

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010130462/10, 19.12.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.12.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

21.12.2007 US 61/015,764

21.12.2007 NO 20076604

(43) Дата публикации заявки: 27.01.2012 Бюл. № 3

(45) Опубликовано: 27.09.2012 Бюл. № 27

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: АДАМС Р. Методы культуры клеток для
биохимиков. - М.: Мир, 1983, стр.229.BIGGERS JOHN D. et al. Polyvinyl alcohol and
amino acids as substitutes for bovine serum
albumin in culture media for mouse
preimplantation embryos // Human Reproduction
Update. - 1997, Vol.3, No.2, p.p.125-135. RD
SCHRAMM et al. Development of in-vitro-
fertilized primate (см. прод.)(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.07.2010(86) Заявка РСТ:
US 2008/087818 (19.12.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/086191 (09.07.2009)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517

(72) Автор(ы):

АЛИ БИН М. АБДУЛЛА Джафар (МУ)

(73) Патентообладатель(и):

АЛИ БИН М. АБДУЛЛА Джафар (МУ)

(54) БЕЗБЕЛКОВАЯ КЛЕТОЧНАЯ КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА (ВАРИАНТЫ) И ЕЕ
ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области технологий вспомогательной репродукции и касается безбелковых клеточных культуральных сред и их применения. Представленные безбелковые клеточные

культуральные среды содержат минеральные соли, аминокислоты, антиоксиданты, витамины, питательные вещества, антибиотики, D-маннитол и метилцеллюлозу, которая имеет молекулярный вес 14000 Да. Представленные среды возможно использовать

в процедурах вспомогательной репродукции и, оплодотворении. 3 н. и 34 з.п. ф-лы.
в частности, при экстракорпоральном

(56) (продолжение):

embryos into blastocysts in a chemically defined, protein-free culture medium, human // Reproduction. - 1996, Vol.11, No.8, pp.1690-1697. STEWART GJ et al. Methylcellulose protects the ability of anchorage-dependent cells to adhere following isolation and holding on suspension // Biotechniques. - 1995, Vol.19, No.4, pp.598-604.

R U 2 4 6 2 5 1 0 C 2

R U 2 4 6 2 5 1 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01)*C12N 5/075* (2010.01)*C12N 5/076* (2010.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010130462/10, 19.12.2008**(24) Effective date for property rights:
19.12.2008

Priority:

(30) Convention priority:

21.12.2007 US 61/015,764**21.12.2007 NO 20076604**(43) Application published: **27.01.2012 Bull. 3**(45) Date of publication: **27.09.2012 Bull. 27**(85) Commencement of national phase: **21.07.2010**

(86) PCT application:

US 2008/087818 (19.12.2008)

(87) PCT publication:

WO 2009/086191 (09.07.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517

(72) Inventor(s):

ALI BIN M. ABDULLA Dzhafar (MY)

(73) Proprietor(s):

ALI BIN M. ABDULLA Dzhafar (MY)**(54) PROTEIN-FREE CELL CULTURE MEDIUM (VERSIONS) AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: disclosed protein-free cell culture media contain mineral salts, amino acids, antioxidants, vitamins, nutrients, antibiotics, D-mannitol and methyl cellulose, having molecular

weight of 14000 Da.

EFFECT: disclosed media can be used in assisted reproduction procedures, particularly extracorporeal fertilisation.

37 cl

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к безбелковым средам (PFM), приспособленным и оптимизированным для программ репродукции и фертильности человека. По
5 существу безбелковые продукты среды, описанные в настоящем документе, пригодны для предотвращения передачи патогенов, связанных с белками, включая наряду с
прочим в частности прионы, пациентам, перенесшим лечение бесплодия, новорожденным, зачатым с помощью технологий вспомогательной
репродукции (ART) и сотрудникам в данных областях деятельности, особенно
10 имеющим отношение к применению ART человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Общепринятые коммерчески доступные эмбриональные культуральные среды для процедур ART человека содержат человеческий сывороточный альбумин (HSA),
15 полученный из крови человека и тканевых источников. В некоторых лабораториях в качестве источника белка в процедурах культивирования эмбрионов человека также используют бычий сывороточный альбумин (BSA) (Loutradis et al., 1992; Quinn, 1994), получаемый аналогичным образом из крови и тканевых источников быков. Сообщалось, что эффективности сред, содержащих HSA и BSA, аналогичны (Staessen
20 et al., 1998). Применение в культуральной среде белка, полученного от доноров (человека или быка), обладает способностью передавать заболевания пациентам, получающим вспомогательное репродуктивное лечение. Образование жизнеспособных эмбрионов человека в химически заданной культуральной системе (свободной от добавленного белка, или альбумина, или от экстракта белка
25 человеческого или животного происхождения), начиная со сбора ооцитов, с последующей отмывкой сперматозоидов, инсеминацией, оплодотворением вплоть до стадии дробления эмбриона и, наконец, перенос эмбриона не был описан, несмотря на то, что в последние годы сообщалось о химически заданных средах для мыши,
30 кролика или приматов (Spindle, 1995; Li et al., 1996; Schramm and Bavister, 1996). Предыдущие формулы изобретений химически заданной безбелковой среды (PFM), предназначенной для человека, в действительности не были по-настоящему безбелковыми, поскольку сперматозоиды для оплодотворения по-прежнему готовили в среде, которая содержала сывороточные белки (Mohr & Trounson, 1986; Serta and
35 Kiessling, 1997 (Abst); Parinaud et al. 1999). Таким образом, полностью безбелковые среды для процедур ART не были описаны до настоящего времени. Возможность использования химически заданной среды, применяемой для образования жизнеспособных человеческих эмбрионов на ранних стадиях дробления, является
40 необходимой в данной области техники для обеспечения безопасности пациентов, получающих вспомогательное репродуктивное лечение, путем отказа от использования потенциально опасного донорского белка. Беспокойство о возможной передаче патогенных заболеваний, в особенности вирусных заболеваний, таких как синдром приобретенного иммунодефицита человека (AIDS) и гепатит или болезнь
45 Крейтцфельда-Якоба (CJD), передаваемая прионами или другими продуктами, получаемыми из крови, привело ряд поставщиков медицинских услуг в области ART во всем мире к поиску альтернативы (альтернатив) донорскому белку в культуре эмбрионов и в процедурах обработки.

Передача смертельного вирусного заболевания (AIDS) больным гемофилией через продукты, получаемые из крови, убедительно подтверждена документальными
50 доказательствами (см., например, 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). Обнаружено, что гормон роста человека, получаемый из гипофиза, способен передавать CJD людям (Esmonde et al., 1994) и инъекции человеческого гонадотропина также могут переносить CJD от субъекта к субъекту (CDC, 1985). CJD может передаваться через кровь (хотя титр прионов CJD в крови является низким); Neue et al., 1994). В прошлом имела место эпидемия гепатита В среди 200 пациентов IVF, которые получили эмбрионы, культивированные в среде, содержащей смешанные сыворотки, зараженные вирусом гепатита В (van Os et al., 1991). Затем научное сообщество столкнулось с дилеммой о необходимости информирования пациентов о том, что коммерческий препарат культуральной среды, применяемой для культуры эмбрионов и обработки, мог быть заражен через альбумин, полученный от человека, который затем скончался от CJD (Kemmann, 1998).

Есть несколько отчетов о развитии бластоцитов мыши из зиготы и о стадиях дробления в безбелковой среде. Наиболее ранние отчеты включают отчеты Brinster (1965) и Cholewa and Whitten (1970), которые использовали поливинилпирролидон (PVP), который является высокомолекулярным коллоидом, в качестве лубриканта и для увеличения вязкости среды. Вслед за данной работой ряд других исследователей успешно культивировали эмбрионы мыши и других млекопитающих в безбелковой среде (Dandekar and Glass, 1990; Spindle, 1995; Li et al., 1996; Schramm and Bavister, 1996). В последние годы кроме PVP также используют поливиниловый спирт (PVA) (Bavister, 1995) в качестве замены сывороточного белка в культуральной среде. Например, Biggers et al. (1997) изучали эффект замены бычьего сывороточного альбумина (BSA) поливиниловым спиртом (PVA) и/или аминокислотами на развитие зиготы мыши. Они отмечали, что PVA не может полностью заменить BSA в культуральной среде эмбриона мыши. Эффект PVA на скорость развития бластоцисты был лишь немного слабее, чем эффект BSA, но скорость частичного выхода из икры была значительно меньше. Замена BSA на PVA снижает общий ответ, но не приводит к значительным отклонениям.

Кроме многочисленных биологических ролей сывороточные белки придают культуральной среде полезные физические свойства, такие как лубрикация и вязкость. Увеличение вязкости и лубрикации культуральной среды нужны для облегчения обработки и манипулирования эмбрионом и для предотвращения его прилипания к стенкам культуральной чашки и катетеров для переноса эмбрионов. Включение PVP и PVA служит лишь для воспроизведения физических свойств сывороточных белков. Однако PVP и PVA не являются источниками связанного азота, и они не выполняют различных биологических ролей белка. Кроме того, тератологические свойства PVP и PVA не были полностью проверены, что делает проблематичным их применение в терапевтической вспомогательной репродукции человека (Gardner and Lane, 1998a).

Некоторые исследователи предпринимали попытки по образованию жизнеспособных эмбрионов человека в безбелковой культуральной системе, совсем недавно Serta et al. (1997) и Parinaud et al. (1998a). Однако Serta и соавторы (1997) готовили сперматозоиды для оплодотворения путем пропускания через колонку с BSA (хотя последующая культура была выполнена в безбелковой среде). Указанные авторы получили показатель беременностей 31% (n=45), некоторые из которых завершились в срок рождением нормального потомства. Parinaud et al. (1998a) получили оплодотворение сперматозоидами, приготовленными в безбелковой среде, в тех случаях, когда осеменение проводили в той же самой среде. Однако получающиеся в результате зиготы культивировали в среде BM1, и хотя в указанной ссылке не указано, содержала ли среда BM1 белок, в предыдущей публикации указанной группы авторов

предлагалась среда BM1, содержащая 1% HSA (Parinaud et al., 1998b).

