lipoico de 5 μ M a 15 μ M, además incluye medios de cultivo que tienen concentraciones de ácido lipoico de 8 μ M a 12 μ M y aún más incluye medios de cultivo que tienen concentraciones de ácido lipoico de aproximadamente 10 μ M. Los medios de cultivo pueden incluir opcionalmente otros componentes, tales como, pero sin limitarse a, factores de crecimiento, hormonas, vitaminas y antibióticos.

Los medios de cultivo pueden adaptarse para sustentar el crecimiento de células de desarrollo desde una primera fase de desarrollo hasta una segunda fase de desarrollo. Por ejemplo, un medio de cultivo puede diseñarse para sustentar un embrión de mamífero hasta la fase de 4 células, hasta la fase de 8 células o hasta la fase de blastocisto. Por tanto, los diversos medios de cultivo abarcados por la presente invención pueden incluir diferentes componentes a concentraciones variables.

Objetos, características y ventajas adicionales de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se tome conjuntamente con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 presenta datos que muestran el desarrollo de blastocistos de embriones de ratón *in vitro* al 20% de O₂ según la presente invención.

La figura 2 presenta datos que muestran el desarrollo de blastocistos de embriones de ratón *in vitro* al 5% de O₂ según la presente invención.

La figura 3 presenta datos que muestran la inhibición de especies reactivas del oxígeno (ROS) en presencia de ácido lipoico.

Descripción detallada

Los métodos de la presente invención implican FIV y composiciones de medios de cultivo de células madre que comprenden elevadas concentraciones de ácido lipoico y/o derivados de ácido lipoico que sustentan el desarrollo de gametos, cigotos y/o embriones *in vitro* antes de la implantación. Más específicamente, los presentes medios de cultivo de FIV comprenden ácido lipoico y/o derivados de ácido lipoico a una concentración de 5 μ M a 40 μ M. Dentro de este intervalo, la máxima mejora con respecto al desarrollo del embrión se produce a aproximadamente 10 μ M. Por tanto, los medios de cultivo de uso en la presente invención también abarcan medios que tienen una concentración de ácido lipoico y/o derivado de ácido lipoico dentro de intervalos más definidos, incluyendo, por ejemplo, de 5 μ M a 20 μ M, de 5 μ M a 15 μ M y de 8 μ M a 12 μ M, de manera preferible aproximadamente 10 μ M. Por tanto, la presente invención implica medios de cultivo para embriones de mamíferos que tienen al menos un aumento de cinco veces, y deseablemente al menos un aumento de diez veces, en la concentración de ácido lipoico en comparación con medios de cultivo para embriones conocidos que incluyen ácido lipoico.

Los medios de cultivo y usos de los mismos descritos en el presente documento tienen usos significativos no comerciales y no industriales (por ejemplo, investigación) además de (o como alternativa a) usos comerciales e industriales. Esta invención no pretende sustentar usos comerciales de embriones humanos que están prohibidos por ley.

El término "medio de cultivo" se usa en la totalidad de la presente memoria descriptiva para referirse a medios acuosos que contienen sales e hidratos de carbonos preparados a pH y osmolaridad definidos que se usa para el cultivo *in vitro* de células de desarrollo de mamíferos tales como células madre, gametos, cigotos y embriones. Tales medios pueden prepararse en el laboratorio por cualquier médico experto en la técnica y están también disponibles comercialmente. Aunque gran parte de la discusión que sigue se centra en medios de cultivo para embriones en desarrollo, debe entenderse que los medios de cultivo pueden usarse también para desarrollar y cultivar células madre, gametos y cigotos.

El término "embrión" se usa para referirse a células en todas las fases de desarrollo desde un óvulo fecundado hasta los primeros 5 ó 6 días.

El término “célula de desarrollo” se usa para referirse a células madre, gametos, cigotos y embriones.

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de los inventores de que los medios de cultivo que comprenden ácido lipoico a una concentración en el intervalo de 5 μ M a 40 μ M mejora sustancialmente la tasa de éxito de procedimientos de FIV en comparación con medios de cultivo que omiten ácido lipoico, o que incluyen ácido lipoico a concentraciones fuera de este intervalo. Sin desear o pretender vincularse a ninguna teoría, los inventores creen que los beneficios proporcionados por una concentración elevada de ácido lipoico en un medio de cultivo para células de desarrollo es el resultado de la interacción de una variedad de efectos. Los efectos antioxidantes del ácido lipoico desempeñan probablemente un importante papel en el medio. Específicamente, se cree que la adición de ácido lipoico al cultivo desempeña un papel en la protección de células en desarrollo frente al daño oxidativo producido por radicales libres y especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, otros efectos también contribuyen probablemente a los beneficios y ayudan a definir el estrecho intervalo eficaz para el ácido lipoico en un medio de cultivo para gametos, cigotos y embriones. Estos efectos incluyen la posibilidad de un aumento en los niveles intercelulares de GSH y efectos quelantes. Además, los beneficios debidos a niveles aumentados de ácido lipoico en un medio de cultivo pueden ser el resultado de diversos productos metabólicos de ácido lipoico que existen en diversas fases del metabolismo de ácido lipoico dentro de las células de desarrollo. Por ejemplo, los beneficios pueden originarse con derivados de ácido lipoico, tales como ácido lipoico metilado o DHLA.

