



(12) PATENT

(19) NO

(11) 331476

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 5/075 (2010.01)

C12N 5/076 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20076604	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr
(22)	Inng.dag	2007.12.21	(85)	Videreføringsdag
(24)	Løpedag	2007.12.21	(30)	Prioritet
(41)	Alm.tilgj	2009.06.22		
(45)	Meddelt	2012.01.16		
(73)	Innehaver	Ali Bin M Abdullah Jaffar, A4-3 Kondo Danau Murni Taman Danau Desa, MY-58100 KUALA LUMPUR, Malaysia		
(72)	Oppfinner	Jaffar Ali Bin M Abdullah, A12-07 Block Aman, Danau Idaman Condominium, Taman Danau Desa, MY-58100 KUALA LUMPUR, Malaysia		
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge		
(54)	Benevnelse	Proteinfri gamete- og embryo-håndtering samt dyrkningsmedieprodukter inneholdende metylcellulose		
(56)	Anførte publikasjoner	ALI, J., Middle East Fertility Society Journal, 2004, Vol. 9, No. 5, side 118-127., ALI, J. et al., Formulation of a protein-free medium for human assisted reproduction, Human Reproduction, 2000, Vol. 15, No. 1, side 145-156., CA 2603646 A1, CARO, CM. and TROUNSON, A., Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer, 1986, Vol. 3, No.4, side 215-217., BRYANT JC., Methylcellulose effect on cell proliferation and glucose utilization in chemically defined medium in large stationary cultures, Biotechnology and Bioengineering, 1969, Vol. XI, side 155-179., STEWART, G.J., et al., Short Technical Reports, Methylcellulose protects the ability of anchorage-dependent cells to adhere following isolation and holding in suspension, BioTechniques, 1995, Vol. 19, side 598-604., Produktinformasjon methylcellulose hentet 2008.07.23 fra http://www.sigmaaldrich.com/sigma-aldrich/product_information_sheet/m0262pis.pdf , US 4205126 A, US 20060292688 A1, SUMMERS, M.C. et al., Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues, Human Reproduction, 2003, Vol.9, No.6, side 557-582.		
(57)	Sammendrag			

Denne oppfinnelsen beskriver en hovedsakelig proteinfri celledyrkningsløsning for assisterte reproduksjonsteknologier og fremgangsmåte for anvendelse derav.

PROTEINFRI GAMETE- OG EMBYRO-HÅNTERING SAMT DYRKNINGSME- DIAPRODUKTER INNEHOLDENDE METYLCELLULOSE

Foreliggende oppfinnelse angår i hovedsak proteinfrie dyrkningsmedier (PFM) spesialisert og optimalisert for humane reproduksjons- og fertilitetsprogrammer omfattende de trekk som er angitt i krav 42 og 43. De i hovedsak proteinfrie medierprodukter som er beskrevet heri, er anvendelige for å forhindre overføring av proteinbundne patogener innbefattende blant annet og spesielt prioner til pasienter som undergår behandling mot barnløshet, til nyfødte unnfanget fra Assistert Reproduksjons Teknologi (ART) og til arbeidere innenfor disse arbeidsområder, og som spesielt angår anvendelse innen human ART.

BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Konvensjonelle kommersielt tilgjengelige embryo dyrkningsmedier for humane ART-prosedyrer inneholder human serum albumin (HSA) oppnådd fra humane blod- og vevskilder. I enkelte laboratorier blir bovin serum albumin (BSA) også brukt som en kilde for protein i human embryo dyrkningsprosedyrer (Loutradis et al., 1992; Quinn, 1994) på liknende måte oppnådd fra blod- og vevskilder fra kyr. Effektiviteten av medier inneholdende HSA og BSA ble rapportert å være like (Staessen et al., 1998). Anvendelsen i kulturmedium av protein oppnådd fra donorer (humane eller bovine) har potensialet å overføre sykdommer til pasienter som undergår assistert befruktningsbehandling. Dannelsen av levedyktige humane embryoer et et kjemisk definert dyrkningssystem (uten tilsatt protein eller albumin eller animalsk eller humant avledet proteinekstrakt) som starter fra oocyt-innsamling, fulgt av sædvasking, inseminasjon, befruktning opp til spaltet embryo-stadium og til slutt embryooverføring har ikke blitt beskrevet, selv om kjemisk definerte medier fra mus, kanin og primater har blitt rapportert i de senere år (Spindle, 1995; Li et al., 1996; Schramm og Bavister, 1996). Tidligere krav på et kjemisk definert proteinfritt medium (PFM) for human anvendelse var faktisk ikke fullstendig proteinfrie fordi sæden som var ment for befruktning fremdeles ble fremstilt i medium som inneholdt serumproteiner (Mohr og Trounson, 1986; Serta og Kiessling, 1997 (Sammendr.); Parinaud et al., 1999). Et fullstendig proteinfritt medium for ART-prosedyrer har til nå tidligere ikke blitt beskrevet..

Tilgjengeligheten av et kjemisk definert medium benyttet for dannelse av levedyktige tidlig spaltningsstadium humane embryoer er ønsket innen faget for å sikre sikkerheten av pasienter som undergår assistert reproduksjonsbehandling og som

unngår anvendelsen av potensielt farlig donorprotein. Bekymring over mulig overføring av patogene sykdommer, spesielt virale sykdommer så som ervervet immunsvikt sykdomssyndrom (AIDS) og hepatitt eller Creutzfeldt-Jacobs sykdom (CJD) overført av prioner eller andre i blodavledete produkter, har ført til at et antall selskaper som tilbyr helseservice innen området ART over hele verden søker alternative(r) for donorprotein for sine embryokulturer og håndteringsprosedyrer.

Overføringen av en dødelig viral sykdom (AIDS) til blødere via blodavledete produkter er godt dokumentert (se for eksempel Craven et al., 1997, *Med. Sci Law* 37: 215-227; Keshavjee et al., 2001, *Soc. Sci. Med.* 53: 1081-1094; Weinberg et al., 2002, *Ann. Intern. Med.* 136: 312-319; Evatt, 2006, *Semin. Hematol.* 43: S4-9). Humant veksthormon ekstrahert fra hypofysen ble funnet å være i stand til å overføre CJD til mennesker (Esmonde et al., 1994) og injeksjoner av humant gonadotropin kunne også overføre CJD fra person til person (CDC, 1985). CJD kan bli overført via blod (selv om titeren av CJD-prioner er lav i blod; Heye et al., 1994). Tidligere inntraff en epidemi av hepatitt B i omkring 200 IVF-pasienter som mottok embryoer dyrket i medium inneholdende sammenslåtte sera smittet med hepatitt B-virus (van Os et al., 1991). Nylig ble det vitenskapelige samfunn stilt overfor det dilemma om å måtte informere sine pasienter om at et kommersielt preparat av et dyrkningsmedium benyttet for embryokultur og -håndtering kunne være forurensset med albumin gitt av en person som senere døde av CJD (Kenmann, 1998).

Det finnes et antall rapporter på utvikling av museblastocyster fra zygote og spaltede stadier i et proteinfritt medium. De tidligste rapporter innbefatter dem av Brinster (1965) og Cholewa og Whitten (1970) som benyttet polyvinylpyrrolidon (PVP) som er et kolloid av høyere molekylvekt, som et smøremiddel og for å øke viskositeten av mediet. Etterfølgende dette arbeidet har et antall andre arbeidere med hell lyktes i å dyrke muse- så vel som andre pattedyrembryoer i proteinfrie medier (Dandekar og Glass, 1990; Spindle, 1995; Li et al., 1996; Schramm and Bavister, 1996). I nylige år har i tillegg til PVP, polyvinylalkohol (PVA) (Bavister, 1995) også blitt anvendt til å erstatte serumprotein i dyrkningsmedium. F.eks. undersøkte Biggers et al. (1997) effekten av å erstatte bovin serum albumin (BSA) med polyvinylalkohol (PVA) og/eller aminosyrer på musezygotutvikling. De observerte at PVA ikke kunne substitueres fullstendig med BSA i museembryodyrkningsmediumet. Effekten av PVA på hastighet av blastocystutvikling var bare litt mindre enn med BSA, men hastigheten av partiell utklekking var signifikant mindre. Substitusjon av BSA med PVA senket totalresponsen, men førte ikke til store perturbasjoner.

I tillegg til dens mange biologiske roller, gir serumproteiner anvendelige fysiske attributter slik som smøring og viskositet i dyrkningsmediet. Økt viskositet og smøring i dyrkningsmediet er påkrevd for å lette håndtering og manipulasjon av embryoet og for å forhindre det fra å feste seg til veggene av dyrkningsskålen og embryooverføringskatetre. Inkorporeringen av PVP og PVA tjener hovedsakelig til å
 5 duplisere de fysiske attributtene av serumproteiner. Imidlertid er PVP og PVA ikke kilder til fiksert nitrogen og de utviser ikke de ulike biologiske rollene til protein. I tillegg har de teratologiske egenskapene av PVP og PVA ikke blitt fullstendige undersøkt, hvilket gjør deres anvendelse i human terapeutisk assistert reproduksjon
 10 tvilsomme (Garnder og Lane, 1998a).

Noen forskere har forsøkt å generere levedyktige humane embryoer i et proteinfritt dyrkningssystem, mest nylig Serta et al. (1997) og Parinaud et al. (1998a). Imidlertid framstilte Serta og medarbeidere (1997) deres spermatozoa for inseminasjon nedsvømming gjennom en kolonne av BSA (selv om etterfølgende dyrkning ble utført i et proteinfritt medium). Disse arbeideren oppnådde en graviditetsrate på 31
 15 % (n=45) hvorav noen har holdt frem til termin med fødsel av normalt avkom. Parinaud et al. (1998a) oppnådde befruktninger med spermatozoa fremstilt i et proteinfritt medium når inseminasjon ble utført i det samme mediet. Imidlertid ble de resulterende zygottene dyrket i BM1-medium, og selv om denne referansen ikke
 20 spesifiserte hvorvidt deres BM1-medium inneholdt protein, antok en tidligere publisasjon fra samme gruppe at BM1-mediet inneholdt 1 % HSA (Parinaud et al., 1998b).

Noen arbeidere har vist at erstatning av serumprotein med en enkelt antioksidant og en chelator slik som EDTA (Mehta og Kiessling, 1990; Serta et al., 1997) ikke
 25 svekker befruktning og spaltning av levedyktige embryoer i mus og menneske. Imidlertid antydet Serta et. al. (1997) at embryooverføringskateteret skal renses grundig med det proteinfrie mediet, som antyder embryoenes tendenser til å feste seg til den indre veggen av embryooverføringskateter. Serumprotein har også en
 30 rolle i å opprettholde pH i dyrkningsmediet (Moessner et al., 1993). Ved siden av dens rolle som næring i biologiske systemer, har protein et antall andre roller slik som kjedebrytende antioksidant og en chelator for metallioner (Barber, 1961; Vidlakova et al., 1972; Wayner et al., 1987).

De fysiologiske funksjonene av albumin- og plasmaproteiner generelt er godt dokumenterte. Rollen til albumin i å forhindre membranperoksidering indikerer en direkte rolle i membranstabilitet. Det er involvert i kapillarmembranpermeabilitet og i
 35

osmoseregulering. Albumin tilveiebringer 80 % av det totale kolloidosmotiske tryk-
ket i plasma. Albumin er involvert i frakten av karbondioksid og virker som en pH-
buffer; albumin gjelder for den største (95 %) delen av den ikke-bikarbonatbuffer-
verdien av plasma. Proteiner tjener også som en kilde til energi. Deaminert alanin
5 er pyruvat, som enten kan bli omdannet til acetyl-CoA eller glukose og glykogen.
Albumin kan hjelpe å oppløseliggjøre lipider og transportere hormoner, vitaminer
og metaller. Den tjener som reservoar for frigjøring og anvendelse av disse kom-
ponentene.

10 Ethvert forsøk på å erstatte serumalbumin i dyrkningsmedium bør derfor ta i be-
traktning disse in vivo rollene og fysiske attributtene som er anvendelige for emb-
ryohåndtering og manipulering in vitro. En enkeltkomponent kan ikke utfylle alle
funksjonene av serumprotein.

Selv om proteinfritt medium som støtter utvikling av et antall dyrearter har blitt
beskrevet tidligere, har ingen slike proteinfrie medier blitt anvendt i mennesker
15 med hell, og heller ikke kunne slikt medium antas å støtte eller være optimalt for
menneskeembryoutvikling. Således eksisterer det et distinkt behov for et definert,
proteinfritt vekstmedium særlig tilpasset for humant ART og IVF.

BAKGRUNN FOR BESLEKTET TEKNIKK

20 Det er tidligere kjent formodentlige "proteinfrie" medium for å behandle og dyrke
pattedyrceller, særlig celler fra gnagere (mus, rotter, marsvin, etc.) men også for
befruktning, embryoutvikling og graviditet i mennesker for in vitro befruktning.