Некоторые авторы показали, что замена сывороточного белка одним антиоксидантом и хелатором, таким как ЭДТА (Mehta and Kiessling, 1990; Serta et al., 1997), не ухудшала оплодотворение и деление жизнеспособных эмбрионов мыши и человека. Однако Serta et al. (1997) предложил тщательно промывать катетер для переноса эмбрионов безбелковой средой, что сказывается на свойстве эмбрионов прилипать к внутренней стенке катетера для переноса эмбрионов. Сывороточный белок также играет роль в поддержании значения pH в культуральной среде (Moessner et al., 1993). Кроме роли питательного вещества в биологических системах, белок имеет ряд других ролей, таких как антиоксидант обрыва цепи и хелатор ионов металлов (Barber, 1961; Vidlakova et al., 1972; Wayner et al., 1987).

Физиологические функции альбумина и плазматических белков в целом подробно описаны. Роль альбумина в предотвращении перекисного окисления мембраны указывает на его прямую роль в поддержании стабильности мембраны. Альбумин принимает участие в проницаемости капиллярной мембраны и в осмотической регуляции. Альбумин обеспечивает 80% общего коллоидно-осмотического давления плазмы крови. Альбумин принимает участие в транспорте диоксида углерода и работает как pH-буфер; альбумин составляет наибольшую (95%) долю небикарбонатной буферной способности плазмы крови. Белки также служат в качестве источника энергии. Дезаминированный аланин представляет собой пируват, который может быть превращен либо в ацетил-CoA, либо в глюкозу и гликоген. Альбумин может способствовать повышению растворимости липидов и транспортирует гормоны, витамины и металлы. Альбумин служит как источник для высвобождения и применения указанных компонентов.

Таким образом, при любой попытке по замещению сывороточного альбумина в культуральной среде следует принимать во внимание указанные роли *in vivo* и физические свойства, которые являются полезными для обработки эмбрионов и манипулирования *in vitro*. Один компонент не может выполнить все функции сывороточного белка.

Хотя ранее описаны безбелковые среды, которые поддерживают развитие некоторых видов животных, такие безбелковые среды не использовались успешно для человека, и такие среды также не рассчитаны или являются оптимальными для развития эмбрионов человека. Таким образом, существует явная потребность в заданной безбелковой среде для роста, специально адаптированной для ART и IVF человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Существуют ранее известные предположительно "безбелковые" среды для обработки и культивирования клеток млекопитающих, в особенности клеток грызунов (мышей, крыс, морских свинок, и т.д.), и также для оплодотворения, развития эмбриона и беременности человека при оплодотворении *in vitro*.

Caro et al. описали одну такую "безбелковую" среду, предназначенную для человека; однако они не смогли преодолеть потребность в белках в среде для подготовки спермы, поскольку белки необходимы, чтобы вызвать капацитацию сперматозоида, без которой сперматозоид не приобретет способности проникать внутрь и/или оплодотворять яйцеклетку. Таким образом, средовая система Caro и соавторов не является полностью безбелковой. Аналогичным образом Serta et al. (1997; abstract) и Parinaud et al. (1998a, abstract; 1999) также описали "безбелковые" среды для ART человека, но они, как Caro et al. (1986) перед ними, использовали белки по меньшей

мере на одной стадии своей культуральной системы.

Отмывка сперматозоидов, ранее подготовленных с применением среды, содержащей добавленные белки, как описано в указанных ссылках, не удаляет заражающих инфекционных агентов с полной достоверностью, особенно вирусы и прионы. Кроме того, отмывка также является неблагоприятной, поскольку сперматозоиды подвергаются излишнему воздействию стрессовых условий отмывки, и могут вводиться повышенные требования к персоналу и техническим средствам.

"Безбелковые" среды для роста клеток млекопитающих, в особенности человека, вне контекста IVF раскрыты, в числе прочего, в Kovar et al., 1987, *Biotechnology Letters*, vol. 9 no. 4, p. 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 in a protein-free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production." Данная работа связана, в частности, с продукцией моноклональных антител и не раскрывает адаптирование таких сред для применения IVF или ART. Другие публикации, раскрывающие безбелковые среды, которые не адаптированы или не подходят для процедур IVF человека, представляют собой: Zang et al., 1995, *Biotechnology*, vol. 13, p. 389-392, "Production of Recombinant Proteins in Chinese Hamster Ovary Cells Using A Protein-Free Cell Culture Medium"; и публикация международной заявки на патент № WO 2005/120576 A2.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к композициям новых безбелковых культуральных сред для эмбрионов, предназначенных для поиска яйцеклетки человека (i. промывочная среда), для обработки и хранения сперматозоидов (ii. среды для обработки гамет), для оплодотворения яйцеклетки человека (iii. культуральная среда для эмбрионов), обработки гамет и эмбрионов (iv. среда для обработки гамет и эмбрионов), а также для развития получаемой зиготы в культуре (v. культуральная среда для эмбрионов) в течение 1-2 циклов дробления, для применения в лечении и облегчения недостаточности репродуктивной функции и бесплодия человека с применением процедур ART. Настоящее изобретение включает композицию одного раствора среды, который может заменить и/или может быть использован в качестве замены/среды для всех вышеуказанных растворов новых сред. По существу безбелковая среда по изобретению отличается от безбелковых сред (называемых в описании сериями ART-7 и ART-7b), описанных ранее тем же автором изобретения (Ali, 1997; Ali et al., 2000). В предыдущих отчетах автор изобретения описал систематическое исследование, которое дало в результате композицию трех предыдущих сред, а именно ART-I, ART-2 и ART-3. В том же отчете автор изобретения описал, как серия по существу безбелковых сред ART-7 и ART-7b была образована из среды ART-I. Эмбрионы, полученные с помощью интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI) в серии по существу безбелковых сред ART-7 и ART-7b успешно использовали для лечения 11 из 21 (52,4%) женщин в возрасте 39 лет или моложе для достижения клинических беременностей. Композиции серии сред ART-I, ART-7 и ART-7b не были раскрыты. Настоящее изобретение предоставляет по существу безбелковые среды, которые были разработаны из предшествующей среды ART-3, но отличаются от них. Разработка предшествующей среды ART-3, но не ее композиция, описаны автором изобретения (Ali, 1997; Ali et al., 2000).

В иллюстративных воплощениях настоящего изобретения, в частности, раскрыта серия по существу безбелковых сред, обозначаемых в описании как серия PFM-11.

Указанные среды имеют особое преимущество, заключающееся в том, что они имеют одинаковую композицию, лишены потенциально опасных непостоянных биологических компонентов, которые могут повредить гаметы и эмбрионы, и потенциально могут переносить известные и не известные до настоящего времени смертельные заболевания пациентам, получающим лечение ART, детям, зачатым при помощи такого лечения, и медицинским работникам, участвующим в процедурах лечения ART, а также они соответствуют новым строгим нормам и предписаниям, контролирующим технологии и способы оплодотворения *in vitro*.

Полностью установленная природа композиций по существу безбелковых сред согласно настоящему изобретению также полезна в облегчении исследования в преимплантации метаболизма эмбриона, которое ранее было затруднено из-за неустановленной природы и неоднородного состава доступных в настоящее время композиций культуральных сред для эмбрионов. Качество эмбрионов человека 2-го дня, развившихся в указанной серии по существу безбелковых сред (PFM) с применением технологии слитой ультрамикродоказельной культуры (cUMD), было статистически сравнимо или лучше, чем качество эмбрионов, которые развивались в композициях контрольных коммерческих сред, содержащих сывороточные белки. Среда PFM были не токсичны для сперматозоидов человека. Оплодотворение и последующее развитие эмбрионов человека с помощью общепринятого IVF и интрацитоплазматической инъекции сперматозоидов (ICSI) были сравнимы с контролями.

По существу безбелковые среды по настоящему изобретению также подходят для применения в по существу безбелковой культуре эмбриона человека и в средах для обработки и гарантируют, что связанные с белками заболевания не будут переданы пациентам и новорожденным. По существу безбелковые среды по изобретению можно хранить в замороженном виде при -20°C до 2 лет без потери эффективности.

Настоящее изобретение успешно преодолевает потребность в дополнительных донорских белках в культуральной системе и предоставляет по существу безбелковую культуральную систему для применения в ART человека, в которой используют продукты по существу безбелковой среды, начиная от поиска яйцеклетки, в подготовке сперматозоидов, инсеминации, оплодотворения, культуре получаемого эмбриона и в переносе эмбриона. Данная особенность выгодно отличает среды по настоящему изобретению от ранее описанных "безбелковых" культуральных систем, в которых использовали белоксодержащие продукты среды в какой-либо момент во время процедуры, и, таким образом, они не являлись полностью безбелковыми. Поэтому указанные предшествующие культуральные среды могут быть заражены инфекционными агентами и могут подвергаться возможным регулирующим ограничениям. Композиции, диапазоны, предпочтительные диапазоны и конкретные описания различных компонентов настоящего изобретения изложены в настоящем документе.

Настоящее изобретение представляет собой результат исследований действия, переносимости и определения оптимальных уровней индивидуальных компонентов, таких как аминокислоты, антиоксиданты и хелаторы, осмолиты, витамины, питательные вещества и альтернативные источники энергии, которые могут отчасти заменить различные роли белка *in vivo* и *in vitro* и которые являются примерами функций белков в различных безбелковых средах для обработки (например, среды для обработки сперматозоидов и ооцитов и среда для ICSI) и в культуральных средах по настоящему изобретению для эмбрионов, которые не содержат донорских

сывороточных белков. Оптимальные концентрации упомянутых компонентов применяли для создания нескольких культуральных сред для эмбрионов. Затем определяли лучшие из указанных сред, показывающие наилучшее развитие эмбрионов и значительно более высокую скорость выхода бластоцисты и дополнительно совершенствовали для обеспечения развития эмбрионов человека в отсутствие дополнительных сывороточных белков. По существу безбелковые среды по изобретению способны обеспечить оплодотворение ооцитов человека сперматозоидами, подготовленными в той же самой среде. Образующиеся зиготы затем развивались в по существу безбелковой среде с формированием жизнеспособных эмбрионов человека на ранней стадии дробления. Перенос эмбрионов приводил к нормальной беременности и рождению живых детей.