Las mejoras proporcionadas por los presentes medios pueden medirse mediante uno o más de varios parámetros. Estos incluyen tasas de supervivencia aumentadas para blastocistos hasta la fase de 4 ó 5 días, blastocistos con un mayor número de células, blastocistos que tienen mayores masas celulares internas y blastocisto que tiene masas celulares internas que componen un porcentaje mayor del total. Los presentes inventores han encontrado que los medios de cultivo que tienen una concentración de ácido lipoico fuera del intervalo de 5 μ M a 40 μ M no consiguen proporcionar estos efectos beneficiosos, y pueden tener incluso un efecto perjudicial sobre el desarrollo del embrión. Por ejemplo, los inventores han descubierto que añadir ácido lipoico a cultivos a menos de 5 μ M muestra poco efecto, si es que lo hay, sobre (i) la progresión de embriones en cultivo a la fase de blastocisto, (ii) el número de células en los blastocistos *in vitro*; o (iii) la masa celular interna de los blastocistos. En cambio, los embriones cultivados en medios que comprenden al menos ácido lipoico 5 μ M muestran todos estos efectos beneficiosos. Asimismo, los efectos beneficiosos del ácido lipoico se pierden cuando se añade a medios de cultivo a concentraciones mayores de aproximadamente 40 μ M. Por encima de esta concentración, hay una tendencia hacia un desarrollo más bajo de blastocisto de día 4 y números de células reducidos. Por tanto, parece que el ácido lipoico solo es eficaz a lo largo de un intervalo crítico.

La mejora en el desarrollo del embrión que resulta del uso de los presentes medios de cultivo puede cuantificarse mediante comparación de embriones cultivados en un medio mejorado que contiene altas concentraciones de ácido lipoico y/o derivados del mismo (es decir, 5 μ M a 40 μ M) con embriones cultivados en un medio de control que difiere del medio mejorado solo en que el ácido lipoico o derivados del mismo están ausentes en el control. Por ejemplo, cuando se cultivan cigotos de mamífero fecundados (por ejemplo, cigotos de ratón CF1) en el presente medio hasta el día 4 o día 5, los presentes medios de cultivo pueden proporcionar un aumento de al menos el 5%, al menos el 10%, o incluso al menos el 15% en uno o más de los siguientes: (1) porcentaje de compactación en el día 3; (2) porcentaje total de desarrollo de blastocistos en el día 4; (3) porcentaje total de desarrollo de blastocistos en el día 5; y (4) porcentaje de eclosión de blastocisto en el día 5. Además, los presentes medios pueden proporcionar blastocistos con un número de células interno total y/o un aumento en el porcentaje de la masa total debido a las células internas que son al menos el 10% mayor, o incluso al menos el 15% o mayor, que aquellos de los blastocistos cultivados en el medio de control.

Los medios de cultivo de la presente invención pueden optimizarse para sustentar el desarrollo del embrión en diversas fases. Por ejemplo, los medios pueden optimizarse para cultivar un embrión hasta la fase de 4 células, hasta la fase de 8 células, desde la fase de 4 células hasta la fase de 8 células, hasta la fase de blastocisto, o desde las fases de 4 u 8 células hasta la fase de blastocisto. Por tanto, la naturaleza y concentración de los componentes esenciales y no esenciales de los cultivos puede variar; sin embargo, en cada medio de cultivo que incluye ácido lipoico (o un derivado del mismo) la concentración de ácido lipoico es deseablemente de desde 5 μ M hasta 40 μ M. En un cultivo de células de desarrollo secuencial, el ácido lipoico o derivados de ácido lipoico pueden estar presentes en un medio y ausente en otros.

Las mejoras ofrecidas por los presentes medios de cultivo pueden conseguirse para blastocistos maduros y desarrollados en condiciones de oxígeno ambientales (por ejemplo, aproximadamente el 20%) y condiciones de oxígeno reducidas (por ejemplo, aproximadamente el 5%). Esto es importante porque la mayoría de los programas de FIV cultivan gametos y embriones en condiciones de oxígeno ambientales, a pesar del hecho de que las condiciones de oxígeno reducidas simulan mejor el entorno del útero y proporcionan mejores resultados. Quinn, P., Harlow, G.M., “The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos *in vitro*”, J. Exp. Zool., octubre de 1978, 206(1):73-80.; Thompson, J.G., Simpson, A.C., Pugh, P.A., Donnelly, P.E., Tervit, H.R., “Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of preimplantation sheep and cattle embryos”, J. Reprod. Fertil., julio de 1990, 89(2):573-8. El motivo de esto es a menudo el coste de una incubadora de gas triple requerida para cultivar

en condiciones de oxígeno bajas. Las presentes composiciones de medios ofrecen por tanto un medio de cultivo más adecuado para acomodar embriones cultivados bajo estrés oxidativo mayor.