Caro et al. har beskrevet ett slikt "proteinfritt" medium for human anvendelse;
imidlertid var de ikke i stand til å overkomme behov for proteiner i spermafremstil-
lingsmedium fordi proteiner er krevd for å indusere istandsettelse av sperma uten
25 hvilken spermien ikke vil få kapasitet til å penetrere og/eller befrukte egget. Såle-
des er Caro og medarbeideres mediumsystem ikke fullstendig proteinfritt. Likeledes
har Serta et al. (1997;Sammendr.) og Parinaud et al. (1998a, Sammendr.; 1999)
også beskrevet "proteinfritt" medium for human ART, men de, som Caro et al.
(1986) før dem har anvendt proteiner i det minste i ett trinn av deres dyrknings-
30 system.

Å vaske sperma tidligere fremstilt med medium inneholdende tilsatte proteiner som
beskrevet i disse referansene fjerner ikke kontaminerende infeksjonsutløsende

midler med fullstendig sikkerhet, særlig virus og prioner. I tillegg er dette også uheldig fordi det utsetter spermatozoaen til unødvendig belastende vaskebetingelser, og kan utgjøre urimelige krav til arbeidskraft og resurser.

"Proteinfrie" media for vekst av pattedyr- eller særlig humane celler utenfor IVF-konteksten har blitt beskrevet, inter alia i Kovár et al., 1987, *Biotechnology Letters*, vol. 9 no. 4, 259-264 "Iron Compounds at high Concentrations Enable Hybridoma Growth in a Protein-free Medium"; Keen, 1995, *Cytotechnology*, vol. 17: 193-202 "The culture of rat myeloma and rat hybridoma cells in a protein-free medium"; Stoll et al., 1996, *J. Biotechnology*, vol. 45, p. 111-123 "Systematic improvement of a chemically-defined protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production" Dette arbeidet er spesifikt beslektet til monoklonal antistoffproduksjon og beskriver ikke tilpassing av slike medier for IVF- og ART-anvendelser.

Andre publikasjoner som beskriver proteinfrie vekstmedia, men ikke tilpasset eller egnet for menneskelige IVF-prosedyrer er: Zang et al., 1995, *Biotechnology*, vol. 13, s. 389-392, "Production of Recombinant Proteins in Chinese Hamster Ovary Cells Using A Protein-Free Cell Culture Medium"; og internasjonal patentsøknad publikasjonsnummer WO 2005/120576 A2.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

Den foreliggende oppfinnelsen angår nye proteinfrie embryodyrkningsmedieformuleringer for oppsamling av det menneskelige egg. (i. skyllemedium), håndtering og oppbevaring av spermatozoa (ii. Gamete håndteringsmedium) befruktning av det humane egget (iii. Embryodyrkningsmedium), Gamete- og embryohåndtering (iv. Gamete- og embryohåndteringsmedium) og så vel som vekst av resulterende zygoter i dyrkning (v. Embryodyrkningsmedium) gjennom 1 til 2 spaltningssykluser for human anvendelse i behandlingen og lindring av underfertilitet og infertilitet ved å anvende ART-prosedyrer. Den foreliggende oppfinnelsen inkluderer formuleringen av en enkeltmedium løsning som kan erstatte og/eller anvendes som en erstatning/medium for alle de ovenfor nevnte nye medieløsninger.

Det hovedsakelige proteinfrie medium ifølge oppfinnelsen er forskjellig fra det proteinfrie medium (benevnt ART-7 og ART-7b serier) tidligere beskrevet av den samme oppfinner (Alkaliekvivalent, 1997; Alkaliekvivalent et al., 2000). I tidligere rapporter har oppfinneren beskrevet den systematiske undersøkelsen som førte til

formuleringen av tre forløpermedier, nemlig ART-1, ART-2 og ART-3. I den samme rapporten har oppfinneren beskrevet hvordan de hovedsakelig proteinfrie medieseriene ART-7 og ART-7b ble utviklet fra ART-1-medium. Embryoene generert av ICSI i de hovedsakelig proteinfrie ART-7 og ART-7b medieseriene ble med hell anvendt
5 for å behandle 11 av 21 (52,4 %) kvinner på 39 år eller lavere til å oppnå kliniske graviditeter. Formuleringen av ART-1, ART-7 og ART-7b medieserier har ikke blitt beskrevet.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer hovedsakelig proteinfrie medier som har blitt formulert fra, men som er forskjellig fra, forløper ART-3 medium. Utviklingen av forløper ART-3 medium har blitt beskrevet av oppfinneren (alkaliekvivalent, 1997; Ali et al., 2000).
10

I eksemplifiserende utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelsen er en serie av hovedsakelig proteinfrie medier spesifikt beskrevet, benevnt PFM-11 serien. Disse medier har den spesifikke fordel av å være av lik oppbygning og frie for
15 potensielle farlige ikke-uniforme biologiske komponenter som kan skade gametene og embryoene, og som potensielt kunne overføre dødelige, for tiden kjente og hittil ukjente sykdommer til pasienter som gjennomgår ART-behandling, babyene unnfanget gjennom slik behandling og helsearbeidere involvert i ART-behandlingsprosedyrer, så vel som å etterkomme rigorøse nye normer og reguleringer som styrer
20 in-vitro befruktningsteknikker og fremgangsmåter.

Den fullstendig definerte naturen av hovedsakelig proteinfrie medieformuleringer i henhold til den foreliggende oppfinnelsen er også anvendelige i å forenkle forskning inn i pre-implanterings embryometabolisme som tidligere ble hindret grunnet den udefinerte naturen og ikke-uniforme sammensetningen av datidens tilgjengelige
25 embryodyrkningsmedieformuleringer. Kvaliteten av dag 2 humane embryoer generert i disse hovedsakelig proteinfrie medier (PFM) serier ved å anvende den sammenhengende ultramikrodråpe (cUMD) dyrkningsteknikken var statistisk sammenlignbar med eller bedre enn embryoer som utviklet seg i kontrollkommersielle medieformuleringer inneholdende serumproteiner. PFM-media var ikke toksisk for
30 menneskelig spermatozoa. Befruktning og etterfølgende utvikling av menneskelige embryoer ved konvensjonell IVF og Intra-Cytoplasmisk spermainjeksjon (ICSI) var sammenlignbare med kontroller.

De hovedsakelige proteinfrie medier av denne oppfinnelsen er også egnet for anvendelse i hovedsakelig proteinfri menneskelig embryodyrkning og håndteringsme-

dier og vil forsikre at proteinbundne sykdommer ikke overføres til pasienter og nyfødte. De hovedsakelig proteinfrie medier ifølge oppfinnelsen kan oppbevares frosne ved -20 °C i opp til 2 år uten å miste effektivitet.

Den foreliggende oppfinnelsen har med hell overkommet behovet for tilsatte donorproteiner i dyrkningssystemet og tilveiebringer et hovedsakelig proteinfritt mediesystem for menneskelig ART-applikasjon som benytter hovedsakelig proteinfrie medieprodukter som starter fra eggoppsamling, spermafremstilling, inseminasjon, befruktning, dyrkning av resulterende embryo og embryooverføring. Dette trekket skiller fordelaktig medier av denne oppfinnelsen fra tidligere beskrevne "proteinfrie" dyrkningssystemer, som benyttet proteininnholdende medieprodukter ved et punkt under prosedyren og ble således ikke fullstendig proteinfritt. Som en konsekvens, kan disse tidligere kulturmedier være kontaminerte med smittsomme midler og kan møte mulige reguleringsrestriksjoner. Forholdende, foretrukne mengder og spesielle spesifikasjoner av de ulike komponentene av den foreliggende oppfinnelsen er fremsatt heri.

Den foreliggende oppfinnelsen er produkter av studier av effekten, toleranse og bestemmelsen av optimal nivåer av individuelle komponenter slik som aminosyrer, antioksidanter og chelatorer, osmolytter, vitaminer og vekselenergikilder som til dels kan substituere de ulike rollene til protein in vivo og in vitro og som eksemplifiserer funksjonene av proteiner i ulike proteinfrie håndteringsmedia (f.eks. sperma- og ocythåndteringsmedium, og ICSI-medium) og embryodyrkningsmedium av denne oppfinnelsen som er frie for donorserumproteiner. De optimale konsentrasjonene av de nevnte komponentene ble benyttet til å formulere et antall av embryodyrkningsmedier. Etterfølgende ble de beste av disse medier som viste optimal embryoutvikling og signifikant høyere blastocystutklekningsrate identifisert og ytterligere raffinert for å støtte human embryoutvikling i fraværet av tilsatte serumproteiner. De hovedsakelige proteinfrie medier ifølge oppfinnelsen er i stand til å støtte befruktning av humane oocytter med spermatozoa fremstilt i det samme mediet. De resulterende zygotene utviklet seg etterfølgende i det hovedsakelig proteinfrie mediet for å danne levedyktige tidlig spaltestadium humane embryoer. Overføringen av disse embryoene førte til normale graviditeter og levende fødsler.

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer således medier som angitt i krav 1 og som er anvendelige gjennom IVF/ART-prosedyrene (eggoppsamling, spermafrem-

stilling, inseminering, befruktning, dyrkning av resulterende embryo og embryo-overføring) og som overkommer behovet for tilsatte proteiner i dyrkningssystemet.

DETALJERT BESKRIVELSE AV ENKELTE UTFØRELSESFORMER AV OPPFINNELSEN

- 5 Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en serie av næringsløsninger typisk referert til som embryohåndtering og -dyrkningsmedier, som er fritt for ethvert protein eller proteinlignende komponenter. Disse medier er anvendelige i befruktningen av humane egg og den etterfølgende utviklingen av befruktete egg i opp til 2 til 6 dager utenfor kroppen in vitro. Disse næringsløsningene kalles "embryodyrkningsmedier".

I tillegg til IVF og ART, inkluderer andre metodologier og teknikker hvor det ville være fordelaktig å anvende hovedsakelig proteinfrie næringsvekstmedier stamcelleteknolog og behandling, celle/vevs-regenerering og transplantasjonsbehandlingsprosedyrer. Fagpersonen vil forstå hvordan å tilpasse medier fremsatt heri for slik bruk.

Som beskrevet i ytterligere detalj nedenfor, økte anvendelsen av de hovedsakelige proteinfrie medier av denne oppfinnelsen for human gameter og embryoer effektiviteten av IVF og ART. For eksempel er den kliniske graviditetsraten oppnådd ved å anvende konvensjonell IVF med hovedsakelig proteinfrie (PFM-11) medier økt til 50 % (14 av 28) i alle aldersgrupper og opp til 53,8 % (14 av 26) i kvinner under 40 år; når sammenlignet med for tiden tilgjengelige embryomedier som inneholder proteiner (33 % graviditeter for alle aldersgrupper kombinert; beskrevet i: Ali, 2004). Den ICSI kliniske graviditetsraten med hovedsakelig proteinfrie medier av denne oppfinnelsen er likeledes økt til 46,2 % (12 av 26) i alle aldersgrupper og opp til 54,5 % (12 av 22) i kvinner under 40 år. Denne forskjellen er statistisk signifikant med hensyn til de foreliggende hovedsakelig proteinfrie medier, noe som indikerer at de hovedsakelig proteinfrie medier av denne oppfinnelsen i det minste er ekvivalent til (og kan bli sett som overlegen ovenfor) for tiden tilgjengelige kommersielle proteininnholdende medium som for tiden er tilgjengelig på markedet. Antallet babyer født fra embryoer generert i PFM-11 media ved konvensjonell IVF var 12 og ved ICSI, 12. Babyene født fra embryoer generert i PFM-11 ifølge oppfinnelsen er tilsynelatende normale, intelligente, snakkesalige og aktive (i henhold til foreldrerapportering). Disse statistiske data ble produsert fra en prøve på i det minste 24 barn av slike fødsler.

Som anvendt heri er uttrykket "proteinfri", "essensielt proteinfri" og "hovedsakelig proteinfri" tenkt å bety at mediet ble fremstilt ved å anvende ikke-proteininnholdende komponenter (som beskrevet i ytterligere detalj heri) og at ingen protein eller proteininnholdende komponenter ble tilsatt mediet.

- 5 Eksempelvis utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelsen inkluderer en serie av hovedsakelig proteinfrie media benevnt PFM-11 serien. Disse medieseriene har et spekter av spesifikke medieprodukter, nemlig:

1. Hovedsakelig proteinfritt skyllemedium
2. Hovedsakelig proteinfritt gamete- (sperma) håndteringsmedium
- 10 3. Hovedsakelig proteinfritt gamete (oocyt/embryo) håndteringsmedium
4. Hovedsakelig proteinfritt embryodykningsmedium

Disse medier anvendes i henhold til fremgangsmåtene fremsatt nedenfor, som er ment å illustrere anvendelsen av disse medier blant annet i IVF eller ART-fremgangsmåter kjent for fagpersonen. For å utvikle mediet ifølge oppfinnelsen i eksperimenter som fremsatt heri, ble hver prosedyre utført parallelt ved å anvende konvensjonelle proteininnholdende medier og eksempelvis PFM ifølge oppfinnelsen.