Таким образом, настоящее изобретение успешно предоставляет среды, применимые для всех процедур IVF/ART (поиск яйцеклетки, подготовка сперматозоидов, инсеминация, оплодотворение, культура получаемого эмбриона и перенос эмбриона), в которых преодолена потребность в дополнительных белках в культуральной системе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предоставляет серию питательных растворов, обозначаемых в целом как среды для обработки эмбрионов и культуральные среды, которые не содержат белок или подобные белку компоненты. Указанные среды применяют для оплодотворения яйцеклеток человека и для последующего развития оплодотворенных яйцеклеток в течение 2-6 дней вне организма *in vitro*. Указанные питательные растворы называются "культуральные среды для эмбрионов". Кроме IVF и ART, другие методики и технологии, где было бы полезно применение по существу безбелковых питательных ростовых сред, включают технологию стволовых клеток и лечение стволовыми клетками, процедуры лечения клеточной/тканевой регенерации и трансплантации. Специалист в данной области техники определит, как адаптировать среды, предлагаемые в описании, для указанных применений.

Как далее подробно описано в деталях, применение по существу безбелковых сред по настоящему изобретению для гамет и эмбрионов человека увеличивало эффективность IVF и ART. Например, показатель клинической беременности, получаемый при использовании общепринятого IVF с по существу безбелковыми (PFM-11) средами возрастает до 50% (14 из 28) во всех возрастных группах и до 53,8% (14 из 26) у женщин моложе 40 лет, по сравнению с доступными в настоящее время средами для эмбрионов, содержащими белки (33% беременностей, объединенных для всех возрастных групп, цитируется по Ali, 2004). Показатель клинической беременности ICSI с по существу безбелковыми средами настоящего изобретения также возрастает до 46,2% (12 из 26) во всех возрастных группах и до 54,5% (12 из 22) у женщин моложе 40 лет. Данное различие является статистически значимым в пользу настоящих по существу безбелковых сред и показывает, что по существу безбелковые среды по настоящему изобретению являются по меньшей мере эквивалентными (и могут превосходить) коммерческую белоксодержащую среду, доступную в настоящее время на рынке. Число детей, рожденных из эмбрионов, образовавшихся в средах PFM-11 с помощью общепринятого IVF, составляло 12, и 12 с помощью ICSI. Дети, рожденные из эмбрионов, образовавшихся в средах PFM-11 изобретения, по-видимому нормальны, разумны, общительны и активны (по сообщениям родителей). Статистические данные приведены на основании примера по

меньшей мере 24 детей с такими родами.

Используемый в описании термин "безбелковый", "по существу безбелковый" и означает, что среды были приготовлены с использованием компонентов, не содержащих белка (как подробно описано в настоящем документе), и что в среды не добавляли белок или содержащие белок компоненты.

Примеры осуществления настоящего изобретения включают серию по существу безбелковых сред, обозначаемую, как серия PFM-11. Указанная серия сред имеет ряд специфических продуктов среды, а именно:

1. По существу безбелковая промывочная среда.
2. По существу безбелковая среда для обработки гамет (сперматозоидов).
3. По существу безбелковая среда для обработки гамет (ооцитов/эмбрионов).
4. По существу безбелковая культуральная среда для эмбрионов.

Указанные среды используют согласно предложенным далее способам, которые предназначены для пояснения, но не ограничивают любые дополнительные применения сред в числе прочего в способах IVF или ART, известных специалистам в данной области техники. В разработке сред по изобретению в экспериментах, как указано далее в описании, каждую процедуру выполняли параллельно, используя общепринятые белоксодержащие среды и типичные PFM изобретения.

Подготовка сперматозоидов человека

Сперму получали от мужчин-пациентов путем мастурбации. Сперматозоиды готовили с помощью стандартной методики swim-up и иногда с помощью методики центрифугирования в градиенте плотности. В процедуре центрифугирования в градиенте плотности полученный осадок дважды отмывали и ресуспендировали в культуральной среде. Препараты сперматозоидов получали соответствующим образом с применением тестируемых или контрольных сред. В частности сперматозоиды для ICSI или IVF готовили в по существу безбелковой среде (PFM-11) для экспериментов по определению эффекта дефицита белка на развитие эмбриона. Собранные сперматозоиды инкубировали до применения в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C.

Стимуляция яичников и поиск ооцитов

Стимуляцию яичников вызывали путем подкожных инъекций агониста гонадотропин-высвобождающего гормона (Buserelin; Suprefact; Hoescht, Frankfurt, Germany), начиная с середины фазы лютеинизации и до достижения менструации или деактивации. Деактивацию считали достигнутой, если толщина эндометрия составляла 4 мм или менее и если уровни эстрадиола, прогестерона и LH в крови достигали исходных значений. Инъекции фолликулостимулирующего гормона (FSH; Metrodin; Serono, Rome, Italy) вводили в течение трех дней для инициации накопления фолликулов. После этого вводили менопаузный гонадотропин человека (Pergonal 500; Serono, Rome, Italy) согласно ответу пациента, чтобы стимулировать развитие фолликулов. Овуляцию индуцировали инъекцией 10000 IU хорионического гонадотропина человека (hCG; Pregnyl; Organon, Oss, Holland) после достижения размера фолликулов 16 мм или более. Поиск ооцитов (OR) проводили через 36 часов путем вагинальной аспирации под контролем УЗИ.

Способы инсеминации и культивирования

Оплодотворение In Vitro (IVF)

Ооциты оплодотворяли по отдельности подвижными сперматозоидами в микрокаплях эквивалентной культуральной среды в концентрации 100000/мл под эквивалентным и эмбрионально тестируемым минеральным маслом (M8410,

Sigma Chemicals, and USA). Инсеминированные ооциты культивировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. На следующее утро ооциты денудировали с помощью денудирующих пипеток (Stripper®, MidAtlantic Diagnostics, USA).

Интрацитоплазматическое введение сперматозоидов (ICSI)

В альтернативной процедуре (применяемой, например, для преодоления недостаточности мужской репродуктивной функции) выполняли ICSI. Ооциты готовили для ICSI путем обработки раствором гиалуронидазы в течение 30 секунд (80 IU/мл; каталожный номер 10110010, Medi-Cult AJS, Lerso Parkalle 42, 2100 Copenhagen, Denmark) и затем переносили в эквilibрированную среду Medi-Cult™ или в по существу безбелковые среды по изобретению. Ооциты человека инкубировали в течение 5-7 минут в культуральной среде в атмосфере 5% CO₂ при 37°C и затем денудировали с помощью денудирующей пипетки (ART No.1670, International Medical Products BV, Zutphen, Holland). Денудированные ооциты человека отмывали и в заключение инкубировали в культуральной среде в течение следующих 30-60 минут.

Коммерчески доступные пипетки для ICSI использовали для микроманипуляции (инъекционные иглы, каталожный номер 130340B; пипетка-держатель, каталожный номер 13030013; Laboratoire CCD, 60 Rue Pierre Charron, 75008 Paris, France или инъекционная игла, каталожный номер 10-MIC; пипетка-держатель, каталожный номер 10-MPH-120; Humagen, Charlottesville, Virginia 22911, USA). Ультрамикрокаплю, 5 мкл PVP (каталожный номер 1089001, Medi-Cult AJS, Denmark), наносили тонким слоем в центр чашки Петри (каталожный номер 1006, Falcon Plastics, Becton Dickinson, Rutherford, New Jersey, 07070, USA). Объем PVP окружали максимально пятью микрокаплями по 10 мкл среды IVF, содержащей HEPES-буфер (Gamete-1009 Scandinavian IVF Sciences AB, Gothenberg, Sweden). Микрокапли покрывали эквilibрированным и эмбрионально тестированным минеральным маслом (M8410, Sigma Chemicals, USA). Препарат спермы (1-2 мкл) вводили в центр объема PVP. ICSI зрелых ооцитов проводили обычным способом (например, по Palermo et al., 1992).

Культивирование в ультрамикрокаплях

Ультрамикрокапли (UMD; 1,5-2 мкл для культуры 3-7 эмбрионов человека) культуральной среды делали в 4-луночных чашках, предварительно заполненных эквilibрированным минеральным маслом. Чашки инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Среду меняли ежедневно (UMD-технология) с помощью пастеровской пипетки с тонко оттянутым кончиком, используя эквilibрированную культуральную среду в предварительных экспериментах, и не меняли (cUMD; или continuous UMD) до 3-го дня культивирования в более поздних экспериментах.

Определение оплодотворения

Оплодотворение определяли через 18-20 часов после ICSI или IVF. Ооциты считали оплодотворенными, если были видны два отдельных пронуклеуса. Оплодотворенные ооциты культивировали в микрокаплях или в ультрамикрокаплях эквilibрированной среды в атмосфере 5% CO₂ при 37°C. Дробление и качество эмбриона оценивали через 24 часа.

Частота блокирования развития зиготы

Данный параметр использовали, для определения, вызывает ли культуральная среда, согласно настоящему изобретению блокировку развития на стадии 1 клетки. Эффективность среды может быть определена с применением указанного исследования. Более высокий процент блокировок развития на стадии 1 клетки будет означать, что среда является недостаточной или менее эффективной.

Оценка качества эмбрионов на 2-е сутки деления

Два параметра использовали для определения качества эмбрионов на 2-е сутки, а именно: средний показатель blastomeres и средний класс эмбрионов. Указанные параметры определяли следующим образом:

(i) Средний показатель blastomeres = $\frac{\text{Общее число blastomeres}}{\text{Общее число эмбрионов}}$.

(ii) Средний класс эмбрионов = $\frac{\text{Сумма классов эмбрионов}}{\text{Общее число эмбрионов}}$.

Поскольку самые здоровые эмбрионы человека на 2-е сутки обычно достигают стадии 4-х клеток, средний показатель blastomeres 4 и выше (в диапазоне от 2 до 6) считали отличным. Эмбрионы классифицировали по шкале от 1 до 4, где цифрой 1 означала плохое качество, и цифра 4 означала отличное качество. Эмбрионы классифицировали совместно минимум трое (предпочтительно четверо) сотрудников лаборатории. Кроме того, два других параметра включены для оценки различий в скорости развития эмбрионов на стадиях дробления. Указанные параметры представляют собой: (i) долю эмбрионов на стадии 4-х клеток или более и (ii) долю эмбрионов, которые имели класс 3 и более на 2-й день культуры в исследованиях человека.