Un medio de cultivo típico para el cultivo de células de desarrollo, tales como embriones, incluirá agua, sales inorgánicas, una o más fuentes de energía, uno o más aminoácidos (incluyendo aminoácidos no esenciales y, opcionalmente, esenciales), como componentes centrales. Las fuentes de energía típicas en un medio de cultivo para embriones incluyen fuentes de energía de hidratos de carbono, tales como piruvato, lactato y glucosa. Las sales inorgánicas adecuadas incluyen, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KCl , MgSO_4 , NaCl , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 . Los aminoácidos no esenciales incluyen alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina. Los aminoácidos esenciales incluyen histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Además del ácido lipoico y componentes centrales, los medios de cultivo incluirán normalmente otros aditivos. Estos incluyen vitaminas, tales como biotina, pantotenato, ácido fólico, niacinamida, piridoxina, riboflavina y tiamina, e incluyen además factores de crecimiento, hormonas y antibióticos, tales como penicilina G y sulfato de estreptomicina. También pueden añadirse albúmina (por ejemplo, albúmina sérica humana o albúmina humana recombinante), polivinilpirrolidona, hialuronano, quelantes, tales como EDTA, y tampones, tales como tampón HEPES o tampón MOPS, al medio de cultivo. Los diversos componentes específicos que pueden incluirse también en los medios de cultivo incluyen, pero no se limitan a, cloruro de colina, hipoxantina, inositol, timidina, cianocobalamina, cisteamina, rojo de fenol y glutatión.

La concentración de los componentes centrales y otros aditivos en un medio de cultivo puede variar dependiendo de la fase de desarrollo del embrión para la que se optimiza el medio. Concentraciones típicas para las sales inorgánicas en los medios de cultivo pueden ser de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM o de aproximadamente 110 mM a aproximadamente 140 mM. Concentraciones típicas para las fuentes de energía en los medios pueden ser de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM. Concentraciones típicas para la cantidad total de aminoácidos en los medios de cultivo pueden ser de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 15 mM o de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 12 mM, o de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 6 mM. La composición de aminoácidos y concentraciones de los mismos puede variar dependiendo de la fase de desarrollo de las células en los medios de cultivo. Las vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y otros diversos componentes en el medio de cultivo tienden a añadirse a concentraciones bastante bajas, por ejemplo, 1 mM o menor, 0,5 mM o menor, o incluso 0,1 mM o menor.

Los presentes medios de cultivo pueden formularse añadiendo suficiente ácido lipoico o derivados de ácido lipoico a los medios de cultivo para embriones existentes para proporcionar una concentración de ácido lipoico o derivado de ácido lipoico de 5 μM a 40 μM . Los derivados de ácido lipoico incluyen moléculas derivadas del ácido lipoico que tienen efecto biológico equivalente o sustancialmente equivalente con respecto a la mejora de la supervivencia o desarrollo de células de desarrollo en cultivo. Por tanto, los derivados de ácido lipoico incluyen, pero no se limitan a, ácido lipoico metilado y DHLA. Para el fin de esta solicitud, los derivados también se refieren a otras moléculas de disulfuro/tióctico anfífilas biológicamente activas que tienen propiedades fisiológicas esencialmente equivalentes.

Puede añadirse el ácido lipoico o derivados de ácido lipoico como una mezcla de formas enantioméricas, o como un único enantiómero. En el último caso, el enantiómero R puede ser más deseable ya que es biológicamente más activo. Por ejemplo, el ácido lipoico podría añadirse a medios de cultivo sencillos disponibles comercialmente, tales como fluido tubárico humano (HTF), medio T6 de Whittingham y solución salina de Earle equilibrada (EBSS) (disponible de Irvine Scientific) que se han complementado con piruvato, glucosa y lactato como fuentes de energía. Estos medios sencillos se han empleado generalmente en entornos clínicos de FIV para inseminación de ovocitos y cultivo de embriones hasta transferencia en el día 2 ó 3. El ácido lipoico puede añadirse también a medios de cultivo para embriones más complejos diseñados para sustentar el crecimiento de embrión temprano. Tales medios incluyen medio de cultivo G1™ disponible de Vitrolife. Este medio se diseña para sustentar el desarrollo de embriones de fase de escisión hasta alrededor de la fase de 8 células. El medio contiene hidratos de carbono, aminoácidos, y quelantes para sustentar al embrión temprano. La formulación completa para el medio G1 se proporciona en la tabla 1.

Tabla 1. Composición de un medio de cultivo G1

Componente	A Concentración más preferida	B Intervalo preferido
NaCl	90,08	80,0-100
KCl	5,5	3,5-7,5
NaH_2PO_4	0,25	0,05-1,5
MgSO_4	1	0,2-2,0
NaHCO_3	25	15,0-30
CaCl_2	1,8	0,8-2,8
Glucosa	0,5	0,05-5,0
Lactato de Na (isómero L)	10,5	5,0-20,

Piruvato de Na	0,32	0,1-1,0
Alanina	0,1	0,01-0,5
Aspartato	0,1	0,01-0,5
Asparagina	0,1	0,01-0,5
Glutamato	0,1	0,01-0,5
Alanil-glutamina	0,5	0,1-1,0
Glicina	0,1	0,01-0,5
Prolina	0,1	0,01-0,5
Serina	0,1	0,01-0,5
Taurina	0,1	0,01-10,0
EDTA	0,01	0,005-0,20
HSA	5 mg/ml	1-10,0 mg/ml
Hialuronato	0,1 mg/ml	0,02-0,5 mg/ml

(Las concentraciones en la tabla 1 se proporcionan en mM, a no ser que se indique lo contrario.)