Human Spermatozoafremstilling

Mannlige pasienter donerte human sæd ved masturbering. Spermatozoa ble fremstilt ved standard oppsvømmingsteknikk og tidvis med tetthetsgradiententrifugering. I tetthetsgradientprosedyren ble de oppsamlede pelletene vasket to ganger og resuspendert i dyrkningsmedium. Spermatozoafremstillinger ble gjort ved å anvende test- eller kontrollmedium som passende. Spesifikt ble spermatozoa for ICSI eller IVF fremstilt i det hovedsakelige proteinfrie (PFM-11) mediet for eksperimentene på effekten av proteinmangel på embryoutvikling. De høstede spermatozoa ble inkubert under gassfase på 5 % CO₂ i luft ved 37 °C frem til bruk.

Eggstokksimulering og oosytoppsamling

Eggstokksimulering ble indusert ved subkutane injeksjoner av gonadotropin-friggjørende hormonagonist (Buserelin; Suprefact; Hoescht, Frankfurt, Tyskland) som

startet i midt-luteinfasen til menstruasjon eller nedregulering ble oppnådd. Nedregulering ble betraktet å ha blitt oppnådd når endometriell tykkelse var 4 mm eller mindre, og når blodestradiol-, progesteron- og LH-nivåer nådde grunnlinjeverdier. Injeksjoner av follikkelstimulerende hormon (FSH; Metrodin; Serono, Roma, Italia) ble administrert i tre dager for å igangsette rekruttering av follikler. Deretter ble menneskelig overgangsaldergonadotropin (Pergonal 500; Serono, Roma, Italia) administrert i samsvar med responsen til pasienten for å stimulere follikulær utvikling. Ovulering ble induisert ved en injeksjon av en 10 000 IU av human korionisk gonadotropin (hCG; Pergnyl; Organon, Oss, Nederland) etter å oppnå follikulær størrelse på 16 mm eller mer. Oocyttoppsamling (OR) ble utført 36 timer etter ved ultralydveiledet vaginal aspirasjon.

Inseminerings- og dyrkningsteknikker

In vitro fertilisering (IVF)

Oocytter ble individuelt inseminert med motile spermatozoa i mikrodåper av ekvilibrent dyrkningsmedium ved en konsentrasjon på 100000/ml under ekvilibrent og embryotestet mineralolje (M8410, Sigma Chemicals, og USA). De inseminerte oocytten ble dyrket i en atmosfære på 5 % CO₂ i luft ved 37 °C. Den følgende morgenen ble oocytterne blottlagt med blottleggingspipetter (Stripper®, MidAtlantic Diagnostics, USA).

Intracytoplasmisk spermainjeksjon

I en alternativ fremgangsmåte (anvendt f.eks. for å overkomme human hann-kjønnsfaktor subfertilitet) ble ICSI utført. Oocytter ble fremstilt for ICSI ved eksponering for hyaluronidaseløsning i 30 sekunder (80 IU/ml; Cat. No. 10110010, Medi-Cult A/S, Lersø Parkalle 42, 2100 København, Danmark) og deretter overført inn i ekvilibrent Medi-Cult™ eller hovedsakelig proteinfrie medier ifølge oppfinnelsen. Humane oocytter ble inkubert i 5-7 minutter i dyrkningsmediet under gassfase på 5 % CO₂ i luft ved 37 °C og deretter blottlagt med en blottleggingspipette (ART No. 1670, International Medical Products BV, Zutphen, Nederland). De blottlagte humane oocytterne ble vasket og til slutt inkubert i dyrkningsmedium i ytterligere 30-60 minutter.

Kommersielt tilgjengelig ICSI-pipetter ble anvendt for mikromanipulering (Injection Needles, Cat No. 130340B; Holding pipette, Cat No. 13030013; Laboratoire CCD,

60 Rue Pierre Charron, 75008 Paris, Frankrike eller Injection needle, Cat. No. 10-MIC; holding pipette, Cat. No. 10-MPH-120; Humagen, Charlottesville, Virginia 22911, USA.) En 5 µl ultra mikrodråpe av PVP (Cat No. 1089001, Medi-Cult A/S, Danmark) ble tynt spredt i sentrum av en petriskål (Cat No. 1006, Falcon Plastics, Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey, 07070, USA). PVP-spredningen ble omringet av opp til et maksimum på fem 10 µl mikrodråper av HEPES-buffret IVF medium (Gamete.1009 Scandinavian IVF Sciences AB, Göteborg, Sverige). Mikrodråpene ble overlagt med ekvilibrert og embryotestet mineralolje (M8410, Sigma Chemicals, USA). Spermafremstilling (1 til 2 µl) ble introdusert i sentrum av PVP-spredningen. ICSI av modne oocytter ble utført konvensjonelt (f.eks. som fremsatt i Palermo et al., 1992).

Ultramikrodråpedyrkning

Ultramikrodråper (UMD; 1,5 til 2 µl for dyrkning av 3 til 7 menneskelige embryoer) av dyrkningsmedium ble laget i en 4-brønnskål på forhånd fylt med ekvilibrert mineralolje. Skålene ble inkubert under gassfase på 5 % CO₂ i luft ved 37 °C. Medium ble skiftet daglig (UMD-teknikk) med en fin uttrekker Pasteur-pipette ved å anvende ekvilibrert dyrkningsmedium i innledende eksperimenter, men ikke endret (cUMD; eller sammenhengende UMD) til dag 3 av dyrkning i senere eksperimenter.

Bestemmelse av befruktning

Befruktning ble bestemt 18 timer til 20 timer etter ICSI eller IVF. Oocytene ble betraktet befruktet når to distinkte prokjerner var synlige. Befruktede oocytter ble dyrket i mikrodråper eller ultramikrodråper av ekvilibrert medium i en atmosfære på 5 % CO₂ i luft ved 37 °C. Spaltning og embryokvalitet ble vurdert etter 24 timer.

Zygoteinnfangningsrate

Denne parameteren ble brukt for å bestemme hvorvidt dyrkningsmediet i henhold til den foreliggende oppfinnelsen forårsaker utviklingsblokker på 1-cellestadiet. Effektiviteten av mediet kan bestemmes ved å anvende denne undersøkelsen. Høyere proporsjon av utviklingsblokker på 1-cellestadiet vil antyde at mediet er mangelfullt eller mindre virkningsfullt.

Bestemmelse v dag 2 spaltet embryokvalitet

To parametre ble anvendt for å bestemme embryokvaliteten av dag 2 embryoer, nemlig: den gjennomsnittlige blastomerverdien og den gjennomsnittlige embryograden. Disse ble bestemt som følger:

$$\begin{aligned} \text{(i) Gjennomsnittlig blastomerverdi} &= \frac{\text{Totalt antall blastomerer}}{\text{Totalt antall embryoer}} \\ \text{(ii) Gjennomsnittlig embryograd} &= \frac{\text{Total av embryograder}}{\text{Totalt antall embryoer}} \end{aligned}$$

Siden de fleste friske dag-2-humane embryoer generelt når frem til 4-cellestadiet, ble en gjennomsnittlig blastomerverdi 4 og over (i området av 2 til 6) betraktet som utmerket. Embryoene ble gradert i henhold til en skala fra 1 til 4, hvor nummeret 1 betegnet dårlig kvalitet og 4, utmerket kvalitet. Embryoer ble gradert kollektivt av et minimum på tre (men foretrukket fire) laboratoriepersonale. I tillegg inkluderte to andre parametre å fastlegge forskjeller i utviklingsrate av spaltestadium embryoer. Disse var: (i) proporsjonen av embryoer på eller over 4-cellestadiet og (ii) proporsjonen av embryoer som var grad 3 og over, på dag 2 av dyrkning i humane studer.

Medieformulering

Formuleringen av et eksempelvis i hovedsak proteinfritt medium ifølge oppfinnelsen beskrevet heri var som følger. Albumin er kjent å være kilde for fiksert nitrogen og næringsstoffer, antioksidant, og også å ha et antall av andre roller inkludert membranstabilisering. Således erstattet det hovedsakelige proteinfrie mediet ifølge oppfinnelsen albumin med andre mediekomponenter som utviser, individuelt eller kollektivt, funksjonen av albumin i dyrkning. Individuelle embryodyrkningsmediumkomponenter anvendt for disse formålene inkluderer aminosyrer (inkludert alanin, asparagin, aspartat, cystin, glutamat, glutamin, glycin, histidin, isoluecin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, aulin, tereonin, tryptofan, tyrosin, valin, serin), antioksidanter og chelatorer (f.eks., EDTA, redusert glutation, tokoferol), vekselenergikilder (slik som fruktose, glutamin, natriumpyruvat), osmolytter (inkludert mannitol og myoinosito), vitaminer (askorbinsyre, cyanokobalamin, folinsyre, tokoferol, etc.) og elementært jern.

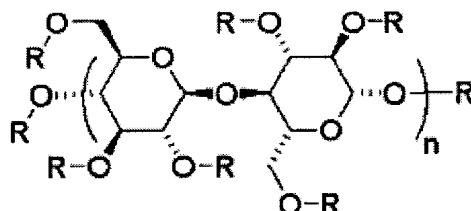
Konsentrasjonen av individuelle komponenter som støttet den høyeste blastocystutviklingen, ble betraktet som optimal for tre medier for dem som ble formulert

(ART-1, ART-2, og ART-3) i utviklingen av den foreliggende oppfinnelsen. Oppfinneren har tidligere beskrevet de ulike eksperimentene igangsatt for å formulere de hovedsakelig proteinfrie medier ART-7 og ART7b-serier fra dyrkningsmedium ART1 (Ali, 1997; Ali et al., 2000).

- 5 De endelige formuleringene for de ulike medieprodukter av PFM-11 serien er gitt i tabeller som fremsatt nedenfor. Konsentrasjonene av HEPES og bikarbonat i disse mediefremstillingene varierer, som fremsatt heri.

De hovedsakelig proteinfrie medier ifølge oppfinnelsen omfatter mineralsalter, aminosyrer, antioksidanter, antibiotika, energikomponenter og bufferkomponenter (HEPES og bikarbonat for inkubering under CO₂-supplementerte betingelser) som er
10 tilsvarende til, men ikke distinkte i sine særtrekk fra kommersielt tilgjengelige, proteininnholdende medier. De hovedsakelig proteinfrie medier ifølge oppfinnelsen omfatter unikt en makromolekylærtype (metylcellulose) og en eventuelt umetabolisert sukkeralkohol (D-mannitol) i tillegg til de øvrige komponenter nevnt i krav 1.

- 15 Makromolekylet omfattende de hovedsakelige proteinfrie medier ifølge oppfinnelsen har den følgende formelen I:



- 20 I formelen av metylcellulose ovenfor kan R enten være H eller CH₃, n er et heltall mellom 34 og 43 og forbindelsen har en metoksysubstitusjon mellom 27,5-31,5 vekt% . Grad av substitusjon (D.S., gjennomsnittlig antall av CH₃ substituentgrupper festet til ringhydroksyler) er foretrukket 1,5-1,9. Dette spennet gir maksimum vannoppløselighet. Lavere metoksysubstitusjon resulterer i høyere oppløselighet i
25 vann. Tallet "n" betegner nivået av polymerisering, og korresponderer optimalt til en molekylvekt på 14000 Dalton som relaterer seg til en omtrentlig viskositetsindeks på 15 cPS for en 2 % løsning i vann ved 20 °C (metylcellulose som har disse spesifikasjonene er kommersielt tilgjengelig fra Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; www.sigmaaldrich.com). Spennet av disse komponentene i PFM er 0,01 til
30 0,15 g per liter og det mest foretrukne spennet er 0,09 til 0,1 g/l. Den optimale konsentrasjonen er 0,1 g/l.

Metylcellulose kan virke som en antioksidant og osmolytt, den er ikke-toksisk, enzymresistent og ikke cellepermeabel (Stewart et al., 1995). Det hjelper til med å beskytte gametes og embryoer mot miljøskader, særlig angrep av frie radikaler og osmotiske trykkendringer. Den beskytter cellemembranen fra skade og hjelper å opprettholde homeostase. Den er også en surfaktant og smøremiddel. Den bidrar til økt viskositet av mediet, slik at gametes og embryoer ikke fester seg til sidene av skåler og på innsiden av pipetter og katetre. Disse typiske kjennetegnene etterspørres i fraværet av serumproteiner som vanligvis utfører disse funksjonene. Denne substansen er inert og sikker for human anvendelse.