Состав культуральной среды

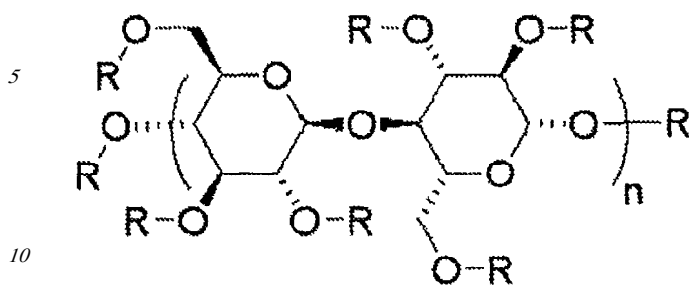
Состав типичных по существу безбелковых сред по изобретению, описанных в настоящем документе, указан далее. Известно, что альбумин является источником связанного азота и питательных веществ, является антиоксидантом и также играет ряд других ролей, включая стабилизацию мембраны. Поэтому в по существу безбелковых средах по изобретению альбумин замещен другими компонентами среды, которые

выполняют по отдельности или совместно функции альбумина в культуре. Индивидуальные компоненты культуральной среды для эмбрионов, применяемые для этих целей, включают аминокислоты (включая без ограничения аланин, аспарагин, аспартат, цистин, глутамат, глутамин, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, таурин, треонин, триптофан, тирозин, валин, серин), антиоксиданты и хелаторы (например, ЭДТА, восстановленный глутатион, токоферол), альтернативные источники энергии (такие как фруктоза, глутамин, пируват натрия), осмолиты (включая маннитол и миоинозитол), витамины (аскорбиновая кислота, цианокобаламин, фолиевая кислота, токоферол и т.д.) и простое железо. Концентрации отдельных компонентов, которые поддерживали наилучшее развитие blastocysts, считали оптимальными. Три среды (ART-1, ART-2 и ART-3) были созданы при разработке настоящего изобретения. Автор изобретения ранее описал различные эксперименты, проведенные для создания серии по существу безбелковых сред ART-7 и ART-7b из культуральной среды ART-1 (Ali, 1997; Ali et al., 2000). Настоящее изобретение, серия безбелковых сред PFM-11, была создана из культуральной среды ART-3 (Ali, 1997; Ali et al., 2000).

Окончательные формулы различных продуктов среды серии PFM-11 представлены в таблицах, как указано ниже. Концентрации NEPES и бикарбоната варьируют в указанных композициях сред, как указано в описании.

По существу безбелковые среды по изобретению содержат минеральные соли, аминокислоты, антиоксиданты, антибиотики, энергетические компоненты и буферные компоненты (NEPES и бикарбонат для инкубации в CO₂-дополненных условиях), которые являются сходными, но отличаются в деталях от коммерчески доступных, белоксодержащих сред. По существу безбелковые среды по изобретению уникально содержат макромолекулярные соединения (метилцеллюлоза и родственные полимеры) и дополнительно неметаболизированный сахарный спирт (D-маннитол).

Макромолекула, содержащаяся в по существу безбелковых средах по изобретению, представляет собой метилцеллюлозу формулы I:



в которой каждый R является независимо CH₃ или H, и n составляет от 34 до 43. В формуле метилцеллюлозы, представленной выше, R может быть либо H либо CH₃.

15 Величина метоксизамещения изменяется в пределах 27,5-31,5 мас.%. Степень замещения (D.S., среднее число замещающих групп, присоединенных к кольцевым гидроксилам) составляет 1,5-1,9. Указанный диапазон обеспечивает максимальную растворимость в воде. Более низкое метоксизамещение дает в результате более высокую растворимость в воде и является предпочтительным. Условное

20 обозначение "n" означает уровень полимеризации и оптимально соответствует молекулярному весу 14000 Да, относящемуся к приблизительному индексу вязкости 15 cPS для 2% раствора в воде при 20°C (метилцеллюлоза, обладающая указанными характеристиками, коммерчески доступна в Sigma Chemical Co., St. Louis, MO USA; www.sigmaaldrich.com); что соответствует значению "n", которое находится между 34

25 и 43, предпочтительно между 36 и 39. Диапазон содержания данного компонента в PFM равен 0,01-0,15 г/л и наиболее предпочтительный диапазон составляет 0,09-0,1 г/л. Оптимальная концентрация составляет 0,1 г/л.

Метилцеллюлоза может действовать как антиоксидант и осмолит, она не токсична, ферментативно устойчива и не проникает в клетку (Stewart et al., 1995). Она способствует защите гамет и эмбрионов от неблагоприятных факторов внешней среды, в особенности от воздействия свободных радикалов и изменений осмотического давления. Она предохраняет клеточные мембраны от повреждения и способствует поддержанию гомеостаза. Она также является сурфактантом и

35 лубрикантом. Она способствует увеличению вязкости среды, чтобы гаметы и эмбрионы не прилипали к стенкам и к внутренней стороне пипеток и катетеров. Указанные физические свойства восполняются в отсутствие сывороточных белков, которые обычно выполняют данные функции. Указанное вещество является инертным

40 и безопасным для человека.

Метилцеллюлоза также используется в фармацевтической и пищевой промышленности уже более 25 лет, без каких-либо побочных эффектов в исследованиях с участием человека или животных.

45 Использование метилцеллюлозы разрешено директивам FAO/WHO и EU, и ее применяют в качестве отрицательного контроля в исследовании рака, поскольку известно, что она не канцерогенна.

Метилцеллюлозу также используют в качестве загустителя и эмульгатора в различных пищевых и косметических продуктах, и она имеет медицинское применение, например, для лечения запора. Она не переваривается, не токсична и не аллергенна.

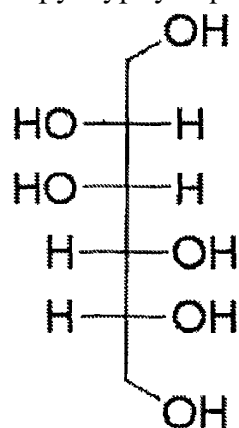
50 Фрамакологические и клинические применения метилцеллюлозы представляют собой применения в качестве наполнителя и носителя. Метилцеллюлозу применяют в глазных каплях, в качестве агента-наполнителя и слабительного средства,

используемого при диарее, связанной с функциональным заболеванием кишечника, для контроля вывода илеостомы и в качестве абсорбента токсических веществ, которые вызывают инфекционную диарею. Она также является антиоксидантом.

По существу безбелковые среды по изобретению также содержат D-маннитол.

Указанное соединение слабо абсорбируется и выводится с мочой практически в неизмененном виде. В качестве антиоксиданта и осмолита данное вещество может предохранять эмбрион от вредных воздействий окружающей среды. Таким образом, D-маннитол может дополнительно отчасти заменить сывороточные белки для защиты эмбрионов от неблагоприятных условий. Интересно отметить, что D-маннитол оказывает положительный эффект на развитие бластоцита мыши *in vitro* даже в присутствии белка в средах.

В типичных по существу безбелковых средах по настоящему изобретению (PFM-11) D-маннитол представлен в предпочтительной концентрации 2,8 микромоля (наиболее предпочтительная концентрация), в диапазоне от 0,056 до 6,9 микромоля. Более предпочтительный диапазон составляет от 1,4 до 5,5 микромоля; еще более предпочтительный диапазон составляет от 2,5 до 3,0 микромоля. Наиболее предпочтительная концентрация составляет приблизительно 2,7 микромоля. Эмпирическая формула D-маннитола представляет собой $C_6H_{14}O_6$ и имеет структурную формулу:



D-маннитол является пищевой добавкой, используемой в в тортах, кондитерских изделиях и сладостях; т.к. маннитол слаще чем сахароза, он считается альтернативным подсластителем для диабетиков. D-маннитол является осмолитом и антиоксидантом. В высоких концентрациях он используется для лечения острого инсульта уже более 30 лет. Гипермолярные концентрации данного соединения применяют для лечения тяжелого повреждения мозга и повышенного внутричерепного давления. D-маннитол является диуретиком и используется для диуреза в случаях отравления или для измерения интерстициального пространства. D-маннитол также оказывает слабительное действие на млекопитающих, включая человека. Не сообщалось о неблагоприятных эффектах у человека в результате клинического применения D-маннитола в качестве терапевтического агента. D-маннитол также нетоксичен и немутагенен в нескольких разновидностях. D-маннитол слабо абсорбируется и экскретируется (Milde, 1965; Widdowson and Dickerson, 1965). Включение данного вещества в культуральную среду увеличивало развитие бластоцисты мыши даже в присутствии сывороточных белков, что позволяет предположить его позитивную роль в культуре эмбрионов в качестве антиоксиданта и осмолита (Ali, неопубликованные данные наблюдений). Применение D-маннитола разрешено FDA и EU, и FAO/WHO пришли к заключению, что он безопасен для потребления человеком.

В растворах и композициях по изобретению D-маннитол формулы II присутствует в концентрации приблизительно от 0,05 микромоль до 6,9 микромоль. Более предпочтительный диапазон составляет от 1,4 до 5,5 микромоль. Наиболее предпочтительная концентрация составляет приблизительно 2,8 микромоль.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что роли сывороточных белков многочисленны и при их отсутствии один или два компонента не могут обеспечить полную замену белков в среде. Таким образом, специалист в данной области техники определит, что изобретение не только предоставляет среды, дополненные метилцеллюлозой и D-маннитолом. Скорее, изобретение предоставляет среды, содержащие, кроме того, сложную смесь дополнительных компонентов, предпочтительно в оптимальных концентрациях, и селективное исключение обычно применяемых в средах компонентов, которые доказали свое вредное действие на эмбрионы в культуре.

Некоторые из сред содержат:

(i) Включение уникальных концентраций двух аминокислот (L-таурина и глутамина), которые являются главными источниками питания и осмотического баланса. Указанные аминокислоты предоставляются в концентрациях в диапазоне от 1 мМ до 30 мМ для L-таурина и от 1 мМ до 50 мМ для L-глутамина, более предпочтительно от 10 мМ до 30 мМ для L-таурина и от 10 мМ до 30 мМ для L-глутамина и наиболее предпочтительно по 20 мМ для L-таурина и L-глутамина.

(ii) Включение в качестве источников энергии одного или нескольких соединений (включая D-глюкозу, фруктозу или пируват), которые с меньшей вероятностью вызовут блокировки развития эмбрионов человека. Оптимальные концентрации фруктозы составляют приблизительно от 0,5 мМ до 6,0 мМ, более предпочтительная концентрация составляет от 1 мМ до 5,6 мМ, и наиболее предпочтительная концентрация составляет 5,1 мМ. Оптимальные концентрации оставшихся двух источников энергии даны в другом месте настоящего документа.

(iii) Включение следующих концентраций определенных аминокислот.

