

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 348**

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)

C12N 5/075 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2012** **PCT/EP2012/075355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013** **WO13087755**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2012** **E 12812910 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018** **EP 2790499**

54 Título: **Medios de cultivo para tratar gametos femeninos y embriones en técnicas de reproducción médicamente asistida**

30 Prioridad:

13.12.2011 IT FI20110271

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

17.10.2018

73 Titular/es:

LO. LI. PHARMA S.R.L. (100.0%)

Via dei Luxardo 33

00156 Roma, IT

72 Inventor/es:

UNFER, VITTORIO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 686 348 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 tratar gametos femeninos y embriones en técnicas de reproducción médicamente asistida

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los medios de cultivo, en particular para tratar ovocitos y embriones en reproducción asistida.

Estado de la técnica

Se estima que la infertilidad afecta a alrededor de 80 millones de personas en el mundo y que al menos una de cada diez parejas está afectada por infertilidad primaria (sin hijos) o infertilidad secundaria (con hijos).

10 Las causas de la infertilidad son atribuibles tanto a trastornos como a enfermedades del sistema reproductivo masculino o femenino, exacerbadas si están presentes en ambos cónyuges, y a factores ambientales y estilos de vida social que afectan a la salud reproductiva a diferentes niveles.

15 Aunque desde un punto de vista biológico el periodo más fértil de la mujer es alrededor de los 20 años de edad, la educación y consolidación de una carrera a menudo dan como resultado que las mujeres intenten quedarse embarazadas alrededor de los 33-35 años de edad, una edad a la que el potencial reproductor está ya en brusco declive. Por tanto, incluso en ausencia de trastornos reproductivos específicos, el mero desplazamiento temporal en el intento de quedarse embarazada es a menudo suficiente para exacerbar aquellas causas de subfertilidad que pueden estar ya presentes en la pareja.

20 En los últimos 30 años, la investigación en el campo de la biología reproductiva ha proporcionado un conocimiento fundamental para la comprensión de los mecanismos que son la base de la maduración y fertilización de gametos y el desarrollo del embrión. Este conocimiento ha proporcionado la base para el desarrollo de biotecnologías que se aplican actualmente en la procreación médicamente asistida.

25 La eficacia de las técnicas de procreación médicamente asistida está estrechamente relacionada con el número y la calidad de los cigotos obtenidos, que depende del número y la calidad de los ovocitos recogidos y del número (motilidad y morfología) de los espermatozoides recogidos; hoy en día, la tasa de éxito porcentual de las técnicas de MAP es de alrededor del 30 %.

Se ha propuesto un posible papel de sustancias naturales, incluyendo también inositol, en la maduración de gametos, sin embargo los estudios llevados a cabo en ovocitos de origen bovino han mostrado que el mioinositol no tenía efecto sobre la tasa de desarrollo de los blastocitos de embriones cultivados en un medio completado con dichas sustancias (Momozawa et al. 2011 Journal of reproduction and development).

30 En particular, el medio usado en estos estudios no era un medio desarrollado específicamente para técnicas de MAP humana y contenía ya mioinositol.

Compendio de la invención

La invención se refiere a medios de cultivo para uso en el tratamiento de ovocitos y embriones en técnicas de reproducción médicamente asistida.

Descripción detallada de la invención

La presente invención permite satisfacer las necesidades anteriormente mencionadas gracias a medios de cultivo completados con inositol, para tratar ovocitos y embriones en técnicas de reproducción médicamente asistida.

Medio de cultivo según esta invención significa los medios de cultivo normales usados para el tratamiento *in vivo* de ovocitos y embriones que, además de los componentes habituales, contienen sin embargo también inositol.

40 En particular, según la invención, un medio de cultivo adecuado para tales fines puede comprender inositol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio, lactato de calcio, bicarbonato de sodio, glucosa, piruvato de sodio, lactato de sodio, taurina, alanina-glutamina, EDTA, gentamicina, rojo fenol, seroalbúmina humana y HEPES.

45 Según la invención, inositol significa cualquiera de los nueve estereoisómeros diferentes del mismo: mioinositol, D-quiroinositol; L-quiroinositol, esciloinositol, mucoinositol, neoinositol, aloinositol, epinositol y cisinosisol o mezclas de los mismos; prefiriéndose mioinositol.

La concentración final de inositol está preferiblemente entre 0,5 mg/ml y 50 mg/ml (preferiblemente 1 mg/ml y 20 mg/ml).

50 El inositol puede añadirse a los medios de cultivo comunes solo o en combinación con otras sustancias, en forma de polvo o solución.

Según una realización particular de la invención, además del inositol pueden añadirse también melatonina y glutatión al medio de cultivo tradicional; si están presentes, estos están normalmente en una cantidad entre 10-300 pg/ml y 0,23-23,22 mg/ml.