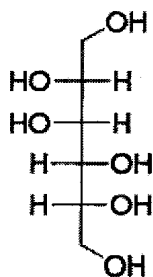
Metylcellulose har blitt anvendt andre steder i human farmasøytisk- og matindustri i mer enn 25 år uten noen bivirkninger i menneske- eller dyrestudier. FAO/WHO og EU-direktiver tillater konsumpsjon av metylcellulose, og det har blitt anvendt som en negativ kontroll i kreftforskning idet den er kjent å være ikke-karsinogenetisk.

Metylcellulose brukes også som fortykningsmiddel og emulgeringsmiddel i mange ulike mat- og kosmetikkprodukter, har medisinske anvendelser, slik som for behandling av forstoppelse. Den er ikke fordøybar, ikke-toksisk og ikke allergifremkallende. Dens farmakologiske/kliniske anvendelser er som eksipienter og et bærrermateriale. Den anvendes i øyedråper, som bulkmiddel og lakserende middel, anvendt for diaré i funksjonell tarmsykdom, for å kontrollere ileostomiutgang og som absorberent av toksiske substanser som forårsaker diaré. Den er også en antioksidant.

De hovedsakelig proteinfrie medier ifølge oppfinnelsen kan omfatte D-mannitol. Denne forbindelsen absorberes dårlig og utskilles nesten uendret i urin. Som en antioksidant og en osmolytt kan denne substansen beskytte embryoet fra skadelige miljøeffekter. Den kan således videre delvis erstatte serumproteiner for å beskytte embryoene mot uheldige forhold. Det er av interesse å notere seg at D-mannitol utviser en positiv effekt på museblastocystutvikling in vitro selv i nærvær av protein i mediet.

I de eksempelvis hovedsakelige proteinfrie media i henhold til denne oppfinnelsen (PFM-11), er D-mannitol til stede i en foretrukket konsentrasjon på 500 µg per liter (den mest foretrukne konsentrasjonen) og som ligger innen området 10 til 1250 µg per liter. Det mer foretrukne spekteret er 250 til 1000 µg per liter; enda mer foretrukket innen området 450 til 550 µg per liter. Den mest foretrukne konsentrasjonen er 500 µg per liter.

Den empiriske formelen av D-mannitol er $C_6H_{14}O_6$ og har den strukturelle formelen:



5

D-mannitol er et tilsetningsstoff i mat, brukt i kaker, konfekt og søtsaker; siden det er søtere enn sukrose betraktes det som et alternativt søtningsstoff for diabetikere. Det er osmolytt og antioksidant. Det har blitt anvendt i høye konsentrasjoner for å behandle akutt slag i over 30 år. Hypermolare konsentrasjoner av denne forbindelsen anvendes til å behandle alvorlig hjerneskade og forhøyer intrakranielt trykk. Det er et diuretisk middel og anvendes for diuresis i tilfeller av forgiftning, eller for å måle ekstracellulær væskemengde. Den har også lakserende effekter i pattedyr inkludert menneske. Ingen uheldige effekter i menneske har blitt rapportert som et resultat av klinisk anvendelse av D-mannitol som et terapeutisk middel.

Det er også ikke-cytotoksisk og ikke-mutagenisk i mange arter. D-mannitol absorberes dårlig og utskilles (Milde, 1965; Widdowson og Dickerson, 1965). Inklusjonen av denne substansen i dyrkningsmedium økte blastocystutvikling i mus selv i nærværet av serumproteiner, som antar en positiv rolle i embryodyrkning som en antioksidant og osmolytt (Ali, upubliserte observasjoner). Dets anvendelse er tillatt av FDA og EU, og FAO/WHO har konkludert med at det er trygt for mennesker å innta.

I løsningene og formuleringen ifølge oppfinnelsen er D-mannitol av formel II er til stede i en konsentrasjon på fra omtrent 10 mikromolar til omtrent 1250 mikromolar. Det mer foretrukne spekteret er 250 til 1000 μg per liter. Den mest foretrukne konsentrasjonen er omtrent 500 μg per liter.

Fagpersonen vil forstå at rollen til serumproteiner er mange, og i dets fravær, kan en eller to komponenter i seg selv ikke alene tilveiebringe en komplett erstatning for proteiner i mediet. Således vil fagpersonen forstå at oppfinnelsen ikke tilveiebringer medier supplementert med metylcellulose og eventuelt D-mannitol alene, men heller tilveiebringer medier som i tillegg omfatter en kompleks blanding av tilleggskomponenter som angitt i krav 1, fortrinnsvis i optimale konsentrasjoner, og den selektive eksklusjonen av vanlig anvendte mediekomponenter som har bevist å

være en bestemmende faktor i forhold til embryoer i dyrkning. Noen av disse inkluderer:

- (i) unike konsentrasjoner av to aminosyrer (L-Taurin og L-glutamin) som er hovedtilførselen av næring og osmotisk balanse. Disse aminosyrene er tilveiebrakt ved konsentrasjoner innen området av 1 mM til 30 mM L-aurin og 1mM til 50 mM L-glutamin, mer foretrukket 10mM til 30mM L-aurine og 10 mM til 30 mM L-glutamin og mest foretrukket 20 mM hver av L-aurin og L-glutamin.
- (ii) som energikilder enhver eller et antall av forbindelser (inkludert D-glukose, fruktose, eller pyruvat) som er mindre trolig å forårsake utviklingsblokkeringer i humane embryoer. Optimale konsentrasjoner av fruktose er fra omtrent 0,5 mM til 6,0 mM fruktose, med en mer foretrukket konsentrasjon fra omtrent 1 mM til 5,6 mM og mest foretrukket en konsentrasjon på omtrent 5,1 mM. De optimale konsentrasjonene av de gjenværende to energikildene er gitt andre steder i dokumentet.
- (iii) de følgende konsentrasjonene av enkelte aminosyrer:

Navn	Optimalt spekter Konsentrasjon i PFM (mM)	Foretrukket spekter (mM)	Mest foretrukket konsentrasjon (mM)
L-alanin	0,1-10	0,45-0,55	0,5
L-arginin	0,072-0,2	0,072-0,145	0,072
L-cystin.2HCl	0,01-0,1	0,01-0,02	0,01
L-glutamat	0,01-1,0	0,45-0,55	0,5
L-glycin	0,1-1,0	0,2-0,3	0,25
L-histidin HCL.H ₂ O	0,02-0,2	0,02-0,04	0,02
L-isoleucin	0,04-0,4	0,04-0,08	0,04
L-leucin	0,04-0,4	0,04-0,08	0,04
L-lysin HCl	0,05-0,5	0,05-0,1	0,05
L-metionin	0,01-0,1	0,01-0,02	0,01
L-fenylalanin	0,02-0,2	0,02-0,04	0,02
L-treonin	0,04-0,4	0,04-0,08	0,04
L-tryptofan	0,005-0,05	0,005-0,01	0,005
L-tyrosin.2Na ₂ H ₂ O	0,02-0,2	0,02-0,04	0,02
L-valin	0,04-0,4	0,04-0,08	0,04

(iv) de følgende konsentrasjoner av vannløselige vitaminer:

Navn	Optimalt spekter (mM)	Foretrukket spekterkonsentrasjon (mM)	Mest foretrukket konsentrasjon (mM)
Kolinklorid	0,004-0,007	0,004-0,005	0,004
D-Biotin	0,0024-0,004	0,0024-0,003	0,0024
Folinsyre	0,0014-0,0023	0,0014-0,0016	0,0014
Myoinositol	0,0067-0,011	0,0067-0,0078	0,0067
Niacinamid	0,005-0,008	0,005-0,0057	0,005
D-pantotenisk syre. ½ CA.	0,025-0,004	0,0025-0,003	0,0025
Pyridoksin HCl	0,003-0,005	0,003-0,0034	0,003
Riboflavin	0,00016-0,00027	0,00016-0,00019	0,00016
Tiamin HCl	0,0018-0,003	0,0018-0,002	0,0018

Spekteret for vitamin B12 er som følger:

Navn	Optimal spekterkonsentrasjon i PFM (pM)	Foretrukket spekter (pM)	Mest foretrukket konsentrasjon (pM)
Vitamin B12	443-885	590-738	616

- (v) vitamin E (Vitamin E type 6, Sigma Chemical Co.) ved en konsentrasjon på
5 fra 5 mikromolar til 20 mikromolar, mer foretrukket 8 mikromolar til 12 mikromolar, enda mer foretrukket 10 mikromolar.

Medier ifølge oppfinnelsen innbefatter helst ikke:

- (vi) L-asparagin, L-aspartat og L-serin som kan være en bestemmende faktor for utviklingen av zygotter og tidlig spaltningsstadium embryoer eller
10 (vii) elementærjern, som kan være en bestemmende faktor for embryoutvikling.

Medier ifølge oppfinnelsen kan videre foretrukket innbefatte:

- (viii) redusert glutaion (GSH) ved en konsentrasjon på 60 mikromolar til 500 mikromolar, og mer foretrukket 25 mikromolar til 350 mikromolar, og selv mer foretrukket 300 mikromolar.

Andre forbindelser

I utførelsesformer av medier ifølge oppfinnelsen kan følgende komponenter foreligge i endelig løsning:

Beskrivelse	Spekter	Foretrukket spekter	Mest foretrukket konsentrasjon
D-glukose	0,75-1,0	0,75-0,90	0,78 g/l
Natriumklorid	6,12-6,95	6,12-6,19	6,171 g/l
Kaliumklorid	0,35-0,4	0,35-0,36	0,355 g/l
Kalsiumklorid-	0,23-0,27	0,23-0,24	0,235 g/l
Magnesiumsulfat	0,086-0,098	0,086-0,087	0,087 g/l
Natriumdihydrogenfosfat	0,107-0,122	0,107-0,109	0,108 g/l
EDTA, Natrium	0,0416-0,043	0,0416-0,042	0,0418 g/l
Natriumbikarbonat*	2,1	2,1	2,1 g/l
Natriumlaktat, 60 % sirup	1,9	1,9	1,9 g/l
Fenol rød	0,011	0,011	0,011 g/l

5 *Natriumbikarbonat

I befruktning og dyrkningsmedier	2,1	2,1	2,1 g/l
I gamete håndteringsmedier	1,2	1,2	1,2 g/l
I skyllemedia	0,336	0,336	0,336 g/l
**HEPES			
I befruktnings og embryo dyrkningsmedier			0 mM
I gamete håndteringsmedier			15 mM
I skyllemedier			25 mM

PFM-11 medieserier fremsatt heri avviker fra konvensjonelle embryodyrkningmedier i det minste i de følgende aspektene:

1. Fravær av donorserumproteiner i mediene eliminerer mulighet for sykdoms-overføring, noe som gjør PFM-11 medieserier i henhold til den foreliggende oppfin-nelse ufarlige.
2. Tilstedeværelsen av metylcellulose og eventuelt D-mannitol.
3. Endringer i sammensetninger av medier med tanke på arter og konsentrasjoner av aminosyrer, antioksidanter, vitaminer, energikilder og mineralsalter, alle optimale for embryodyrkning.

Blant fordelene med medier i henhold til oppfinnelsen er redusert risiko for pasien-ter/helsearbeidere. De hovedsakelig proteinfrie medier i henhold til oppfinnelsen er
 10 også fordelaktige fordi de reduserer risiko for pasienter, deres babyer og helsear-beidere som eksponeres for medier. Selv om enkelte risikoer er tilbake er disse små sammenlignet med smittefaren som blir unngått ved å anvende de hovedsakelig proteinfrie medier i henhold til oppfinnelsen. Disse risikoene inkluderer allergier mot komponenter som er anvendt. Sjansen for at dette skal inntreffe er likevel svært
 15 liten, idet ingrediensene med unntak av antibiotika stort sett er inerte og ikke-reaktive. Alle ingredienser er i små konsentrasjoner og er ikke trolige å utløse aller-gisk reaksjon.

Klinisk prosess

En klinisk prosess ble godkjent for overføring av embryoer generert i de endelige
 20 formuleringene av PFM-11 medieseriene. Den kliniske prosessen undersøkte også forskjellen i effektivitet for PFM-11 medieseriene når befruktning ble utført enten ved konvensjonell IVF og ICSI.

Statistisk analyse

Statistiske sammenligninger ble utført med 2-prøvers t-test eller to ganger to ta-
 25 beller. En verdi på $p < 0,05$ eller mindre ble betraktet som statistisk signifikant.

RESULTATER

Dyrkningskarakteristikker av humane søsken oocytter når de insemineres ved konvensjonell IVF i PFM-11 proteinfritt medium og MediCult™ Embryo dyrkningsmedier.