Alternativamente, el ácido lipoico o derivados de ácido lipoico pueden añadirse a medio de cultivo de FIV disponible comercialmente que puede sustentar embriones más allá del día 3 (fase de 8 células). Estos medios de cultivo se han diseñado para llevar embriones hasta la fase de blastocisto antes de la implantación. Según la presente invención, puede añadirse el ácido lipoico a estos medios para potenciar incluso adicionalmente el desarrollo de blastocistos. Un ejemplo incluye medio esencial modificado α (α MEM), descrito en Desai *et al.*, Human Reprod 12: 328-335 (1997). Un segundo ejemplo incluye medio HECM-6 más pantotenato. McKiernan SH y Bavister BD, Human Reprod 15: 157-164 (2000). Otros ejemplos incluyen los medios G2 disponibles de Vitrolife. G2 es un medio que se diseña para sustentar el desarrollo del embrión desde alrededor de la fase de 8 células (día 3) hasta la fase de blastocisto. El medio (tabla 2) contiene hidratos de carbonos, aminoácidos, y vitaminas para sustentar al embrión de última fase.

Tabla 2 - Composición de un medio de cultivo G2

Componente	A Concentración más preferida	B Intervalo preferido
NaCl	90,08	80,0-100
KCl	5,5	3,5-7,5
NaH ₂ PO ₄	0,25	0,05-1,5
MgSO ₄	1	0,2-4,0
NaHCO ₃	25	15-30,0
CaCl ₂	1,8	0,8-2,8
Glucosa	3,15	0,5-5,5
Lactato de Na (isómero L)	5,87	2,0-20,0
Piruvato de Na	0,1	0,01-1,0
Alanina	0,1	0,01-0,5
Aspartato	0,1	0,01-0,5
Asparagina	0,1	0,01-0,5
Glutamato	0,1	0,01-0,5
Alanil-glutamina	1	0,01-2,0
Glicina	0,1	0,01-0,5
Prolina	0,1	0,01-0,5
Serina	0,1	0,01-0,5
L-Arginina-HCl	0,6	0,1-1,2
L-Cistina 2HCl	0,1	0,05-0,25
L-Histidina-HCl-H ₂ O	0,2	0,1-0,4
L-Isoleucina	0,4	0,1-0,8
L-Leucina	0,4	0,1-0,8
L-Lisina-HCl	0,4	0,1-0,8
L-Metionina	0,1	0,05-0,25
L-Fenilalanina	0,2	0,1-0,4
L-Treonina	0,4	0,1-0,8
L-Triptófano	0,5	0,1-0,9
L-Tirosina 2Na	0,2	0,1-0,4
L-Valina	0,4	0,1-0,8
D-Ca Pantotenato	0,002	0,001-0,004
Cloruro de colina	0,007	0,003-0,01
Ácido fólico	0,0023	0,001-0,0045
i-Inositol	0,0111	0,005-0,02

Niacinamida	0,0082	0,004-0,016
Piridoxal HCl	0,0049	0,002-0,01
Riboflavina	0,0003	0,0001-0,0006
Tiamina HCl	0,003	0,001-0,006
HSA	5 mg/ml	1-10 mg/ml
Hialuronato	0,1 mg/ml	0,02-0,5 mg/ml

(Las concentraciones en la tabla 2 se proporcionan en mM, a no ser que se indique lo contrario.)

En una realización, los embriones en fase de 8 células se transfieren desde un medio de cultivo para embriones optimizado para sustentar el crecimiento de fase temprana (es decir, hasta la fase de 8 células) complementado con ácido lipoico hasta un medio de cultivo para embriones optimizado para sustentar el crecimiento de fase tardía (es decir, hasta la fase de blastocisto). El ácido lipoico puede añadirse o no a los últimos medios.

Los presentes medios de cultivo pueden formularse también añadiendo suficiente ácido lipoico o derivados de ácido lipoico a los medios de congelación o cultivo para gametos (ovocitos o espermatozoides) existentes para proporcionar una concentración de ácido lipoico de 5 μ M a 40 μ M. Las tablas 3-5 a continuación proporcionan medios de cultivo para gametos en los que puede incluirse ácido lipoico para proporcionar una supervivencia y un desarrollo celular mejorados.