Название	Оптимальный диапазон конц. в PFM (мМ)	Предпочтительный диапазон(мМ)	Наиболее предпочтительная конц. (мМ)
L-аланин	0,1-10	0,45-0,55	0,5
L-аргинин	0,018-0,18	0,072-0,125	0,072
L-цистин·2HCl	0,0025-0,025	0,01-0,02	0,01
L-глутамат	0,01-0,1	0,45-0,55	0,5
L-глицин	0,1-1,0	0,2-0,3	0,25
L-гистидинHCl·H ₂ O	0,005-0,05	0,02-0,04	0,02
L-изолейцин	0,01-0,1	0,04-0,08	0,04
L-лейцин	0,01-0,1	0,04-0,08	0,04
L-лизин HCl	0,0125-0,125	0,05-0,1	0,05
L-метионин	0,0025-0,025	0,01-0,02	0,01
L-фенилаланин	0,005-0,05	0,02-0,04	0,02
L-треонин	0,01-0,1	0,04-0,08	0,04
L-триптофан	0,00125-0,0125	0,005-0,01	0,005
L-тирозин·2Na ₂ H ₂ O	0,005-0,05	0,02-0,04	0,02
L-валин	0,01-0,1	0,04-0,08	0,04

(iv) Включение следующих концентраций водорастворимых витаминов.

Название	Оптимальный диапазон конц. в PFM (мМ)	Предпочтительный диапазон(мМ)	Наиболее предпочтительная конц. (мМ)
Холинхлорид	0,004-0,007	0,004-0,005	0,004

D-Биотин	0,0024-0,004	0,0023-0,003	0,0024
Фолиевая кислота	0,0014-0,0023	0,0014-0,0016	0,0014
Миоинозитол	0,0067-0,011	0,0067-0,0078	0,0067
Никотинамид	0,005-0,008	0,005-0,0057	0,005
D-пантотеновая кислота. 1/2Ca	0,0025-0,004	0,0025-0,003	0,0025
Пиридоксин HCl	0,003-0,005	0,003-0,0034	0,003
Рибофлавин	0,00016-0,00027	0,00016-0,00019	0,00016
Тиамин HCl	0,0018-0,003	0,0018-0,002	0,0018

Диапазон для витамина В 12 является следующим:

Название	Оптимальный диапазон конц. в PFM (пМ)	Предпочтительный диапазон(пМ)	Наиболее предпочтительная конц. (пМ)
Витамин В12	443-885	590-738	616

(v) Включение витамина Е (Vitamin E Type 6, Sigma Chemical Co.) в концентрации от 5 микромоляр до 20 микромоляр, более предпочтительно от 8 микромоляр до 12 микромоляр, еще более предпочтительно 10 микромоляр.

(vi) Исклучение L-аспарагина, L-аспартата и L-серина, которые могут быть вредными для развития зигот и эмбрионов на ранних стадиях дробления.

(vii) Исклучение элементарного железа, которое может быть вредным для развития эмбриона.

(viii) Включение восстановленного глутатиона (GSH) в концентрации от 60 микромоляр до 500 микромоляр, и более предпочтительно от 250 микромоляр до 350 микромоляр, и еще более предпочтительно 300 микромоляр.

Концентрация других соединений в конечном растворе

Описание	Диапазон	Предпочтительный диапазон	Наиболее предпочтительный диапазон
D-глюкоза	0,75-1,0	0,75-0,90	0,78 г/л
Хлорид натрия	6,12-6,95	6,12-6,19	6,171 г/л
Хлорид калия	0,35-0,4	0,35-0,36	0,355 г/л
Хлорид кальция	0,23-0,27	0,23-0,24	0,235 г/л
Сульфат магния	0,086-0,098	0,086-0,087	0,087 г/л
Мононатрий фосфат	0,107-0,122	0,107-0,109	0,108 г/л
ЭДТА, Натрий	0,0419-0,043	0,0416-0,042	0,0418 г/л
Бикарбонат натрия*	2,2	2,2	2,2 г/л
Лактат натрия, 60% сироп	1,9	1,9	1,9 мл/л
Феноловый красный	0,01	0,01	0,011 г/л

*Бикарбонат натрия

В среде для оплодотворения и в культуральной среде	2,2 г/л (26,2 мМ)	2,2 г/л (26,2 мМ)	2,2 г/л (26,2 мМ)
В среде для обработки гамет	2,2 г/л (26,2 мМ)	2,2 г/л (26,2 мМ)	2,2 г/л (26,2 мМ)
В промывочной среде	2,2 г/л (26,2 мМ)	2,2 г/л (26,2 мМ)	2,2 г/л (26,2 мМ)

** HEPES

В средах для оплодотворения и в эмбриональных культуральных средах	0 мМ
В средах для обработки гамет	15 мМ
В промывочной среде	25 мМ

Серия сред PFM-11, предлагаемая в настоящем описании, отличается от общепринятых культуральных сред для эмбрионов по меньшей мере в следующих

аспектах:

1. Отсутствие добавляемых донорских сывороточных белков в среде - данный факт исключает возможность передачи заболеваний, делая серию сред PFM-11 согласно

5 2. Присутствие метилцеллюлозы и D-маннитола.

3. Изменения в композиции среды, касающиеся видов и концентраций аминокислот, антиоксидантов, витаминов, источников энергии и минеральных солей, оптимизированных для культуры для эмбрионов.

10 К числу преимуществ сред по изобретению относится снижение рисков для пациентов/медицинских сотрудников. По существу безбелковые среды по изобретению также являются полезными, поскольку они снижают риски для пациентов, их детей и для медицинских сотрудников, контактирующих со средами. Несмотря на то, что остаются определенные риски, они являются незначительными по сравнению с

15 инфекционными рисками, которых удастся избежать при использовании по существу безбелковых сред по изобретению. Указанные риски содержат аллергию к применяемым компонентам. Шанс возникновения аллергии маловероятен, поскольку ингредиенты, за исключением антибиотиков, в основном инертны и

20 нереакционноспособны. Все ингредиенты представлены в незначительных концентрациях и маловероятно, что они вызовут аллергическую реакцию.

Клиническое испытание

Клиническое испытание было утверждено для переноса эмбрионов, развившихся в конечных композициях серии сред PFM-11. В клиническом испытании также изучали

25 разницу в эффективности серии сред PFM-11 в тех случаях, когда оплодотворение проводили с применением общепринятых IVF и ICSI.

Статистический анализ

Статистические сравнения выполняли с помощью t-критерия Стьюдента для двух

30 выборок или с помощью четырехклеточной таблицы. Значение $p < 0,05$ или менее считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Культуральные показатели ооцитов-симблингов человека при оплодотворении с помощью общепринятого IVF в безбелковой среде PFM-11 и в культуральных средах

35 для эмбрионов MediCult™

Показатель фертилизации ооцитов-симблингов после общепринятого IVF был сходным в контроле MediCult™ и в средах PFM-11 (таблица А). Более высокое относительное число зигот с заблокированным развитием в контрольной среде

40 MediCult™ (8,1%), по сравнению с аналогичным показателем (2,2%) в PFM не являлся статистически значимым. Качество человеческих эмбрионов-симблингов cIVF 2-го дня развития на стадии дробления, развивавшихся в ультрамикрокапельной культуре PFM-11, было значительно выше в терминах числа бластомеров и класса по сравнению с эмбрионами, развившимися в контрольной среде. В среде PFM-11 среднее число

45 бластомеров составляло 3,4, и средний класс эмбрионов составлял 3,1 (n=116). В контрольной среде (MediCult™) среднее число бластомеров было сходным 3,4 (p=0,865), и средний класс эмбрионов был значительно ниже 2,7 (p=0,001), (n=118). Относительное число эмбрионов, которые достигли класса >4, был сходным в обеих

50 группах, но относительное число эмбрионов, которые имели класс >3, был значительно выше в группе безбелковой среды PFM-11.

Таблица А

Качество человеческих эмбрионов-симблингов 2-го дня развития, полученных с помощью общепринятого IVF в безбелковой среде PFM-11

Среда	% Оплодотворения	Блокированные на 1 клеточной стадии %	Среднее Число Бластомеров (ISD)	Средняя степень развития (ISD)	% клеток на стадии ≥ 4	% клеток на стадии ≥ 3
PFM-11 (-белок)	85,3 (116/136)	2,2	3,4 (1,0)	3,1 (0,9)	58,4	74,3
MediCult™ (+белок)	79,2 (118/149)	8,1	3,4 (1,0)	2,7 (0,8)	56,2	58,1
Стат.значимость	p=0,235	P=0,052	p=0,865	p=0,001	p=0,847	P=0,017

[Класс эмбрионов: 4=отлично; 3=хорошо; 2= удовлетворительно; 1=плохо]; контрольные эмбрионы получали с помощью ICSI/IVF; Бласт = бластомер; полученные результаты: тестируемая среда превосходит контроль.

Культуральные показатели ооцитов-симблингов человека при оплодотворении с помощью общепринятого IVF в безбелковой среде PFM-11 и в культуральных средах для эмбрионов MediCult™

Показатель фертилизации ооцитов-симблингов после ICSI был статистически выше в безбелковой среде PFM-11 по сравнению с контролем MediCult™ (77,8% и 69,4%, p=0,043; таблица В). Блок развития на стадии зиготы был меньше в среде PFM-11 по сравнению со средой MediCult™, но данное различие не было статистически значимым (2,8 и 6,3%, соответственно, p=0,088). Качество человеческих эмбрионов-симблингов ICSI 2-го дня развития на стадии дробления, развивавшихся в ультрамикрокапельной культуре PFM-11, в терминах результата подсчета бластомеров по сравнению с эмбрионами, которые развивались в контрольной среде (3,8 и 3,3, соответственно, p=0,001). Средний класс эмбрионов, развивавшихся в среде PFM-11, был сходным с классом эмбрионов, развивавшихся в контрольной среде (2,9 и 2,8, p=0,080). Относительное число эмбрионов, которые достигли класса >4, было сходным в обеих группах, но относительное число эмбрионов, которые имели класс >3, было значительно выше в группе безбелковой среды PFM-11.