Befruktningssraten av søskenoocytter etter konvensjonell IVF var lik i kontroll MediCult™ og PFM-11 media (Tabell A). En høyere andel av zygoter ble fanget i kontroll MediCult™ medium (8,1 %) sammenlignet med (2,2 %) PFM, men dette var ikke statistisk signifikant. Kvaliteten av spaltede dag 2 humane cIVF søskenembryoer generert i PFM-11 i ultramikropletdyrkning var signifikant overlegen med tanke på blastomerantall og grad sammenlignet med de generert i kontrollmediet. I PFM-11 mediet var det gjennomsnittlige blastomerantallet 3,4 og den gjennomsnittlige embryograden var 3,1 (n=116). I kontrollmediet (MediCult™) var det gjennomsnittlige blastomermediet likt (p=0,865) ved 3,4 og gjennomsnittlige embryograd var signifikant lavere (p= 0,001) ved 2,7 (n=118). Andelen av embryoer som hadde oppnådd ≥ 4 -trinn var lik i begge grupper, men andelen av embryoer som var over grad ≥ 3 var signifikant i den PFM-11 proteinfrie gruppen.

Tabell A: Kvalitet på dag 2 humane søskenembryoer generert ved konvensjonell IVF i proteinfritt PFM-11 medium

Medium	Fertil %	Oppfanget ved 1-cellestadium %	Blastomerantall Gjennomsnitt (1 SD)	Grad Gjennomsnitt (1 SD)	% ≥ 4 celler	% ≥ 3 Grad
PFM-11	85,3	2,2	3,4	58,4	58,4	74,3
(-protein)	(116/136)		(1,0)			
Medi-Cult	79,2	8,1	3,4	56,2	56,2	58,1
(+ protein)	(118/149)		(1,0)			
Signifikans	P=0,235	P=0,052	P=0,865	P=0,001	P=0,847	P=0,017

[Embryograd: 4= utmerket; 3 = god; 2 = ok, 1= dårlig]; Kontrollembryoer generert ved ICSI eller IVF; Blast = Blastomer; Funn : testmedium overlegent i forhold til kontroll.

Dyrkningskarakteristikker av søsken humane oocytter når inseminert ved konvensjonell IVF i det PFM-11 proteinfrie mediet og MediCult™ (77,8 % vs. 69,4 %, p = 0,043; Tabell B). Den utviklingsmessige fangingen av zygotestadiet var lavere i PFM-11 medium sammenlignet med MediCult™ medium, men denne forskjellen var ikke statistisk signifikant. (2,8 mot 6,3 %) henholdsvis, p = 0,088). Kvaliteten av spaltet dag 2 human ICSI søskenembryoer generert i PFM-11 medium dyrket i ultramikrodråper var signifikant overlegen med tanke på blastomerverdi sammenlignet med generert i kontrollmediet (3,8 mot 3,3 henholdsvis, p = 0,001). Den gjen-

nomsnittlige embryograden av embryoer generert i PFM11 mediet var lik den for embryoer generert i kontrollmediet (2,9 mot 2,8, $p = 0,080$). Proporsjonen av embryoer som hadde oppnådd ≥ 4 -stadiet var lik i begge grupper med proporsjonen av embryoer som var over grad ≥ 3 var signifikant høyere enn den PFM-11 proteinfrie gruppen.

Tabell B: Kvalitet av dag 2 humane søskenembryoer generert av ICSI i proteinfritt PFM-11 medium

Medium	Fertil %	Fanget på 1-cellestadiet %	Blastantall Gjennomsnitt (1SD)	Grade Gjennomsnitt (1SD)	% ≥ 4 celler	% ≥ 3 Grad
PFM-11	77,8	2,8	3,8	2,9	71,4	63,5
(-protein)	(196/252)		(1,2)	(0,7)		
Medi-Cult	69,4	6,3	3,3	2,8	54,8	58,6
(+protein)	(175/252)		(1,1)	(0,8)		
Signifikans	$p = 0,043$	$p = 0,088$	$p = 0,001$	$p = 0,080$	$p = 0,002$	$p = 0,413$

[Embryograd: 4 = utmerket; 3 = god; 2 = ok, 1 = dårlig]; Blast = Blastomer; Kontrollembryoer generert ved ICSI eller IVF; Funn : testmedium overlegent i forhold til kontroll.

Klinisk prosess

Den konvensjonelle IVF klinisk graviditetsraten med hovedsakelig proteinfrie PFM-11 medier er økt til 50 % (14 av 28) i alle aldersgrupper og opp til 53,8 % (14 av 26) i kvinner under 40 år; når sammenlignet med dagens tilgjengelige embryomedier inneholdende proteiner (33 % graviditeter for alle grupper kombinert; sitert fra Ali, 2004). ICSI klinisk graviditetsrate med hovedsakelig proteinfrie PFM-11 medier er likeledes økt til 46,2 % (12 av 26) i alle aldersgrupper og opptil 54,5 % (12 av 22) i kvinner under 40 år gamle. Denne forskjellen er statistisk signifikant med fordel til det foreliggende hovedsakelig proteinfrie PFM-11 medium, noe som indikerer at det hovedsakelig proteinfrie medium ifølge foreliggende oppfinnelse i det minste er tilsvarende til (og kan være bedre enn) dagens tilgjengelige kommersielle proteininnholdende medium for tiden tilgjengelig på markedet. Antallet babyer født fra embryoer generert i PFM-11 medier ved konvensjonell IVF var 12 babyer (30,8 %, dvs. at 8 av 26 kvinner behandlet fødte; eller 61,5 % 8 av 13 av de gravide kvinnene fødte; én graviditet mistet til oppfølging) og ved ICSI, også 12 babyer (36

% dvs. 8 av 22 kvinner fødte eller 55,7 % (8 av 12) av de gravide kvinnene fødte. Babyene født fra embryoer genererte i PFM-11 ifølge oppfinnelsen er tilsynelatende normale, intelligente, pratsomme og aktive (i henhold til foreldrerapportering). Disse statistiske dataene ble produsert fra en prøve på i det minste 24 barn fra
 5 slike fødsler.

SIGNIFIKANSRESULTATER

Tilgjengeligheten av et kjemisk definert medium for å generere levedyktige tidlig spaltestadium humane embryoer øker sikkerheten for pasienter som gjennomgår assistert reproduksjonsbehandling (ART) fordi, blant annet potensielt farlige donor-
 10 proteiner kan elimineres fra medier. Dette er av særlig interesse med tanke på overføring av patogeniske sykdommer, særlig virale sykdommer slik som menneskelig ervervet immunsvikts sykdomssyndrom (AIDS) og hepatitt, eller Creutzfeldt-Jacob sykdom (CJD) overført ved prioner, eller andre i blodutledede produkter har ført til at et antall embryologer verden over søker (uten hell) alternativer til donor-
 15 protein for deres embryodyrkning og håndteringsprosedyrer. Denne faren er absolutt reell: før har en epidemi av hepatitt B forekommet i omtrent 200 IVF pasienter som mottok embryoer dyrket i medier inneholdende samlet sera kontaminert med hepatitt B virus (van Overvåkede systemet et al., 1991). Mer nylig ble forsknings-
 samfunnet konfrontert med dilemmaet av å måtte informere pasientene at en
 20 kommersiell fremstilling av et dyrkningsmedium anvendt for embryodyrkning og håndtering kan være kontaminert med albumin donert av en person som senere døde av CJD (Kemmann, 1998).

I tillegg til patogener og prioner, kan serum eller proteiner utledet fra serum slik som albumin inneholde embryotiske faktorer, som i pasienter med endometriose, tilbakevendende aborter og de som lider av uforklarlig infertilitet (Miller et al.,
 25 1995). Disse embryotiske faktorene, hvis natur gjenstår å bli klarlagt, har blitt vist å være skadelig for embryoer in vitro (Miller et al., 1995; Fein et al., 1995). Videre fremmer anvendelsen av serum eller albumin problemet av reproducerbarhet, fordi batch-to-batch variasjon i sera eller albumin har blitt godt verifisert. En mulighet til
 30 å kontrollere kvalitet på ulike batcher av sera kan påvirke kvaliteten av embryoene som genereres. Problemer assosiert med embryotoksisitet og/eller ikke-reproducerbarhet av kvaliteten av serumproteiner unngås, selvsagt, når kjemisk definert medium anvendes istedenfor dyrkningsmedium som inneholder donorproteiner.

Kvaliteten av embryoer generert i PFM-11 dyrkningsmedier under ultramikrodråpe-
 dyrkningsbetingelser var like eller i enkelte tilfeller bedre enn de generert i
 kontrollmediet inneholdende proteiner når utført under lignende dyrkningsforhold.
 Mer viktig er befruktningsraten, cygoteinnfangingsraten og kvaliteten på embryoer
 5 generert i et nytt hovedsakelig proteinfritt medium PFM 11 medium og som ikke er
 lavere i noen av parameterne testet. Den kliniske prosessen viste at PFM-11
 medium er like effektivt eller bedre enn kontrollembryodyrkningsmediet
 inneholdende proteiner for dag 2 embryoer. Videre er det fullstendig trygt ettersom
 det er fritt for farlige donorproteiner av biologisk opprinnelse.

10 Forbedret kvalitet på embryoer generert i mikrodråper har tidligere blitt vist å være
 forårsaket av autokrine og parakrine effekter av visse vekstfaktorer frigjort av
 embryoet inni mediet (Paria og Dey, 1990; Oaria et al., 1991; Canesco et al.,
 1992). Tilsetningen av hIGF-1 til dyrkningsmediet ble absolutt funnet å forsterke
 human preimplanteringsutvikling, særlig var blastocystdannelse signifikant forbed-
 15 ret (Lighten et al., 1998). Effekten av vekstfaktorer i preimplanteringsutvikling har
 blitt bredt gjennomgått av Kane et al. (1997). Beviser fra tidligere studier på ef-
 fekten av vekstfaktorer indikerer en mangel på klart vekstmønster på embryoutvik-
 ling in vitro. Autokrine vekstfaktorer kan være essensiell for embryoutvikling under
 belastende dyrkningsforhold. Vekstfaktorer som viser positive effekter på embryo
 20 preimplanteringsutvikling inkluderer CSF-1; IGF-I; IGF-II; TGF- α , og muligens LIF.

Fertilisering i humane oocytter ble funnet å forekomme i PFM-11 med spermatozoa
 fremstilt i en PFM-11. Kapasitet ble ikke påvirket. PFM-11 har blitt vist heri å være
 effektiv i å fremme befruktning i serumproteiner i mediet. Den høye befruktnings-
 raten under konvensjonell IVF ved å anvende PFM-11 indikerte at fraværet av pro-
 25 tein i mediet ikke svekket spermakapasitet, befruktning og embryoutvikling in vitro
 og påfølgende levedyktighet in utero. På tross av en mangel på proteiner i mediet,
 inntraff spermkapasitet og penetrering av spermier inn i oocytten og befruktning.

De kliniske graviditets-, fødsels-, og abortratene var signifikant bedre i testgruppen
 (som anvendt hovedsakelig proteinfritt media i henhold til oppfinnelsen) sammen-
 30 lignet med kontrollgruppen (som anvendte konvensjonelt proteininnholdende me-
 dia). Andelen av gravide kvinner i testgruppen som fødte var lik verdensgjennom-
 snittet rapportert for spaltningsstadiembryooverføringer (DeMouzon og Lancaster,
 1997).

Resultatene av eksperimentene beskrevet heri avslørte at: (i) penetrering av spermatozoa inn i oocytter under konvensjonell IVF, gameteinteraksjon og påfølgende befruktning i mennesket som følge av både konvensjonelle IVF eller ICSI ble ikke svekket ved å anvende hovedsakelig proteinfritt medium PFM-11 i henhold til denne oppfinnelsen, (ii) det resulterende tidlige spaltningsstadiet embryoene var levedyktig og i stand til å fremkalle kliniske graviditeter, (iii) kvaliteten av tidlig spaltningsstadium embryoer generert i PFM-11 var generelt liknende eller i enkelte tilfeller overlegne til den generert i kontrollmediet inneholdende serumproteiner.

Strengt rensnings og steriliseringsmål anvendt for fremstilling av dyreopphav kan ikke ekskludere med absolutt sikkerhet muligheten for overføring av ukjente patogener (Truyen et al., 1995). Med formuleringen av hovedsakelig proteinfrie medier og utskifting av hyaluronidase med papain er det nå mulig å utføre hele de laboratorieassisterte reproduksjonsprosedyrene uten noen synelig risiko for overføring av sykdom til IVF-pasienter.

Som konklusjon ble det hovedsakelig proteinfrie PFM-11 mediet ifølge den foreliggende oppfinnelse vist å være effektivt, hvor spermapenetrering inn i oocytter under konvensjonell IVF, og befruktning etterfølgende ICSI eller konvensjonell IVF, er ukompromitert. Graviditeter ble heller ikke kompromiterte når embryoer generert i PFM ble overført, med en klinisk graviditetsrate på over 50 % i kvinner 39 år og under. Totalt sett var PFM-11 mediet likeledes effektivt hvis ikke overlegent til medier inneholdende serumproteiner i generering av levedyktige humane embryoer. Rutinen for anvendelse av PFM i humane assisterte unnfangelsesprosedyrer kan eliminere den potensielle risikoen for overføring av sykdommer gjennom proteinbundne patogener eller farlige prioner. Denne studien viste at det er mulig å generere levedyktige menneskelige embryoer i et medium fritt for tilsatt protein i et cellefritt kultursystem.