Tabla 3 - Composición de medio de maduración de ovocitos

Componente	A Concentración más preferida	B Intervalo preferido
NaCl	90,08	80,0-100
KCl	5,5	3,5-7,5
NaH ₂ PO ₄	0,25	0,05-1,5
MgSO ₄	2	0,2-4,0
NaHCO ₃	25	15-30,0
CaCl ₂	1	0,8-2,8
Glucosa	3,15	0,5-5,5
Lactato de Na (isómero L)	5,87	2,0-20,0
Piruvato de Na	0,1	0,01-1,0
Alanina	0,1	0,01-0,5
Aspartato	0,1	0,01-0,5
Asparagina	0,1	0,01-0,5
Glutamato	0,1	0,01-0,5
Alanil-glutamina	1	0,01-2,0
Glicina	0,1	0,01-0,5
Prolina	0,1	0,01-0,5
Serina	0,1	0,01-0,5
Cisteamina	0,5	0,1-2,0
L-Arginina-HCl	0,6	0,1-1,2
L-Cistina 2HCl	0,1	0,05-0,25
L-Histidina-HCl-H ₂ O	0,2	0,1-0,4
L-Isoleucina	0,4	0,1-0,8
L-Leucina	0,4	0,1-0,8
L-Lisina-HCl	0,4	0,1-0,8
L-Metionina	0,1	0,05-0,25
L-Fenilalanina	0,2	0,1-0,4
L-Treonina	0,4	0,1-0,8
L-Triptófano	0,5	0,1-0,9
L-Tirosina 2Na	0,2	0,1-0,4
L-Valina	0,4	0,1-0,8
D-Ca Pantotenato	0,002	0,001-0,004
Cloruro de colina	0,007	0,003-0,01
Ácido fólico	0,0023	0,001-0,0045
i-Inositol	0,0111	0,005-0,02
Niacinamida	0,0082	0,004-0,016
Piridoxal HCl	0,0049	0,002-0,01
Riboflavina	0,0003	0,0001-0,0006
Tiamina HCl	0,003	0,001-0,006
HSA	5 mg/ml	1-10,0 mg/ml
Hialuronato	0,25 mg/ml	0,05-0,5 mg/ml

ITS	10 ng/ml	1-100 ng/ml
IGF-I	100 ng/ml	10-1000 ng/ml
EGF	100 ng/ml	10-1000 ng/ml
FSII	0,1 U/ml	0,01-10 U/ml
hCG	0,1 U/ml	0,01-10 U/ml

*Las concentraciones están en mM, a no ser que se indique lo contrario; el medio es acuoso.

Tabla 4 - Composición de medio de preparación de espermatozoides y fecundación*

Componente	A Concentración más preferida	B Intervalo preferido
NaCl	100	75-100
KCl	5,5	3,5-7,5
NaH ₂ PO ₄	0,5	0,05-1,5
MgSO ₄	1	0,2-4,0
Glucosa	3,15	0,5-5,6
Lactato de Na (isómero L)	5	2,0-20
Piruvato de Na	0,32	0,1-0,5
NaHCO ₃	25	15-30
CaCl ₂	1,8	0,8-2,8
Glutati6n	1 mg/ml	0,5-5,0 mg/ml
Alanina	0,1	0,01-0,5
Aspartato	0,1	0,01-0,5
Asparagina	0,1	0,01-0,5
Glutamato	0,1	0,01-0,5
Glicina	0,1	0,01-0,5
Prolina	0,1	0,01-0,5
Serina	0,1	0,01-0,5
Taurina	0,1	0,01-10,0
HSA	5 mg/ml	1,0-10,0 mg/ml
Hialuronato	0,1 mg/ml	0,02-0,5 mg/ml
Penicilina	0,06 mg/ml	0,01-0,1 mg/ml
Estreptomicina	0,05 mg/ml	0,01-0,1 mg/ml

*Las concentraciones están en mM, a no ser que se indique lo contrario; el medio es acuoso.

5

Tabla 5 - Composición de un medio para inyección de espermatozoides intracitoplásmica *

Componente	A Concentración más preferida	B Intervalo preferido
NaCl	90,08	75,0-105
KCl	5,5	3,5-7,5
MgSO ₄	2	0,4-4
NaHCO ₃	5	2,0-10
MOPS/HEPES	20	10-25,0
CaCl ₂	1	0,5-2,0
Lactato de Na (isómero L)	10,5	5,0-20
Piruvato de Na	0,32	0,1-1,0
Alanil-glutamina	0,5	0,1-2,0
Glicina	0,5	0,1-2,0
Prolina	0,1	0,05-2,0
Serina	0,1	0,05-2,0
Taurina	0,1	0,05-5,0
HSA	5 mg/ml	1-10,0 mg/ml
Hialuronato	0,1 mg/ml	0,02-0,5 mg/ml
PVP	10%	1-20%

*Las concentraciones están en mM, a no ser que se indique lo contrario; el medio es acuoso.