Таблица В

Качество человеческих эмбрионов-симблингов 2-го дня развития, полученных с помощью ICSI в безбелковой среде PFM-11

Среда	% Оплодотворения	Блокированные на 1 клеточной стадии	% Среднее число бластомеров (ISD)	Средняя степень развития (ISD)	% клеток на стадии ≥ 4	% клеток на стадии ≥ 3
PFM-11 (-белок)	77,8 (196/252)	2,8	3,8 (1,2)	2,9 (0,7)	71,4	63,5
MediCult™ (+белок)	69,4 (175/252)	6,3	3,3 (1,1)	2,8 (0,8)	54,8	58,6
Стат.значимость	p=0,043	p=0,088	p=0,001	p=0,080	p=0,002	p=0,413

(Класс эмбрионов: 4=отлично; 3=хорошо; 2= удовлетворительно; 1=плохо); Бласт = бластомер; контрольные эмбрионы получали с помощью ICSI/IVF; полученные результаты: тестируемая среда превосходит контроль

Клиническое испытание

Показатель клинической беременности после общепринятого IVF с по существу безбелковыми средами PFM-11 возрастает до 50% (14 из 28) во всех возрастных группах и до 53,8% (14 из 26) у женщин моложе 40 лет; по сравнению с доступными в настоящее время средами для эмбрионов, содержащими белки (33% беременностей для объединенных групп всех возрастов; цитировано из Ali, 2004). Показатель клинической беременности после ICSI с по существу безбелковыми средами PFM-11 также возрастает до 46,2% (12 из 26) во всех возрастных группах и до 54,5% (12 из 22) у женщин моложе 40 лет. Данное различие является статистически значимым в пользу представленных по существу безбелковых сред PFM-11, показывая, что по существу безбелковые среды по настоящему изобретению являются по меньшей мере эквивалентными (и могут быть лучше) доступных в настоящее время коммерческих белоксодержащих сред, представленных на рынке. Число детей, рожденных из эмбрионов, развивавшихся в средах PFM-11 с помощью общепринятого IVF, составило 12 человек (30,8%, то есть родили 8 из 26 женщин, получавших лечение; или 61,5%, родили 8 из 13 беременных женщин; одна беременная выбыла из

последующего наблюдения) и с помощью ICSI также были рождены 12 детей (36%, то есть родили 8 из 22 женщин, получавших лечение) или 66,7% (8 из 12) беременных женщин родили. Дети, рожденные из эмбрионов, развивавшихся в среде по изобретению PFM-11, по-видимому, являются нормальными, разумными, общительными и активными (по сообщениям родителей). Приведенные статистические данные получены на примере по меньшей мере 24 детей, рожденных таким образом.

ЗНАЧЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможность использования химически заданной среды для образования жизнеспособных эмбрионов человека на ранних стадиях дробления повышает безопасность пациентов, получающих вспомогательное репродуктивное лечение (ART), поскольку, помимо прочего, потенциально опасный донорский белок может быть исключен из состава сред. Безопасность имеет особое значение с учетом передачи патологических заболеваний, в особенности вирусных заболеваний, таких как синдром приобретенного иммунодефицита человека (AIDS) и гепатит или болезнь Крейтцфельда-Якоба (CJD), передаваемая прионами, или другие заболевания в продуктах, полученных из крови, привел ряд эмбриологов во всем мире к (безуспешному) поиску альтернативы (альтернатив) донорскому белку в культуре эмбрионов и в процедурах обработки. Угроза, безусловно, является реальной: в прошлом имела место эпидемия гепатита В среди 200 пациентов IVF, которые получили эмбрионы, культивированные в среде, содержащей смешанные сыворотки, зараженные вирусом гепатита В (van Os et al., 1991). Затем научное сообщество столкнулось с дилеммой о необходимости информирования пациентов о том, что коммерческий препарат культуральной среды, применяемой для культуры эмбрионов и обработки, может быть заражен альбумином, полученным от человека, который затем скончался от CJD (Kemmann, 1998). Кроме патогенов и прионов сыворотка или белки, полученные из сыворотки крови, такие как альбумин, могут содержать эмбриотоксические факторы, как у пациентов с эндометриозом, привычным выкидышем и у пациентов, имеющих бесплодие неясного генеза (Miller et al., 1995). Показано, что указанные эмбриотоксические факторы, природа которых остается неизвестной, являются вредными для эмбрионов in vitro (Miller et al., 1995; Fein et al., 1995). Кроме того, применение сыворотки или альбумина вызывает проблему воспроизводимости результатов, поскольку вариации от партии к партии сыворотки или альбумина хорошо различимы. Невозможность контролировать качество различных партий сыворотки крови может повлиять на качество образовавшихся эмбрионов. Проблемы, ассоциированные с эмбриотоксичностью и/или невоспроизводимостью качества сывороточных белков, разумеется, устраняются при использовании химически определенной среды вместо культуральных сред, содержащих донорские белки.

Качество эмбрионов, образовавшихся в культуральной среде PFM-11 в условиях ультрамикрочапельной культуры, было сходным или несколько лучше, чем качество эмбрионов, образовавшихся в контрольной среде, содержащей белки, при аналогичных культуральных условиях. Что еще более важно, показатель фертилизации, показатель блоков развития зигот и качество эмбрионов, образовавшихся в новой по существу безбелковой среде PFM-11, являются не хуже аналогичных показателей любого из тестируемых параметров, наблюдаемых в контрольной среде, содержащей белки. С другой стороны контрольная среда показала себя хуже по некоторым из проверяемых параметров. Клиническое испытание показало, что среда PFM-11 является эффективней или лучше, чем контрольная

культуральная среда для эмбрионов, содержащая белки, для эмбрионов Дня 2. Кроме того, среда совершенно безопасна, так как она лишена опасных донорских белков биологического происхождения.

Было показано, что улучшенное качество эмбрионов, образовавшихся в микрокаплях, является результатом аутокринного и паракринного эффектов определенных факторов роста, высвобождаемых эмбрионом в среду (Paria and Dey, 1990; Paria et al., 1991; Canesco et al., 1992). Действительно, обнаружено, что добавление h1GF-1 в культуральную среду усиливает преимплантационное развитие человека, в особенности существенно улучшалось образование бластоцисты (Lighten et al., 1998). Недавно сообщалось, что совместная культура эмбрионов человека давала в результате более высокий показатель имплантации и беременности во вспомогательной репродукции человека (Almagor et al., 1996). Действие факторов роста в преимплантационном развитии было подробно рассмотрено Kane et al. (1997). Данные предыдущих исследований действия факторов роста показывают отсутствие ясной модели роста для развития эмбриона *in vitro*. Аутокринные факторы роста могут быть важными для эмбрионального развития в стрессовых культуральных условиях. Факторы роста, которые могут показать положительные эффекты на эмбриональное преимплантационное развитие, включают CSF-I; IGF-I; IGF-II; TGF- α и возможно LIF.

Обнаружили, что оплодотворение ооцитов человека происходило в среде PFM-11 с помощью сперматозоидов, подготовленных в PFM-11. Капацитация не затрагивалась. В настоящем описании показано, что PFM-11 эффективно содействует оплодотворению в отсутствие сывороточных белков в среде. Высокий показатель фертилизации во время общепринятого IVF с применением PFM-11 показал, что отсутствие белка в среде не ухудшало капацитацию сперматозоидов, оплодотворение и эмбриональное развитие *in vitro* и дальнейшую жизнеспособность *in utero*. Несмотря на отсутствие белков в среде происходили капацитация сперматозоидов, проникновение сперматозоида в ооцит и оплодотворение.

Показатели клинической беременности, родов и выкидышей были значительно лучше в тестовой группе (применение по существу безбелковых сред по изобретению), по сравнению с контролем (применение общепринятых белоксодержащих сред). Также относительное число беременных женщин в тестовой группе, которые родили, был сходным со средним мировым показателем, представленным для пересадок эмбрионов на стадии дробления (DeMouzon and Lancaster, 1997).

Результаты раскрытых в описании экспериментов показали что: (i) проникновение сперматозоидов в ооциты во время общепринятого IVF, взаимодействие гамет и последующее оплодотворение у человека после общепринятых IVF или ICSI не ухудшались при использовании по существу безбелковых сред PFM-11 по изобретению, (ii) образующиеся эмбрионы ранних стадий дробления были жизнеспособными и были жизнеспособными и способными вызвать клинические беременности, (iii) качество эмбрионов ранних стадий дробления, образовавшихся в PFM-11, было в целом сходным или несколько превосходило качество эмбрионов, образовавшихся в контрольной среде, содержащей сывороточные белки.

Мероприятия по жесткой очистке и стерилизации, применяемые для препаратов животного происхождения, не могут исключить с абсолютной достоверностью возможности передачи неизвестных патогенов (Truyen et al., 1995). При использовании композиции по существу безбелковых сред и замене гиалуронидазы рекомбинантной гиалуронидазой, такой как Cumulase®, теперь стало возможным полностью провести

лабораторные процедуры вспомогательной репродукции без явного риска передачи заболевания пациентам IVF.

В заключение, показано, что по существу безбелковая среда PFM-11 по настоящему изобретению является эффективной при проникновении сперматозоида в ооцит во время общепринятой IVF и оплодотворение после ICSI или общепринятой IVF не нарушается. Беременности в случае пересадки эмбрионов, образовавшихся в PFM, также были без нарушений, с показателем клинической беременности свыше 50% у женщин в возрасте 39 лет и моложе. В целом среда PFM-11 была такой же эффективной, если не превосходила среду, содержащую сывороточные белки, в образовании жизнеспособных эмбрионов человека. Повседневное использование PFM в процедурах вспомогательного оплодотворения может устранить потенциальный риск передачи заболеваний при помощи связанных с белками патогенов или опасных прионов. Настоящее исследование показало, что возможно образование жизнеспособных эмбрионов человека в среде, лишенной дополнительного белка в бесклеточной культуральной системе.

ПОЛУЧЕНИЕ PFM-11 ПО ИЗОБРЕТЕНИЮ

Основной солевой раствор (BSS), базовый раствор 1

Препарат стокового раствора основных солей (основной солевой раствор - BSS), которые должны быть использованы, представляет собой конечный состав культуральной среды PFM, среды для обработки гамет и промывочной среды.

	Составляющие компоненты	Количество (г/л)
1	Хлорид кальция 2H ₂ O	2,65 (23,8мМ)
2	Сульфат магния (безводн.)	0,9767 (8,1 мМ)
3	Хлорид калия	4,0 (53,7 мМ)
4	Хлорид натрия	69,53 (1,2 М)
5	Мононатрийфосфат (безводн.)	1,22 (10 мМ)
6	D-глюкоза	10,517 (58,4 мМ)
7	Феноловый красный	0,11 (0,31 мМ)
8	WFI (вода для инъекций)	950 мл

Процедура приготовления:

1. Промыть сосуд для смешивания WFI (вода для инъекций, удельное электрическое сопротивление 18,2 мегаОм) перед приготовлением базового раствора.