FREMSTILLING AV PFM-11 IFØLGE OPPFINNELSEN

Basalsaltoppløsning (BSS) stamløsning 1:

Fremstilling av "stam"-løsninger av basalsalter (Basalsaltoppløsning-BSS) for anvendelse i en endelig formulering av PFM Dyrkningsmedium, Gamete håndteringsmedium og Skyllemedium.

	Råmaterialekomponent	Kvantitet (g/l)
1.	Kalsiumklorid · 2 H ₂ O	2,65
2.	Magnesiumsulfat (anhyd.)	0,9767
3.	Kaliumklorid	4,0
4.	Natriumklorid	69,53
5.	Natriumfosfat monobasisk (anhyd.)	1,22
6.	D-glukose	10,517
7.	Fenol rød	0,11
8.	WFI (vann for injeksjon)	950 ml

Fremstillingsprosedyre:

1. Rens blandingsbeholder med WFI (vann for injeksjon, 18,2 MegaOhms resistivitet) før fremstilling av stamløsning.
2. Tilsett komponent 1 til 1000 ml WFI vann ettersom det er ekstremt hydroskopisk.
3. Tilsett komponenter 2-7 i rekkefølge, bland kontinuerlig og gjør sluttvolum til 1000 ml ved å anvende WFI.
4. Steril filtrering skal utføres umiddelbart etter at alle løsningsprodukter er fullstendig oppløst. Ikke filtrering dersom oppløsningsprodukter er igjen. 0,1 mikronfiltre kan anvendes, men unngå overflødig press under filtrering. Stam-1-oppløsningen kan prefiltreres med 0,2 mikron filtre etterfulgt av 0,1 mikronfilter.
5. Det skal ikke være noe presipitat eller uklarhet etter filtrering.
6. Fyll på beholdere med et egnet volum, f.eks. flasker.
7. Dekk flasken (foretrukket inngrepssikre forseglingsflasker).
8. Oppbevar i mørke i mellom 2 og 6 grader Celsius.

Oppbevaring og holdbarhet

Stam-basalsaltløsningen (BSS) var stabil i to måneder når det ble oppbevart mellom 2 og 6 grader Celsius. Sjekk alltid oppbevart BSS stamoppløsning nøye for pre-

sipitater eller uklarheter før bruk. Kasser hvis presipitater fremkommer eller løsningen har blitt uklar under oppbevaring.

Inklusjonsvolumer av BSS stamopløsning 1 i sluttprodukt:

5 Der natriumbikarbonat er den dominerende aktive bufferkomponenten i formuleringen (dyrkningsmedieprodukter), må 70 ml av BSS være til stede i hver 1000 ml av sluttformulering fremstilt.

Der HEPES er den dominerende aktive bufferkomponenten i formuleringen (sperma/skyllemedieprodukter), tilsettes 50 ml BSS for hver 1000 ml sluttformulering fremstilt.

10 Juster osmolalitet av endelig medium med BSS eller WFI for å øke eller minke (henholdsvis) osmolaliteten av mediet dersom:

Skulle osmolaliteten av det endelige mediet være 285 mOsmols når sluttvolum er mindre enn 1000 ml (dvs. etter å tilsette BSS, BAAS og BVS) med 9 volumer av WFI vann for å gi en arbeidende BSS (WBSS). Juster osmolalitet av WBSS til 285 mOsmol. Gjør endelig volum av endelig medium til 1000 ml med tilpasset WBSS.

For sammensetning av endelig formulering fra alle stamløsninger. Se stamløsning 4 instruksjoner

Basal aminosyreløsning (BAAS) stamløsning 2:

20 Denne oppskriften ble anvendt til å fremstille en 1 liter løsning av basale aminosyrer i oppløsning (Basal aminosyreløsning-BAAS) for inklusjon av endelige formuleringer av PFM dyrkningsmedium, Gamete håndteringsmedium og skyllemedium.

Reagensmidler

	Råmaterialekomponent	Kvantitet (g/l)
1.	L-arginin-HCl	1,26
2.	L-Cystin (L-cystin.2HCl)*	0,313
3.	L-histidin HCl.H ₂ O	0,42
4.	L-isoleucin	0,52
5.	L-leusin	0,52
6.	L-lysin.HCl	0,752
7.	L-metionin	0,15
8.	L-fenylalanin	0,32
9.	L-treonin	0,48
10.	L-tryptofan	0,1
11.	L-tyrosin (L-tyrosin.2Na 2H ₂ O)*	0,519
12.	L-valin	0,46
13.	WFI (vann for injeksjon)	1000 ml

Instruksjoner for fremstilling av stamløsning 2 BAAS

1. Rens blandingsbeholderen med WFI (vann for injeksjon, 18,2 MegaOhms resistivitet)
- 5 2. Løs opp komponenter 1, 2 og 4-11 i 400 ml WFI.
3. L-histidin HCl-H₂O og L-valin kan være vanskelige å løse opp og ved slike omstendigheter kan oppløselighet oppnås ved å anvende 1N HCl. Komponenter 3 og 12 bør oppløses i sine egne separate 300 ml volumer av WFI. Bruk kun det minste volumet mulig av 1 N HCl for å oppnå oppløsning. Den maksimale mengden
10 av 1 N HCl (embryotestet) som bør anvendes er 25 ml i 300 ml av WFI.

Unngå å varme opp vann, alkalier og syrer over 37 grader Celsius for å oppløse alle komponenter.

4. Når komponenter 3 og 12 er fullstendig oppløst, gjør opp sluttvolum av 1000 ml ved å gradvis tilsette på trinnvis måte, en 200 ml del av de vannløselige
15 aminosyrene laget i trinn to til :

- (a) 300 ml løsning av L-histidin HCl.H₂O som ga 500 ml i totalt volum.
- (b) 300 ml løsning av L-valin som ga 500 ml i totalt volum.
- 5. Kombinere både 500 ml volumer, gradvis i på trinnvis måte med konstant omrøring for å unngå presipitering.
- 5 6. Sterilfiltrer oppløsningen med 0,2 mikronfilter umiddelbart.
- 7. Fyll på beholdere med passende volum (f.eks. flasker).
- 8. Sett lokk på flaskene (foretrukket inngrepssikre forseglede flasker).
- 9. Lagres i mørke mellom 2-6 grader Celsius.

Oppbevaring og holdbarhet

- 10 Den basale aminosyreløsningen (BAAS) beholdningen vil holde i to måneder når den oppbevares mellom 2 og 6 grader Celsius. Undersøk alltid lagret BAAS-beholdning forsiktig for presipitater eller uklarhet før anvendelse. Kasser dersom presipitater eller uklarheter forekommer under lagring.

Inklusjonsvolumer av BAA stamløsning i endelig produkt:

- 15 10 ml BAA stamløsning bør anvendes per 1000 ml i fremstillingen av alle endelige formuleringer

L-tyrosin.2Na2H₂O og L-cystin.2HCl anvendes fordi fri form L-tyrosin og L-cystin ikke er kommersielt tilgjengelige.

Basal vitaminløsning (BVS) stamløsning 3.

- 20 Protokollen i henhold til dette eksemplet fremstiller en 1 liters stamløsning av basale vitaminer i løsning (Basal vitaminløsning- BVS) for inklusjon i endelige formuleringer av PFM dyrkningsmedium, Gamete håndteringsmedium og skyllemedium.

Reagenser

	Råmaterialkomponent	Kvantitet (g/l)
1.	Kolinklorid	0,1
2.	Myoinositol	0,2
3.	Niacinamid	0,1
4.	D-pantotenisk syre	0,1
5.	Pyridoksin HCl	0,1
6.	Riboflavin	0,01
7.	Tiamin HCL	0,01
8.	Folinsyre	0,1
9.	WFI (vann for injeksjon)	1000 ml

Instruksjoner for fremstilling av stamløsning 3 (BVS)

1. Løs opp komponenter 1-7 i 800 ml WFI-vann (Vann for injeksjon, 18,2 MegaOhm resistivitet). Skulle noen av komponentene ikke løse seg opp kan små
5 mengder av 0,1 N eller 1 N NaOH anvendes for å oppnå oppløsning som en siste mulighet.
2. Løs opp komponent 8 i 2,5 ml av 0,1 N NaOH og tilsett forsiktig på trinnvis måte, med konstant omrøring til 800 ml inneholdende komponenter 1-7.
3. Dann et volum på 1000 ml ved å anvende WFI vann under konstant omrø-
10 ring og sterilfiltrér umiddelbart med 0,2 mikronfilter inn i egnede beholdere (f.eks. 60 ml Nalgene flasker, inngrepssikre flasker).
4. Sett lokk på flaskene.
5. Lagre i mørke ved -20 grader Celsius.

Oppbevaring og holdbarhet.

- 15 Den basale vitaminløsningen (BVS) stamløsning kan oppbevares i to måneder når den oppbevares ved -20 grader Celsius i 60 ml like deler. Sjekk alltid opptint BVS stamløsning 3 forsiktig for presipitater eller uklarhet før anvendelse. Kasser dersom presipitater forekommer eller dersom den opptinte løsningen fremstår som uklar.

Inklusjonsvolumer av BVS stamløsning til endelig produkt:

6,0 ml av BVS stamløsning bør anvendes per 1000 ml i fremstillingen av alle sluttformuleringer fremstilt se stamløsning 4.

Stamløsning 4 og endelige formuleringskombinasjoner.

- 5 Fremstillingen av stamløsning-4 tillater den endelige tilsetningen av de unike kjemikaliene i denne formuleringen og tilsetningen av spesifikke volumer tatt fra stamløsning 1 basalsaltløsning (BSS), stamløsning 2, basal aminosyreløsning (BAAS) og stamløsning 3 basal vitaminløsning (BVS). Oppskriften viser tilsetningen av buffere og antibiotika som er spesifikke for medieformuleringen som fremstilles, dvs. dyrkningsgametehåndtering og skyllemedium.
- 10

Den følgende oppskriften fremstiller 1 liter av sluttformulering av dyrkningsmediet, gametehåndtering eller skyllemedium. Større batcher kan fremstilles ved passende skalering av kvantiteter.

Reagenser

	Råmaterialekomponent	Kvantitet (g/l)		
1.	Natriumpyruvat	0,02975		
2.	Fruktose	0,92125		
3.	Glysin	0,01875		
4.	Glutathione (redusert)	0,09225		
5.	D-mannitol	0,0911		
6.	EDTA (natriumtetra)	0,04175		
7.	L-alanin	0,04455		
8.	L-aurin	1,251		
9.	L-glutaminsyre mononatrium	0,0735		
10.	Melkesyre Natriumsalt	1,9 ml per liter		
11.	Vitamin B-12	100 µl/l		
12.	Vitamin E type 6	333 µl/l		
13.	Stamløsning 1 BSS	70 ml		
14.	Stamløsning 2 BAAS	10 ml		
15.	Stamløsning 3 BVS	6 ml		
		Kvantitet g/l Dyrkningsmed ium	Kvantitet g/l Gamete- håndterings- medium	Kvantitet g/l Skyllemedium
16.	Gentamycinsulfat		2 mg/l	
17.	Penicillin G	75 mg/l		75 mg/l
18.	L-glutamin	1,461	1,461	
19.	Natriumbikarbonat	21,	1,2	0,336
20.	HEPES	0,0	3,5745	5,9575
21.	Metylcellulose	0,1	0,1	0,1
22.	WFI (vann for injeksjon)	1000 ml	1000 ml	1000 ml

Instruksjoner for fremstilling av stamløsning 4 og endelig formulerings-sammensetning

- 5 1. Rens blandingskar med WFI (vann for injeksjon, 18,2 MegaOhm resistivitet).

2. Løs opp komponenter 1-11 i 700 ml av WFI under kontinuerlig omrøring mens tilsetningen gjøres.
3. Tilsett komponenter 12-15 og lag 900 ml med WFI og forsett røring.
4. Tilsett komponenter 16-21 avhengig av fremstilling av den basiske formuleringstypen dvs. PFM dyrkningsmedier, PFM gamete håndteringsmedier og PFM skyllemedier.
5. Juster osmolalitet av alle tre media og separat filtersterilisering ved å anvende 0,2 mikron porestørrelse filter, 0,1 mikron filter kan også anvendes men unngå å bruke trykk. Ikke anvend 0,1 mikronfilter dersom høyt trykk kreves for å filtrere løsningen.
6. Sterilfiltrér umiddelbart i endelig pakning:

PFM dyrkningsmedier fylles på 60 ml flasker (Nalgene flasker).