Ejemplos

10

Ejemplo 1 - Ácido lipoico aumenta el número de células del blastocisto de embriones cultivados

Según la presente invención, se usó una composición de medio de cultivo que comprende ácido lipoico durante el desarrollo de embriones de ratón *in vitro*. El ácido lipoico a una concentración de 5 µM a 40 µM muestra tener

efectos significativos beneficiosos sobre el desarrollo del embrión de ratón, incluyendo un aumento significativo en el número de células del blastocisto y masa celular.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Se disolvió ácido lipoico en etanol. Se preparó una disolución de trabajo 100 mM en EtOH al 100% con las diluciones apropiadas hechas a los medios de cultivo después de esto (concentraciones finales de 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M). Se usó un control vehicular, equivalente a la dilución de la disolución de mayor concentración (0,1%), en todos los experimentos de cultivo. Se recogieron los cigotos de ratones hembra exogámicas CF1 de 4 semanas de edad. Se recogieron los cigotos encerrados en cúmulos a las 21 h tras hCG y se desollaron con 1 mg/ml de hialuronidasa en G-MOPS complementada con 5 mg/ml de albúmina sérica humana. Se incubaron los cultivos o bien al 5% o bien al 20% de O₂. Tras cuatro días de cultivo, se analizó el desarrollo del blastocisto y se contó el número de células en 200 embriones cultivados por tratamiento.

Los resultados se muestran en las figuras 1 (20% de O₂) y 2 (5% de O₂). Los datos se basan en 200 embriones cultivados por estudio. Cuando se sometió a prueba el ácido lipoico por encima de una concentración de 1 a 100 μ M en embriones de ratón (CF1) exogámicas en cultivo, los blastocistos resultantes tuvieron un número de células significativamente mayor cuando se expusieron a 10 μ M. A una concentración de 1 μ M de ácido lipoico, no se observó un aumento estadísticamente significativo en el número de células a una concentración de o bien el 5% o bien el 20% de oxígeno. Además, el efecto beneficioso del ácido lipoico se perdía a concentraciones mayores. De hecho, a una concentración de 100 μ M de ácido lipoico, los embriones tenían un número de células significativamente menor que los embriones correspondientes madurados en el medio de control. Los datos para las figuras 1 y 2 se presentan en las tablas 6 y 7, respectivamente, que también proporcionan los resultados para el trofotodermo, la masa celular interna (ICM) y la razón ICM.

Tabla 6

	n	Día 5, % de blast.	trofotodermo	n.º de células total	ICM	Razón ICM
Control	202	58,91%	51,17	64,49	13,28	20,60%
Vehículo	216	42,59%	50,51	62,11	11,60	18,68%
1 μ M	198	59,18%	55,30	68,37	13,07	19,12%
10 μ M	231	61,47% [‡]	61,054 ^{‡‡}	77,527 ^{‡‡‡}	16,4731 ^{‡‡‡‡}	21,25%
100 μ M	201	42,57%	43,6667	53,9583	10,2916	19,07%

[‡] P < 0,0001; ^{‡‡} P < 0,0022; ^{‡‡‡} P < 0,0002; ^{‡‡‡‡} P < 0,0001, tal como se calcula usando la prueba de la t de Student

Tabla 7

		Día 5, % de blast.	trofotodermo	n.º de células total	ICM	Razón ICM
Control	n = 205	66,34%	71,91	92,12	20,21	21,93%
Vehículo	n = 209	66,03%	69,99	87,81	17,82	20,29%
1 μ M	n = 209	76,15%	68,57	85,40	16,83	19,71%
10 μ M	n = 215	76,74% [#]	79,28 ^{##}	101,77 ^{###}	22,49 ^{####}	22,10%
100 μ M	n = 196	53,13%	60,61	74,21	13,61	18,33%

[#] P < 0,023; ^{##} P < 0,013; ^{###} P < 0,002; ^{####} P < 0,001, tal como se calcula usando la prueba de la t de Student

Ejemplo 2 - Ácido lipoico en cultivos de FIV secuenciales de embriones de ratón de día 4

Se hicieron crecer embriones de ratón CF1 o bien en G1 solo o bien en G1 más 10 μ M de ácido lipoico. Tras 48 horas, se movieron los embriones de ambos grupos de tratamiento a G2. Se incubaron todos los cultivos en O₂ bajo. Se evaluaron las tasas de compactación y se midieron las tasas de desarrollo de blastocistos a las 71 y 78 horas. Entonces se tiñeron y contaron los blastocistos de manera diferenciada. Los resultados se muestran en la tabla 8. La adición de ácido lipoico a G1 aumentó el número de masa celular interna y el porcentaje de masa celular interna del total.

Tabla 8

Tratamiento	n	Día 3, %, a.m.	Día 4, % de blast., a.m.	Día 4, % de blast., p.m.	% expandido en el día 4	TE	ICM	Total	% de ICM
G1 (Control)	58	81,0	22,7	51,7	19,0	34 $\pm$ 2	11,4 $\pm$ 1	45 $\pm$ 2	25%

G1 + LA 10 μ M	58	81,0	22,4	65,5	39,7	34 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1**	50 $\pm$ 2**	31%**
-----------------------	----	------	------	------	------	------------	--------------	--------------	-------

Significativamente diferente del control; *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$, tal como se calcula usando la prueba de la t de Student

Ejemplo 3- Intervalo de concentración eficaz para ácido lipoico en el desarrollo del embrión de ratón

Se estableció el intervalo eficaz de concentraciones de ácido lipoico para potenciar el desarrollo de blastocistos y número de células usando embriones de ratón CF1. Los resultados se muestran en la tabla 9. Los datos muestran que el ácido lipoico es eficaz entre 5 y 40 μ M en promover el desarrollo de blastocistos y aumentar el número de células. Por encima de estas concentraciones, el ácido lipoico produce un menor desarrollo de blastocistos hacia el día 5 y un menor número de células relativo al control.