2. Добавить компонент 1 к 1000 мл воды WFI, так как он является чрезвычайно гидрофобным.

3. Добавить компоненты 2-7 по порядку, при постоянном перемешивании и довести конечный объем до 1000 мл с помощью WFI.

4. Стерилизующее фильтрование должно быть осуществлено непосредственно после того, как все растворяемые вещества полностью растворятся. Не фильтровать, если остались растворяемые вещества. Могут быть использованы фильтры 0,1 микрон, но следует избегать чрезмерного давления при фильтровании. Базовый раствор 1 может быть предварительно отфильтрован через фильтр 0,2 микрон с последующим фильтрованием через фильтр 0,1 микрон.

5. После фильтрации не должно быть осадка или помутнения.

6. Налить в сосуды подходящего объема, например в бутылки.

7. Закрыть бутылки (предпочтительно, бутылки с контролем вскрытия).

8. Хранить в темном месте при температуре от 2 до 6 градусов Цельсия.

Хранение и срок годности.

Сток основного солевого раствора (BSS) был стабилен в течение двух месяцев

хранения при температуре от 2 до 6 градусов Цельсия. Перед использованием всегда тщательно проверять хранящийся базовый раствор BSS на наличие осадков или помутнения. Не использовать раствор при появлении осадка или если раствор помутнел при хранении.

Включение объемов стокового раствора 1 BSS в конечный продукт:

В случае если бикарбонат натрия является преимущественным активным буферным компонентом в композиции (культуральные продукты среды), 70 мл** BSS должны быть представлены в каждом 1000 мл приготовленной конечной композиции. В случае если NEPES является преимущественным активным буферным компонентом в композиции (продукты среды для сперматозоидов/промывки), 50 мл BSS добавляются на каждые 1000 мл приготовленной конечной композиции.

Регулировка осмоляльности конечной среды с помощью BSS или воды WFI для увеличения или снижения (соответственно) осмоляльности среды:

В случае если осмоляльность конечной среды должна составлять 285 мОсмоль, если конечный объем составляет менее 1000 мл (т.е. после добавления BSS, BAAS и BVS); кроме того, разбавить отдельно небольшое количество BSS с помощью WFI. Использовать 1 объем BSS с 9 объемами воды WFI для предоставления рабочего раствора BSS (WBSS). Довести осмоляльность WBSS до 285 мОсмоль. Дополнить конечный объем конечной среды до 1000 мл с помощью доведенного WBSS.

Для композиции конечного состава из всех стоковых растворов - см. инструкции для стокового раствора 4.

Основной аминокислотный раствор (BAAS), базовый раствор 2

Указанный протокол использовали для приготовления 1 литра базового раствора основных аминокислот в растворе (раствор основных 5 аминокислот - BAAS) для включения в конечные составы культуральной среды PFM, среды для обработки гамет и промывочной среды.

Реагенты

	Составляющие компоненты	Количество (г/л)
1	L-аргинин HCl	1,26 (6,0 мМ)
2	L-цистин (L-цистин·2HCl)	0,313 (1,0 мМ)
3	L-гистидин HCl·H ₂ O	0,42 (2,0 мМ)
4	L-изолейцин	0,52 (4,0 мМ)
5	L-лейцин	0,52 (4,0 мМ)
6	L-лизин HCl	0,752 (4,1 мМ)
7	L-метионин	0,15 (1,0 мМ)
8	L-фенилаланин	0,32 (1,9 мМ)
9	L-треонин	0,48 (4,0 мМ)
10	L- триптофан	0,1 (0,49 мМ)
11	L-тирозин (L-тирозин·2Na ₂ H ₂ O)	0,519 (2,0 мМ)
12	L-валин	0,46 (3,9 мМ)
13	WFI (вода для инъекций)	1000 мл

Инструкции по приготовлению базового раствора 2 BAAS

1. Промыть сосуды для смешивания WFI (вода для инъекций, удельное электрическое сопротивление 18,2 мегаОм)

2. Растворить компоненты 1, 2 и 4-11 в 400 мл WFI.

Необходимо соблюдать рекомендации производителя по хранению реагентов, так как при условиях ниже чем оптимальные могут возникнуть проблемы с растворимостью. При появлении осадка вылить раствор и начать сначала с использованием 25 мл 0,11 н. NaOH и 275 мл WFI. Гидроксид натрия применяют

только в крайнем случае.

3. L-гистидин $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ и L-валин могут быть плохо растворимы и в таких случаях растворение может быть осуществлено с применением 1 н. HCl . Компоненты 3 и 12 следует растворять в отдельных объемах 300 мл WFI. Использовать только
 5 наименьший возможный объем 1 н. HCl для достижения растворимости. Максимальное количество 1Н HCl (эмбрионально тестированное), которое может быть использовано, составляет 25 мл в 300 мл WFI. Избегать нагревания воды, щелочей и кислот свыше 37 градусов Цельсия для растворения всех компонентов.

10 4. После того как компоненты 3 и 12 полностью растворятся довести конечный объем до 1000 мл путем постепенного добавления поэтапным способом, порции 200 мл растворов водорастворимых аминокислот, сделанных на стадии 2, к:

(а) 300 мл раствора L-гистидина $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$, дающие 500 мл в общем объеме,

(b) 300 мл раствора L-валина, дающие 500 мл в общем объеме.

15 5. Соединить оба объема по 500 мл, постепенно поэтапным способом при постоянном перемешивании, чтобы избежать выпадения осадка.

6. Немедленно стерильно отфильтровать раствор с помощью фильтра 0,2 микрон.

7. Налить в контейнеры подходящего объема (например, в бутылки).

20 8. Закрыть бутылки (предпочтительно бутылки с контролем вскрытия).

9. Хранить в защищенном от света месте при температуре 2-6 градусов Цельсия.

Хранение и срок годности

Базовый раствор основных аминокислот (BAAS) сохраняется в течение двух месяцев хранения при температуре от 2 до 6 градусов Цельсия. Перед использованием
 25 всегда внимательно проверять хранившийся базовый раствор BAAS на наличие осадков или помутнения. Не использовать раствор, если во время хранения появились осадки или помутнение.

Включение объемов базового раствора ВАА в конечный продукт:

30 Базовый раствор ВАА, 10 мл, следует использовать на 1000 мл в приготовлении всех конечных составов.

Использовали L-тирозин $\cdot 2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и L-цистин $\cdot 2\text{HCl}$, поскольку L-тирозин и L-цистин в свободной форме были коммерчески недоступны.

Основной раствор витаминов (BVS), базовый раствор 3.

35 Протокол по данному примеру описывает приготовление 1 литра базового раствора основных витаминов в растворе (раствор основных витаминов - BVS) для включения в конечные составы культуральной среды PFM, среды для обработки гамет и промывочной среды.

Реагенты

	Составляющие компоненты	Количество (г/л)
1	Холинхлорид	0,1 (0,7 мМ)
2	D-биотин	0,1 (0,4 мМ)
3	Миоинозит	0,2 (1,1 мМ)
4	Никотинамид	0,1 (0,82 мМ)
5	D-пантотеновая кислота	0,1 (0,46 мМ)
6	Пиридоксин HCl 0,1	(0,49 мМ)
7	Рибофлавин	0,01 (26,5 мкМ)
8	Тиамин HCl	0,1 (0,33 мМ)
9	Фолиевая кислота	0,1 (0,23 мМ)
10	WFI (вода для инъекций)	1000 мл

Инструкции по приготовлению стокового раствора 3 (BVS)

1. Растворить компоненты 1-7 в 800 мл воды WFI (вода для инъекций, удельное электрическое сопротивление 18,2 мегаОм). В случае если какой-либо компонент не растворяется, могут быть использованы небольшие количества 0,1 N или 1 N NaOH для достижения растворения в качестве последнего средства.

2. Растворить компонент 8 в 2,5 мл 0,1 N NaOH и осторожно добавить поэтапным способом при постоянном перемешивании к 800 мл, содержащим в себе компоненты 1-7.

3. Довести объем до 1000 мл с использованием воды WFI при постоянном перемешивании и немедленно стерильно отфильтровать с помощью фильтра 0,2 микрон в подходящие сосуды (например, бутылки Nalgene объемом 60 мл, бутылки с контролем вскрытия).

4. Закрыть бутылки.

5. Хранить в защищенном от света месте при температуре -20 градусов Цельсия.

Хранение и срок годности.

Базовый раствор основных витаминов (BVS) может храниться в течение двух месяцев при температуре -20 градусов Цельсия в аликвотах объемом 60 мл. Перед использованием всегда тщательно проверять размороженный базовый раствор 3 BVS на наличие осадков или помутнения. Не использовать раствор при появлении осадков, или если оттаявший раствор выглядит мутным.

Включение объемов стокового раствора BVS в конечный продукт

Следует использовать 6,0 мл стокового раствора BVS на 1000 мл в приготовлении всех готовых конечных составов - см. базовый раствор 4.

Базовый раствор 4 и комбинации конечного состава

Приготовление стокового раствора 4 допускает конечное добавление уникальных химических веществ в данный состав и добавление конкретных объемов, взятых из стокового раствора 1 основных солей (BSS), стокового раствора 2 основных аминокислот (BAAS) и стокового раствора 3 основных витаминов (BVS). Протокол описывает добавление буферов и антибиотиков, которые являются специфическими для состава среды, которую нужно приготовить, т.е. культуральной среды, среды для обработки гамет и промывочной среды.

Следующий протокол описывает приготовление 1 литра конечного состава культуральной среды, среды для обработки гамет или промывочной среды. Партии более крупного объема могут быть приготовлены путем соответствующего пропорционального изменения количеств.