PFM Gamete håndteringsmedier fylles på 60 ml flasker.

PFM skyllemedia fylles på 125 ml flasker.
7. Sett lokk på flaskene
8. Merk flaskene
9. Lagre i mørket mellom 2 og 6 grader Celsius.

Fotnote for stamløsning 4 og sluttformuleringssammensetning.

- 20 Sjekk osmolalitet. Dersom osmolaliteten er høy, juster til 285 mOsmol ved å tilsette WFI rent vann. Mengden som skal tilsettes beregnes som følger:

$$\left[\frac{\text{Osmolalitet av mediumønsket osmolalitet (dvs. 285)}}{\text{Osmolalitet av medium}} \right] \times \text{volum av medium}$$

Eksempel: Dersom osmolalitet av mediet er 300 og volum av medium er 900 ml som ovenfor, beregn som vist nedenfor:

$$[300-285/300] \times 900 = 15/300 \times 900 = 45$$

- Derfor, hvis det tilsettes 45 ml av vann til mediet og deretter måles osmolalitet
5 igjen, vil det teoretisk bli oppnådd en osmolalitet på omtrent 385 pluss-minus 2 eller 3 enheter. Vær svært forsiktig og ikke tilsett for mye vann fordi de viktige ingrediensene i mediet vil bli fortynnet og vil påvirke effektiviteten av mediet selv om osmolaliteten av mediet kommer tilbake ved å tilsette mer stamløsning 1 BSS løsning.
- 10 Imidlertid, dersom osmolaliteten er lavere enn 285 mOsmol, tilsett stamløsning 1 BSS kun til mediet, omtrent 2 til 3 mOsmol per ml medium, men dette er ikke alltid forutsigbart. Så vær svært forsiktig og ikke tilsett for mye. Tilsett litt av gangen og mål osmolalitet.

REFERANSER

- Ali J. (1997) Formulation of a protein-free culture system for the culture of human embryos: preliminary findings and pregnancies. In: Programme and abstract book of the 16th Annual Scientific meeting of the Fertility Society of Australia, 2-4 December 1997, Adelaide, Australia, p34 (Abstract)
- Ali J. (2000) Investigation into the nutrient requirement of the human embryos: Successful formulation and clinical trial of a novel protein-free embryo culture medium. *Emirates Med J.* 18:195-202
- Ali, J (2004) Generation of viable human embryos in a protein-free embryo culture (ART-7b) medium enhances clinical pregnancy rate and prevents disease transmission in assisted reproduction. *Middle East Fertil Soc. J.* 9:118-127
- Ali, J., Abdulkader, A., Shahata, M.A.M. et al. (1998) Term deliveries from human embryos conceived in a novel culture medium devoid of added protein. *Middle East Fertil. Soc. J.* 3, 40 (Abstract)
- Ali, J., Whitten, W.K. and Shelton, J.N. (1993). Effect of culture systems on mouse early embryo development. *Hum. Reprod.* 8, 1110-1114
- Almagor, M., Bejar, C., Kafka, I. et al. (1996) Pregnancy rates after communal growth of pre-implantation human embryos in vitro. *Fertil. Steril.* 66, 394-397
- Balakier, H. (1993) Trippronuclear human zygotes: the first cell cycle and subsequent development. *Hum. Reprod.* 8, 1892-1897
- Barber, A. A. (1961) Inhibition of lipid peroxide formation by vertebrate blood serum. *Arch. Biochem. Biophys.* 92, 38-43
- Barnes, R.I., Crombie, A., Gardner, D.K. et al. (1995) Blastocyst development and pregnancy after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum. Reprod.* 10, 3243-3247
- Bavister, B.D. (1995) Culture of pre-implantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update* 1,91-148

- Biggers, J.D., Summers, M.C. and McGinnis, K.L. (1997) Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in culture media for mouse preimplantation embryos. *Hum. Reprod. Update* 3, 125-135
- Boyers, S.P., Diamond, M.P., Lavy, G. et al. (1987) The effect of polyploidy on embryo cleavage after in vitro fertilization in humans. *Fertil. Steril.* 48, 624-627
- Canesco, R.S., Sparks, A., Pearson, R.E. et al. (1992) Embryo density and medium volume effects on early marine embryo development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 9, 454-457
- Caro, C.M. and Trounson, A. (1986) Successful Fertilization, Embryo Development, and Pregnancy in Human in Vitro Fertilization (IVF) Using a Chemically Defined Culture Medium Containing No Protein. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, vol. 3, no. 4. p. 215-217)
- Carrillo, A.J., Lane, 13., Pridham, D.D. et al. (1998) Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval: use of glucose- and phosphate-free media. *Fertil. Steril.* 69,329-334
- Centers for Disease Control. (1985) Fatal degenerative neurologic disease in patients who received pituitary derived human growth hormone. *MMWR Morb Moral Wkly Rep* 34:359-60, 365-6.
- Cholewa, J.A. and Whitten, W.K. (1965) Development of 2-cell mouse embryos in the absence of a fixed nitrogen source. *J. Reprod. Fertil.* 22, 553-555
- Cockle SM, Aitken A, Beg F, Morrell JM, Smyth DG. (1989) The TRH-related peptide by pyroglutamylglutamylprolinamide is present in human semen. *FEBS Lett* 1989; 252:13-7
- Dandekar, P.V. and Glass, R.H. (1990) Development of two-cell mouse embryos in protein-free and protein-supplemented media. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer* 7, 107113
- De Mouzon, J. and Lancaster, P. (1997). World collaborative report on in vitro fertilization. Preliminary data for 1995. *J. Assist. Reprod. Genet.* (suppl.) 14, 250S-265S

Drakakis, P., Loutradis, D., Milingos, S. et al. (1996) The in vitro development of mouse embryos beyond the blastocyst stage into the hatching and outgrowth stage using different energy sources. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13, 786-792

Du, Z.F. and Wales, R.G. (1993) Effect of culture from the zygote stage on the metabolism of glucose and glutamine by 2-cell embryos and blastocysts recovered from outbred or H female mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 555-565

Esmonde T, Lueck CJD, Symon L, Duchon LW, Will RG. (1994) Creutzfeldt-Jakob disease and lyophilised dura mater grafts: report of two cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 56:999-1000.

Gardner, D.K. (1994) Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol. Int.* 18,1163-1179

Gardner, D.K. and Lane, M. (1998a) Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum. Reprod. (suppl.)* 13,148-160

Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L. et al. (1998b) A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 13,3434-3440

Green CM, Cockle SM, Watson PP et al. (1996) A possible mechanism of action for fertilization promoting peptide, a TRH-related tripeptide that promotes capacitation and fertilizing ability in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 45:244-52.

Heye, N., Henson, S., and Muller, N. (1994) Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Lancet* 343:298299.

Kane, K.T., Morgan, P.M. and Coonan, C. (1997) Peptide growth factors and preimplantation development. *Hum. Reprod. Update* 3:137-157

Kemmann, E. (1998) Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and assisted reproductive technology (ART). *Hum. Reprod.* 13, 1777

Lane, M. and Gardner, D.K. (1997) Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14,398-403

- Li, J., Foote, R.H., Liu, Z. et al. (1996) Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology* 47,1103-1113
- Lighten, A.D., Moore, G.I., Winston, et al. (1998). Routine addition of human insulin-like growth factor-1. ligand could benefit clinical in-vitro fertilization culture. *Hum. Reprod.* 13, 3144-3150
- Loutradis, D., Kallianidis, K., Drakkis, P. et al. (1992) Successful pregnancy in human IVF using BSA as a protein source in the transfer medium. *Assist. Reprod. Technol. Androl.* 3, 233-238
- Mehta, T.S. and Kicssling, A.A. (1990) Development potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with and without amino acids or serum. *Biol. Reprod.* 43, 600-606
- Milde, M.D. (1965). *Ann. Rev. Pharmac.* 5: 125
- Moessner, J. and Dodson, W.C. (1993) The role of growth factors and proteins in media for in vitro fertilization. *Assist. Reprod. Rev.* 3, 63-67
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into oocyte. *Lancet.* 340:17-18
- Paria, B.C. and Dey, S.K. (1990) Pre-implantation embryo development in vitro:cooperative interactions among embryos and the role of growth factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 87, 4756-4760
- Paria, B.C, Tsukamura, H. and Dey, S.K. (1991) Epidermal growth factor-specific protein tyrosine phosphorylation in pre-implantation embryo development. *Biol. Reprod.* 45, 711-718
- Parinaud, J., Milhet, P., Vieuze, G. et al. (1998a) Human sperm capacitation and in vitro fertilization in a chemically defined and protein-free medium (SMART1). *Proceedings of the 16th World Congress on Fertility and Sterility and the 54th Annual*

Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. October 4-9, 1998, San Francisco, California, United States of America, Fertil. Steril. (suppl.) p.S195-S196 (Abstract)

Parinaud, J., Vicitiez, Mi lhet, P., et al. (1998b) Use of plant enzyme preparation (coronase) instead of hyaluronidase for cumulus cell removal before intracytoplasmic sperm injection. Hum. R.eprod. .13,1933-1935

Poiley, S.M. (1960) A systematic method of breeder rotation for non-inbred laboratory animal colonies. Proc. Anim. Care Panel, 10, 159-166

Quinn, P. (1994) Use of co-culture with cumulus cells in insemination medium in human in vitro fertilization (IVF). J. Assist. Reprod. Genet.11,270-277

Saito, H., Hirayama, T., Koike, K. et al. (1994) Cumulus mass maintains embryo quality. Steril. 62, 555-558.

Schramm, R.D. and Bavister, B.D. (1996) Development of in-vitro-fertilized primate embryos into blastocysts in a chemically defined, protein-free culture medium. Human Reprod.11,1690-1697

Serta, R.S., Sakellariou, M., Kiessling, A.A. et al. (1997) Outcome of human embryos conceived and cleaved in protein-free culture conditions. Proceedings of the 53rd Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. October 1

Stewart GJ, Wang Y, Niewiarowski S. (1995) Methylcellulose protects the ability of anchorage-dependant cells to adhere following isolation and holding in suspension. Biotechniques. 19(4):598-604

Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. October 18-22, 1997, Cincinnati, Ohio, United States of America, (suppl.) 5214-5215 (Abstract)

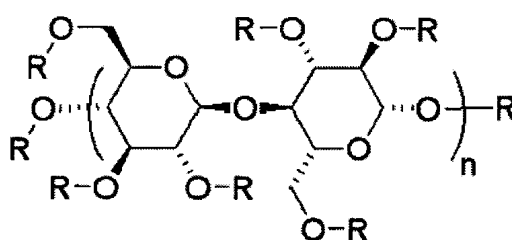
Spindle, A. (1995) Beneficial effect of taurine on mouse zygotes developing in protein-free culture medium. Theriogenology 44,761-772

Saessens, C., Janssenswillen, C., De Clerck, E. et al. (1998) Controlled comparison of commercial media for human in-vitro fertilization:Menezo B2 medium versus Medi-Cult universal and BM1 medium. Hum Reprod. 13, 2548-2554

- Tesarik, J., Pilka, L., Drahorad, J. et al. (1988) The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implications in IVF. *Hum. Reprod.* 3, 129-132
- Parinaud, J., Milhet, P., Vieitez, G. and Richoilley, G. (1999). Use of a medium devoid of any human or animal compound (SMART2¹) for embryo culture in intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16: 13-16.
- Truyen, U., Parrish, C.R., Harder, T.C. et al. (1995) There is nothing permanent except change. The emergence of new viral diseases. *Vet. Microbiol.* 43, 103-122. Cited in: Parinaud et al., 1998b
- Van Os, H.C., Drogendijk, Aat, C. Fetter, W.P.F. et al. (1991) The influence of contamination of culture medium with hepatitis B virus on the outcome of in vitro fertilization pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 165, 152-159
- Vidlakova, Erazimova, J., Horky, J. et al. (1972) Relationship of serum antioxidative activity to tocopherol and serum inhibitor of lipid peroxidation, *Chim. Acta* 36, 61-66
- Wayner, Dam, Burton, G.W., Ingold, K.U. et al. (1987) The relative contribution of vitamin F, mate, ascorbate and proteins to total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta* 924, 408-419
- Widdowson, E.M. and Dickerson, J.W.T. (1964). In: Comar, L.C. and Brommer, F. (eds.), *Mineral Metabolism*, New York – London, Vol. IIA, p. 13.

PATENTKRAV

1. I hovedsak proteinfritt celledyrkningsmedium for humane reproduktive celler egnet for anvendelse gjennom fullstendig in vitro behandling av humane reproduktive celler til å bli benyttet i in vitro fertilisering og andre assistert reproduksjonsteknologier og omfattende mineralsalter, aminosyrer, antioksidanter, vitaminer, næringsstoffer, antibiotika, D-mannitol og metylcellulose som har en molekylvekt på 14.000 Dalton.
2. I hovedsak proteinfritt medium ifølge krav 1, hvor nevnte metylcellulose er sammensatt slik at en 2% oppløsning har en viskositet på 15 centipoise ved 25°C.
3. I hovedsak proteinfritt medium ifølge krav 1, hvor metylcellulosen er av formel I:



15

hvor hver R er uavhengig H eller CH₃ og n er et heltall med en verdi fra omkring 34 til omkring 43 og hvor metoksysubstitusjon er fra 27,5 vekt% til 31,5 vekt%.

4. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 3, hvori det gjennomsnittlige antall CH₃-substituenten bundet til hver sukkerenhet av formel I er 1,5 til 1,9.

20

5. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvori nevnte metylcellulose er til stede i løsningen i en konsentrasjon fra 0,01 g/l (0,71 mikromolar) til 0,5 g/l (0,036 mM).

6. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvori nevnte metylcellulose er til stede i løsningen i en konsentrasjon fra 0,01 g/l (0,71 mikromolar) til 0,15 g/l (0,00011 mM).

25

7. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvori nevnte metylcellulose er til stede i løsningen i en konsentrasjon på omkring 0,1 g/l (0,0071 mM).
8. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvori aminosyrer er L-arginin, L-cystein, L-histidin, L-isoleucin, L-leucin, L-lysin, L-metionin, L-fenylalanin, L-treonin, L-tryptofan. L-tyrosin, L-valin, L-alanin, L-aurin, L-glutaminsyre, L-glutamin eller glycin eller enhver kombinasjon derav.
9. Hovedsakelig proteinfritt medium ifølge krav 8, hvor aminosyrene er til stede ved en konsentrasjon på:
 10. 0,5 mM L-arginin; 0,01 mM L-cystein·2 HCl; 0,02 mM L-histidin; 0,04 mM L-isoleucin; 0,04 mM L-leucin; 0,05 mM L-lysin·HCl; 0,01 mM L-metionin; 0,02 mM L-fenylalanin; 0,04 mM L-treonin; 0,005 mM L-tryptofan; 0,02 M L-tyrosin·2Na₂H₂O; 0,04 mM L-valin; 0,5 mM L-alanin; 20 mM L-aurin; 0,5 mM glutaminsyre og 20 mM L-glutamin eller 0,25 mM L-glycin.
 15. 10. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvori mineralsaltene omfattende løsningen er kalsiumklorid, magnesiumsulfat, kaliumklorid, natriumklorid og natriumfosfat.
 11. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 10, hvori mineralsaltene som utgjør mediet er til stede i en konsentrasjon på mellom: 3,0 mM (0,23 g/l) og 3,6 mM (0,27 g/l) for kalsiumklorid; 0,7 mM (0,086 g/l) og 0,81 mM (0,098 g/l) for magnesiumsulfat; 4,7 mM (0,35 g/l) og 5,4 mM (0,4 g/l) for kaliumklorid; 0,1 M (6,12 g/l) og 0,069 M (4,0 g/l) til 0,12 M (6,95 g/l) for natriumklorid og 0,89 mM (0,107 g/l) til 1,0 mM (0,122 g/l) for natriumdihydrogenfosfat.
 12. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 11, hvori mineralsaltene som utgjør mediet er til stede i en konsentrasjon på: 3,1 mM (0,235 g/l) for kalsiumklorid; 0,72 mM (0,087 g/l) for magnesiumsulfat; 4,8 mM (0,355 g/l) for kaliumklorid; 0,11 M (6,171 g/l) for natriumklorid og 0,88 mM (0,108 g/l) for natriumdihydrogenfosfat.
 13. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvori vitaminene som utgjør mediet er cholinklorid, myoinositol, niacinamid, D-pantoten-

syre, pyridoksin-HCl, riboflavin, tiamin-HCl, folinsyre, vitamin B12, vitamin E eller enhver kombinasjon derav.

14. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 13, hvori vitaminene som utgjør mediet er til stede ved konsentrasjoner mellom: 0,004 mM (0,0005 g/l) og 0,005 mM (0,0007 g/l) for cholinklorid; 0,0024 mM (0,0006 g/l) og 0,0028 (0,0007 g/l) D-biotin; 0,0067 mM (0,0012 g/l) og 0,0078 mM (0,0014 g/l) for myo-inositol; 0,005 mM (0,0006 g/l) og 0,0057 mM for niacinamid; 0,0025 mM (0,0005 g/l) og 0,003 mM (0,0007 g/l) for D-pantotensyre; 0,003 (0,0006 g/l) mM og 0,0034 mM (0,0007 g/l) pyridoksin-HCl; 0,00016 mM (0,00006 g/l) og 0,00019 mM (0,00007 g/l) for riboflavin; 0,0018 mM (0,0005 g/l) og 0,0021 mM (0,0006 g/l) for tiamin-HCl; 0,0014 mM (0,006 g/l) og 0,0016 mM (0,0007 g/l) for folinsyre; 443 pM (600 ng/l) og 885 pM (1,2 mg/l) for vitamin B12 og 0,008 mM (0,003 g/l) og 0,012 mM (0,005 g/l) for vitamin E.

15. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 14, hvori vitaminene som utgjør mediet er til stede ved en konsentrasjon på: 0,004 mM (0,0005 g/l) for cholinklorid; 0,0024 mM (0,0006 g/l) for D-biotin; 0,0067 mM (0,0012 g/l) for myo-inositol; 0,005 mM (0,0006 g/l) for niacinamid; 0,0025 mM (0,0005 g/l) for D-pantotensyre; 0,003 (0,0006 g/l) mM for pyridoksin-HCl; 0,00016 mM (0,00006 g/l) for riboflavin; 0,0018 mM for tiamin-HCl; 0,0014 mM (0,006 g/l) for folinsyre; 616 pM (800 ng/l) for vitamin B12 og 0,010 mM (0,004 g/l) for vitamin E.

16. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvori næringsstoffene som utgjør mediet er D-glukose, pyruvat, fruktose, glutaion, melkesyre eller en hvilken som helst kombinasjon derav.

17. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 16, hvori næringsstoffene som utgjør mediet er til stede ved en konsentrasjon på 4,3 mM (0,78 g/l) for D-glukose; 0,3 mM (0,02975 g/l) for natriumpyruvat; 5,1 mM (0,92 g/l) for fruktose og 10 mM (1,13 g/l) for natriumlaktat.

18. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 17, hvor D-glukose er til stede ved en konsentrasjon på mellom 4,2 mM (0,75 g/l) og 5,6 mM (1,0 g/l).

19. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 18, hvori fruktose er til stede ved en konsentrasjon mellom 1 mM (0,18 g/l) og 5,6 mM (1,01 g/l).

20. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvor antioksidanten i oppløsningen er glutathion.
21. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 20, hvor konsentrasjonen av glutathion er mellom 0,25 mM (0,077 g/l) og 0,35 mM (0,11 g/l).
- 5 22. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 21, hvor konsentrasjonen av glutathion er 0,3 mM (0,092 g/l).
23. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, ytterligere omfattende EDTA.
- 10 24. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 23, hvor konsentrasjonen av EDTA er mellom 0,1 mM (0,0416 g/l) og 0,103 mM (0,043 g/l).
25. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 24, hvor konsentrasjonen av EDTA er 0,1 mM (0,0418 g/l).
26. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, ytterligere omfattende HEPES.
- 15 27. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 26, hvor konsentrasjonen av HEPES er 15 mM (3,5745 g/l) eller 25 mM 5,9575 g/l) og konsentrasjonen av D-glukose er mellom omkring 4,2 mM (0,75 g/l) til omkring 5,6 mM (1,0 g/l).
28. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, ytterligere omfattende fenolrødt eller annen pH-indikator.
- 20 29. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 28, hvor konsentrasjonen av fenolrødt er 0,031 mM (0,011 g/l).
30. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvor gentamycinsulfat er til stede i oppløsningen ved en konsentrasjon på 2 mg/l.
- 25 31. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvor penicillin G er til stede ved en konsentrasjon på omkring 75 mg/l.

32. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, hvor D-mannitol er til stede ved en konsentrasjon fra omkring 0,056 mikromolar til omkring 6,9 mikromolar.
33. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 32, hvor D-mannitol er til stede ved en konsentrasjon på 2,8 mikromolar.
34. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 1, 2, 3 eller 4, ytterligere omfattende natriumbikarbonat.
35. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 34, hvor natriumbikarbonatet er til stede ved en konsentrasjon på 26,2 mM (2,1 g/l).
36. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 35, hvor natriumbikarbonatet er til stede ved en konsentrasjon på mellom 4,0 mM (0,336 g/l) og 26,2 mM (2,1 g/l).
37. Anvendelse av medium for assistert reproduktiv teknologi ifølge krav 36, hvor det i hovedsak proteinfrie dyrkningsmedium er mediet ifølge krav 35.
38. Anvendelse av medium for assistert reproduktiv teknologi ifølge krav 36, hvor den humane reproduktive celle foreligger i ufertilisert form.
39. Anvendelse av medium for assistert reproduktiv teknologi ifølge krav 36, hvor den humane reproduktive celle er et antall spermatozoer.
40. Anvendelse av medium for assistert reproduktiv teknologi ifølge krav 36, hvor den humane reproduktive celle foreligger i fertilisert form.
41. Anvendelse av medium for assistert reproduktiv teknologi ifølge krav 36, hvor mediet er spesifikt for inter-uterin inseminering.
42. Hovedsakelig proteinfritt celledyrkningsmedium for humane reproduktive celler som er egnet for anvendelse gjennom fullstendig in vitro fertilisering av humane reproduktive celler som skal brukes ved in vitro fertilisering og andre assisterte reproduksjonsteknologier, fremstilt fra stamoppløsninger av mineralsalter, aminosyrer, antioksidanter, vitaminer, næringsstoffer, antibiotika, D-mannitol hvor nevnte stamoppløsning blir fortynnet med vann for å danne et i hovedsak protein-

fritt celledyrkningsmedium, hvor nevnte proteinfritt celledyrkningsmedium inneholder metylcellulose som har en molekylvekt på 14 000 Dalton.

43. Hovedsakelig proteinfritt dyrkningsmedium for humane reproduktive celler egnet for anvendelse gjennom in vitro behandling av humane reproduktive celler som skal anvendes ved in vitro fertilisering og andre assisterte reproduksjonsteknikker, omfattende 0,1 g/l (0,0071 mM) metylcellulose med en molekylvekt på 14.000 Dalton; 0,5 mM L-arginin; 0,01 mM L-cystein·2 HCl; 0,02 mM L-histidin; 0,04 mM L-isoleucin; 0,04 mM L-leucin; 0,05 mM L-lysin·HCl; 0,01 mM L-metionin; 0,02 mM L-fenylalanin; 0,04 mM L-treonin; 0,005 mM L-tryptofan; 0,02 M L-tyrosin·2Na₂H₂O; 0,04 mM L-valin; 0,5 mM L-alanin; 20 mM L-aurin; 0,5 mM glutaminsyre og 20 mM L-glutamin eller 0,25 mM L-glycin, 3,1 mM (0,235 g/l) for kalsiumklorid; 0,72 mM (0,087 g/l) for magnesiumsulfat; 4,8 mM (0,355 g/l) for kaliumklorid; 0,11 M (6,171 g/l) for natriumklorid og 0,88 mM (0,108 g/l) for natriumdihydrogenfosfat, : 0,004 mM (0,0005 g/l) for cholinklorid; 0,0024 mM (0,0006 g/l) for D-biotin; 0,0067 mM (0,0012 g/l) for myoinositol; 0,005 mM (0,0006 g/l) for niacinamid; 0,0025 mM (0,0005 g/l) for D-pantotensyre; 0,003 (0,0006 g/l) mM for pyridoksin-HCl; 0,00016 mM (0,00006 g/l) for riboflavin; 0,0018 mM for tiamin-HCl; 0,0014 mM (0,006 g/l) for folinsyre; 616 pM (800 ng/l) for vitamin B12 og 0,010 mM (0,004 g/l) for vitamin E, mellom omkring 4,2 mM (0,75 g/l) til omkring 5,6 mM (1,0 g/l) D-glukose; 0,3 mM (0,02975 g/l) for natriumpyruvat; 5,1 mM (0,92 g/l) for fruktose og 10 mM (1,13 g/l) for natriumlaktat, 0,3 mM (0,092 g/l) glutation; 0,1 mM (0,0418 g/l) EDTA; 0,031 mM (0,011 g/l) fenolrødt; 2,8 mikromolar D-mannitol; 26,2 mM (2,1 g/l) natriumbikarbonat; og 75 mg/l penicillin G eller 2 mg/l gentamycinsulfat.

44. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 43, og som ytterligere omfatter 15 mM (3,5745 g/l) HEPES.

45. Hovedsakelig proteinfritt medium i henhold til krav 43, og som ytterligere omfatter 25 mM (5,9575 g/l) HEPES.