Tabla 9. Efecto de la concentración de ácido lipoico sobre el desarrollo de cigotos de ratón CF1 cultivados al 20% de oxígeno

	n	Día 3 (% de compactación)	Día 4 (% de blast. total)	Día 5 (% de blast. total)	Día 5 (% de eclosión)	Número de células total
Control	66	34,3%	50,0%	75,0%	34,4%	80,2 $\pm$ 4,9
LA 5 μ M	62	38,9%	51,6%	81,8%	40,9%	90,2 $\pm$ 4,8
LA 10 μ M	62	51,4%	62,9%	92,7%	40,0%	91,3 $\pm$ 4,7
LA 20 μ M	63	26,5%	42,9%	73,1%	31,3%	94,0 $\pm$ 7,2
LA 40 μ M	67	22,9%	37,3%	74,6%	28,4%	69,4 $\pm$ 5,8
LA 80 μ M	65	22,9%	4,6%	29,7%	9,4%	34,0

Ejemplo 4 – Efectos protectores del ácido lipoico frente a especies reactivas del oxígeno.

Con el fin de determinar si el ácido lipoico tiene un efecto antioxidante, se realizaron una serie de experimentos usando la tinción fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DFFDA), que reacciona con productos intermedios de especies reactivas del oxígeno (ROS). Se añadió H2DFFDA 200 μ M en DMSO a GMOPS-Plus (disponible de Vitrolife). Se disolvió el ácido lipoico en EtOH siendo la concentración final dentro del medio de EtOH al 0,1%. Entonces se fotooxidó cada gota con 4 exposiciones sucesivas de 2,5 minutos usando luz UV para generar ROS.

La figura 3 muestra los efectos de ácido lipoico sobre la reducción de la generación de ROS dentro de los medios de cultivo. Todos los resultados se basan en la comparación con respecto al grupo vehicular (EtOH al 0,95%), que no fue significativo en comparación con el grupo de control. La inclusión de ácido lipoico a todas las concentraciones dio como resultado un descenso dependiente de la concentración en la generación de oxígeno reactivo, indicando por tanto que el ácido lipoico tiene un efecto antioxidante.

Ejemplo 5 - Efecto de los medios G de ácido lipoico sobre el desarrollo de embriones humanos.

Según la presente invención, se examina el efecto de medios de cultivo que contienen ácido lipoico sobre el desarrollo de embriones humanos. La mitad de los embriones de pacientes con buen pronóstico se cultivan en medios de cultivo G1 libres de ácido lipoico (es decir, el control), mientras que la otra mitad se cultivan en medio G1 que contiene ácido lipoico 10 μ M (es decir, el medio de ácido lipoico elevado).

Los datos son consistentes con los obtenidos en el modelo de ratón. Los embriones se desarrollan más rápido hasta la fase de 8 células y de blastocisto en el medio de ácido lipoico elevado en comparación con el control.

Para los fines de esta divulgación y a no ser que se especifique lo contrario, “un” o “uno/una” significa “uno/una o más”.

REIVINDICACIONES

1. Método para el cultivo de células de desarrollo, comprendiendo el método cultivar una célula madre, gameto, cigoto o embrión en un medio de cultivo de células de desarrollo que comprende:
5 (a) agua;

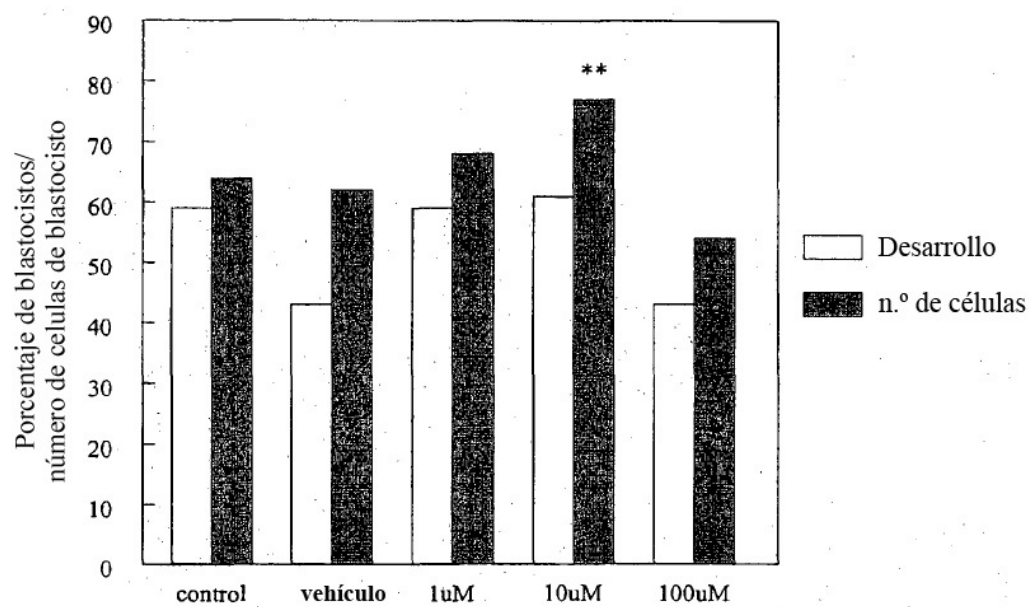
 (b) sales inorgánicas;
10 (c) al menos una fuente de energía; y