Según una realización particular de la invención, un medio de cultivo consiste en lo siguiente:

Componente	Cantidad
Mioinositol	1-20 mg/ml
Cloruro de sodio	5-7 mg/ml
Cloruro de potasio	0,3-0,5 mg/ml
Sulfato de magnesio	0,02-0,03 mg/ml
Sulfato de potasio	0,002-0,01 mg/ml
Lactato de calcio	0,05-0,07 mg/ml
Bicarbonato de sodio	0,3-0,4 mg/ml
HEPES	4,5-5,5 mg/ml
Glucosa	0,45-0,55 mg/ml
Piruvato de sodio	0,2-0,4 mg/ml
Lactato de sodio	0,00045-0,00055 mM
Taurina	0,008-0,01 mg/ml
Alanilglutamina	0,2-0,3 mg/ml
EDTA	0,002-0,003 g/ml
Gentamicina	0,004-0,005 mg/ml
R rojo fenol	2,7-,3,3 mg/l
Seroalbúmina humana	4,5-5,5 mg/l

5 Ejemplo 1

Se disolvieron 133 mg de mioinositol en 1 ml de solución salina. Se diluyó la solución así preparada 66 veces en medio de cultivo para obtener un nuevo medio de cultivo que tiene una concentración de mioinositol de 2 mg/ml.

10 Como se registra con más detalle en el ejemplo siguiente, se encontró sorprendentemente que, al usar el medio de cultivo como se prepara anteriormente, se fecundaron un número mayor de ovocitos y se daba origen a un embrión si se lleva a cabo el procedimiento de fecundación en un medio con inositol añadido (tasa de fecundación).

15 Además, un mayor número de embriones cultivados en un medio con inositol añadido continuaron por los diversos estadios del desarrollo del embrión. En particular, después de 96 h de la fecundación, un mayor número de embriones habían alcanzado el estado de blastocito o blastocito expandido, indicando también una velocidad en el proceso de desarrollo embrionario similar a la velocidad fisiológica. Además, después de la transferencia de los embriones cultivados en presencia de inositol a madres de alquiler, se observó que un mayor número de embriones eran capaces de implantarse en el útero como se evidencia por el número de nacimientos.

Ejemplo 2

20 Se dividieron 160 ovocitos de ratón C57Bl6 igualmente en dos grupos. Los ovocitos del primer grupo se fecundaron y se cultivaron los embriones resultantes usando las técnicas normales de la técnica anterior, en un medio de fecundación *in vitro* del tipo usado en clínicas de fecundación asistida, pero con mioinositol añadido a una concentración final de 2 mg/ml; por otro lado, los ovocitos del segundo grupo no se fecundaron, y se cultivaron los embriones resultantes *in vitro* en el mismo cultivo de fecundación pero sin mioinositol.

Los resultados obtenidos han mostrado que la tasa de fecundación es mayor en el medio con mioinositol añadido, aumentando de 40 a 65 %.

25 Además, después de 96 h de cultivo solo el 5 % de los embriones cultivados en presencia de mioinositol vieron

detenido el desarrollo en el estadio celular 1 (embriones que nunca se desarrollarán) frente a un 19 % de los embriones de control (embriones cultivados en un medio sin mioinositol).

Del mismo modo, un 50 % de los embriones cultivados en mioinositol alcanzan el estado de blastocito expandido frente a un 31 % de aquellos cultivados en un medio de control.

- 5 Al transferir el mismo número de embriones a madres de alquiler, se observó entonces que el grupo de embriones cultivados en mioinositol daba como resultado un número de nacimientos alrededor de un 30 % mayor que en el grupo de control.

REIVINDICACIONES

1. Medios de cultivo para uso en el tratamiento de ovocitos y embriones en técnicas de reproducción médicamente asistida, en los que estos medios de cultivo se completan con o contienen inositol y en los que la concentración final de inositol está entre 1 mg/ml y 20 mg/ml.
- 5 2. Medio de cultivo para uso en un método según la reivindicación 1, en el que dicho inositol se selecciona de: mioinositol, D-quiroinositol; L-quiroinositol, esciloinositol, mucoinositol, neoinositol, aloinositol, epinositol y cisinositol, o mezclas de los mismos.
3. Medio de cultivo para uso en un método para uso en un método según las reivindicaciones 1-2, que comprende: inositol, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, sulfato de potasio, lactato de calcio, bicarbonato de sodio, glucosa, piruvato de sodio, lactato de sodio, taurina, alanina-glutamina, EDTA, gentamicina, rojo fenol, seroalbúmina humana y HEPES.
- 10 4. Medio de cultivo para uso en un método según las reivindicaciones 1-3, en el que el inositol es mioinositol.
5. Medio de cultivo para uso en un método según las reivindicaciones 1-4, que comprende además metionina y glutatión.
- 15 6. Medio de cultivo para uso en un método según las reivindicaciones 1-5, en el que dicho medio de cultivo contiene:

Componente	Cantidad
Mioinositol	1-20 mg/ml
Cloruro de sodio	5-7 mg/ml
Cloruro de potasio	0,3-0,5 mg/ml
Sulfato de magnesio	0,02-0,03 mg/ml
Sulfato de potasio	0,002-0,01 mg/ml
Lactato de calcio	0,05-0,07 mg/ml
Bicarbonato de sodio	0,3-0,4 mg/ml
HEPES	4,5-5,5 mg/ml
Glucosa	0,45-0,55 mg/ml
Piruvato de sodio	0,2-0,4 mg/ml
Lactato de sodio	0,00045-0,00055 mM
Taurina	0,008-0,01 mg/ml
Alanilglutamina	0,2-0,3 mg/ml
EDTA	0,002-0,003 g/ml
Gentamicina	0,004-0,005 mg/ml
Rojo fenol	2,7-,3,3 mg/l
Seroalbúmina humana	4,5-5,5 mg/l