 (d) ácido lipoico, los derivados de ácido lipoico, ácido lipoico metilado o dihidrolipoato, o una combinación de los mismos a una concentración de 5 μ M a 40 μ M.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo de células de desarrollo comprende además uno o más aminoácidos.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la célula madre, gameto, cigoto o embrión se cultiva en condiciones de oxígeno ambientales.
20
4. Método según la reivindicación 1, en el que la célula madre, gameto, cigoto o embrión se cultiva en condiciones de oxígeno reducidas.
5. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de cultivo de una célula madre, gameto, cigoto o embrión comprende cultivar un embrión humano.
25
6. Método según la reivindicación 1, en el que la etapa de cultivo de una célula madre, gameto, cigoto o embrión comprende:
30 cultivar un embrión hasta la fase de 4 células;

 cultivar un embrión hasta la fase de 8 células;

 cultivar un embrión hasta la fase de blastocisto;
35 cultivar un embrión desde la fase de 8 células hasta la fase de blastocisto;

 cultivar un embrión hasta la fase de 3 días; o
40 cultivar un embrión hasta la fase de 5 días.
7. Método según la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo sustenta el desarrollo de embriones de mamíferos hasta la fase de blastocisto, y en el que los embriones de mamíferos son embriones de ratón CF1.
45
8. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que el medio de cultivo de células de desarrollo tiene una concentración de ácido lipoico de 5 μ M a 20 μ M.
9. Método según la reivindicación 8, en el que el medio de cultivo de células de desarrollo tiene una concentración de ácido lipoico de 5 μ M a 10 μ M.
50
10. Método según la reivindicación 8, en el que el medio de cultivo de células de desarrollo tiene una concentración de ácido lipoico de 8 μ M a 12 μ M.
- 55 11. Método según la reivindicación 8, en el que el medio de cultivo de células de desarrollo tiene una concentración de ácido lipoico de 10 μ M.

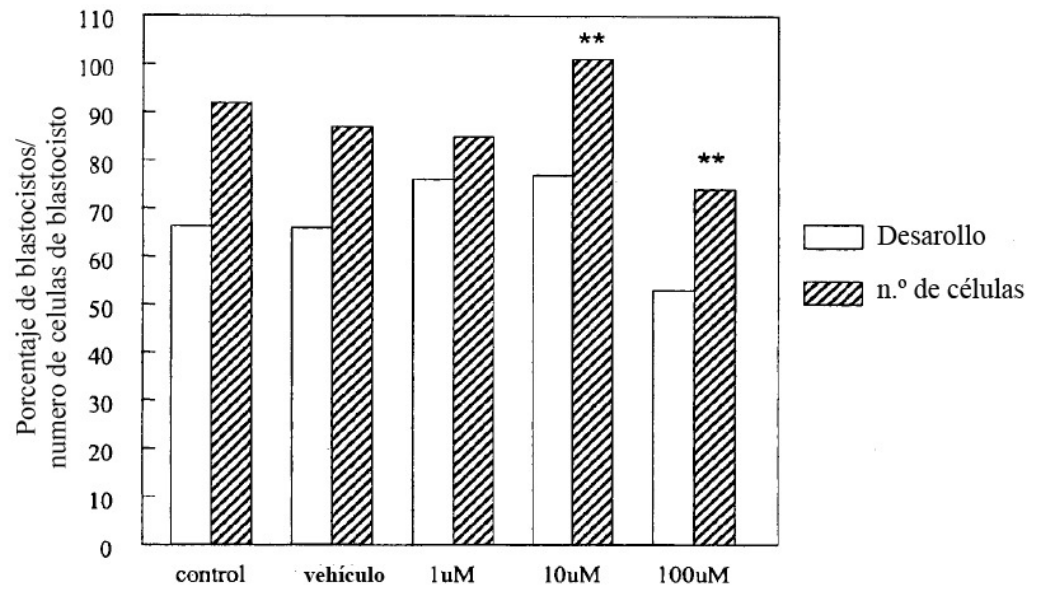
FIG. 1

Se cultivaron embriones en oxígeno al 20%

n= 200 embriones cultivados por tratamiento.

**, significativamente diferente de los controles

FIG. 2



Se cultivaron embriones en oxígeno al 5%
 n= 200 embriones cultivados por tratamiento
 **, significativamente diferente de los controles

FIG. 3