Реагенты

	Составляющие компоненты	Количество (г/л)
1	Пируват натрия	0,02975 (0,27 мМ)
2	Фруктоза	0,92125 (5,1 мМ)
3	Глицерин	0,01875 (0,25 мМ)
4	Глутатион (восстановленный)	0,09225 (5,1 мМ)
5	D-маннитол	0,0911 (0,5 мМ)
6	ЭДТА (тетра натрий)	0,04175 (0,1 мМ)
7	L-аланин	0,04455 (0,5 мМ)
8	L-таурин	1,251 (1,0 мМ) 20 мМ
9	L-глутамат натрия	0,0735(0,39 мМ)
10	Лактат натрия	1,9 мл/л
11	Витамин B12	100 мкл/л
12	Витамин E тип 6	333 мкл/л
13	Базовый раствор 1 BSS	70 мл
14	Базовый раствор 2 BAAS	10 мл

	15	Базовый раствор 3 BVS			6 мл
5			Количество (г/л) культуральная среда	Количество (г/л) среда для обработки гамет	Количество (г/л) промывочная среда
	16	Сульфат гентамицина	1,5	4 (сперма) 1,5 (ооцит)	1,5
	17	Пенициллин G	75	0(сперма) 75(ооцит)	75
	18	L-гутамин	1,461 (20 мМ)	1,461 (20 мМ)	1,461 (20 мМ)
	19	Бикарбонат натрия	2,2 (26,2 мМ)	2,2 (26,2 мМ)	2,2 (26,2 мМ)
10	20	HEPES	0,0	3,5745 (15 мМ)	5,9575 (25 мМ)
	21	Метилцеллюлоза	0,1	0,1	0,1
	22	WFI (вода для инъекций)	1000 мл	1000 мл	1000 мл

Инструкции по приготовлению базового раствора 4 и комбинации конечного состава.

1. Промыть сосуд для смешивания WFI (вода для инъекций, удельное электрическое сопротивление 18,2 мегаОм).
2. Растворить компоненты 1-11 в 700 мл WFI при постоянном перемешивании.
3. Добавить компоненты 12-15 и довести объем до 900 мл с помощью WFI и продолжить перемешивание.
4. Добавить компоненты 16-21 в зависимости от приготовления основного типа состава, т.е. культуральная среда PFM, среды PFM для обработки гамет и промывочная среда PFM.
5. Довести осмоляльность всех трех сред и стерилизовать по отдельности посредством фильтрации, используя фильтры с размером пор 0,2 микрон, фильтр с размером пор 0,1 микрон также может быть использован. Не использовать фильтр 0,1 микрон, если для фильтрования раствора требуется высокое давление.
6. Немедленно стерильно отфильтровать в конечную упаковку (бутыли Nalgene): культуральную среду PFM наливают в бутылки объемом 60 мл. Культуральную среду PFM для обработки гамет наливают в бутылки объемом 60 мл. Промывочную среду PFM наливают в бутылки объемом 125 мл (используемые бутылки предпочтительно являются бутылками с контролем вскрытия.)
7. Закрыть бутылки.
8. Подписать бутылки.
9. Хранить в защищенном от света месте при температуре от 2 до 6 градусов.

Примечание для стокового раствора 4 и комбинации конечного состава.

Проверить осмоляльность. Если осмоляльность высокая, то довести значение до 285 мОсмоль путем добавления очищенной воды WFI. Количество воды, которое следует добавить, рассчитывают следующим образом:

[Осмоляльность среды - желаемая осмоляльность (т.е., 285)/Осмоляльность среды] × объем среды.

Пример: если осмоляльность среды составляет 300 и объем среды равен 900 мл, как указано выше, рассчитать, как показано ниже:

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

Следовательно, если вы добавите 45 мл воды к среде и затем вновь измерите осмоляльность, теоретически вы должны получить осмоляльность приблизительно 285 плюс/минус 2 или 3 единицы. Соблюдайте осторожность, чтобы не добавить слишком много воды, поскольку важные ингредиенты в среде будут разбавлены и будет нарушена эффективность среды, даже если вы восстановите осмоляльность среды добавлением дополнительного количества стокового раствора 1 BSS.

Однако если осмоляльность ниже 285 мОсмоль, добавьте базовый раствор 1 BSS только в среду, увеличение составляет приблизительно 2-3 мосмоль на мл стокового раствора 1 BSS, но указанное увеличение не всегда прогнозируемо. Поэтому следует быть очень внимательным, чтобы не добавить слишком много стокового раствора.

5

Добавьте небольшое количество за один прием и измерьте осмоляльность.

ЛИТЕРАТУРА

10

15

20

25

30

35

40

45

50

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, RI-, 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 pre-implantation
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, J., 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 Morb Wkly Rep 34:359-60, 365-6.

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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

35 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 Psychiat. 56:999-1000.

40 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.

Heyc, N., Henson, S., and Muller, N. (1.994) Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. Lancet 343:298299.

Kane, KT., Morgan, P.M. and Coonan, C. (1.997) 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) Non-essential 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, GL, Winston, et al. (1998). Routine addition of human insulinlike growth factor-1 ligand could

benefit clinical in-vitro fertilization culture. Hum.

Reprod. 13,3144-3150

5 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.

10 Androl. 3, 233-238

Mehta, T.S. and Kicssling, A.A. (1990) Development potential
of mouse embryos conceived in vitro and cultured in
15 ethylenediaminetetraacetic acid with and without amino acids or
serum. Biol. Reprod. 43, 600-606

20 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.
25 Assist. Reprod. Rev. 3, 63-67

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A
(1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single
30 spermatozoon into oocyte. Lancet. 340:17-18

Paria, B.C. and Dey, S.K. (1990) Pre-implantation embryo
35 development in vitro: cooperative interactions among embryos and
the role of growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87,
4756-4760

40 Paria, B.C, Tsukamura, H. and Hey, S.K. (1991) Epidermal
growth factor-specific protein tyrosine phosphorylation in pre-
implantation embryo development. Biol. Reprod. 45, 711-718

45 Parinaud, J., Milhet, P., Vieitez, G. et al. (1998a) Human
sperm capacitation and in vitro fertilization in a chemically
50 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
5 Medicine. October 4-9, 1998, San Francisco, California, United
States of America, Fertil. Stern, (suppl.) p.S195-S196
(Abstract)

10 Parinaud, J., Vieitiez, Milhet, P., et al. (1998b) Use of
plant enzyme preparation (coronase) instead of hyaluronidase for
cumulus cell removal before intracytoplasmic sperm injection.
15 Hum. Reprod. .13,1933-1935

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

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

30 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-
35 vitro-fertilized primate embryos into blastocysts in a
chemically defined, protein-free culture medium. Hum. Reprod.
11, 1690-1697

40 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
45 American Society for Reproductive Medicine. October 1.

Stewart GJ, Wang Y, Niewiarowski S. (1995) Methylcellulose
50 protects the ability of anchorage-dependant cells to adhere

following isolation and holding in suspension. Biotechniques.
19(4):598-604

5 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)
10 Beneficial effect of taurine on mouse zygotes developing in
protein-free culture medium. Theriogenology 44, 761-772

15 Staessen, 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
20 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
25 sperm fertilizing ability: implications in IVF. Hum. Reprod.
3, 129-132

30 Parinaud, J., Milhet, P., Vieitez, G. and Richoilley, G.
(1999). Use of a medium devoid of any human or animal compound
(SMART2I) for embryo culture in intracytoplasmic sperm
35 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
40 diseases. Vet. Microbiol. 43, 103-122. Cited in: Parinaud et
al., 1998b

45 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
50 pregnancies. Am. J. Obstet. Gynecol. 165, 152-159

Vidlakova, Erazimova, J., Horky, J. et al. (1972)

Relationship of serum antioxidative activity to tocopherol and
 5 serum inhibitor of lipid peroxidation, Chim. Acta 36, 61-66

Wayner, Dam, Burton, G.W., Ingold, K.U. et al. (1987) The
 10 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

15 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

20 Формула изобретения

1. Безбелковая клеточная культуральная среда для репродуктивных клеток человека, подходящая для применения в процессе обработки in vitro репродуктивных клеток человека, которые используются в оплодотворении in vitro и в других
 25 вспомогательных репродуктивных технологиях, содержащая минеральные соли, аминокислоты, антиоксиданты, витамины, питательные вещества, антибиотики, D-маннитол, причем D-маннитол присутствует в концентрации от 0,056 до 6,9 мкмоль, и метилцеллюлозу, которая имеет молекулярный вес 14000 Дальтон, причем указанная метилцеллюлоза присутствует в растворе в концентрации от 0,01 г/л (0,71 мкмоль)
 30 до 0,5 г/л (0,036 мМ), где минеральные соли, входящие в состав среды, представляют собой хлорид кальция, сульфат магния, хлорид калия, хлорид натрия и фосфат натрия;

где минеральные соли, входящие в состав среды, присутствуют в концентрациях: от 3,0 мМ (0,23 г/л) до 3,6 мМ (0,27 г/л) для хлорида кальция; от 0,7 мМ (0,086 г/л)
 35 до 0,81 мМ (0,098 г/л) для сульфата магния; от 4,7 мМ (0,35 г/л) до 5,4 мМ (0,4 г/л) для хлорида калия; от 0,1 М (6,12 г/л) до 0,12 М (6,95 г/л) для хлорида натрия; и от 0,89 мМ (0,107 г/л) до 1,0 мМ (0,122 г/л) для однозамещенного фосфорнокислого натрия;

где аминокислоты, входящие в состав среды, представляют собой L-аргинин, L-цистин, L-гистидин, L-изолейцин, L-лейцин, L-лизин, L-метионин, L-фенилаланин, L-треонин, L-триптофан, L-тирозин, L-валин, L-аланин, L-таурин, L-глутаминовую кислоту, L-глутамин или глицин или любую их комбинацию;
 40

где аминокислоты, входящие в состав среды, присутствуют в концентрациях: от 0,018 до 0,18 мМ для L-аргинина HCl; от 0,0025 до 0,025 мМ для L-цистина 2HCl;
 45 от 0,005 до 0,05 мМ для L-гистидина HCl·H₂O; от 0,01 до 0,1 мМ для L-изолейцина; от 0,01 до 0,1 мМ для L-лейцина; от 0,0125 до 0,125 мМ для L-лизина HCl; от 0,0025 до 0,025 мМ для L-метионина; от 0,005 до 0,05 мМ для L-фенилаланина; от 0,01 до 0,1 мМ для L-треонина; от 0,00125 до 0,0125 мМ L-триптофана; от 0,005 до 0,05 мМ L-тирозина 2Na₂H₂O; от 0,01 до 0,1 мМ для L-валина; от 1,0 до 10 мМ для L-аланина;
 50 от 1,0 до 30 мМ для L-таурина; от 0,01 до 1,0 мМ для глутаминовой кислоты; от 1,0 до 50 мМ для L-глутамина или от 0,1 до 1,0 мМ для L-глицина;

где антиоксидантом в растворе является глутатион;

где концентрация глутатиона составляет от 0,25 мМ (0,077 г/л) до 0,35 мМ (0,11 г/л);
 где витамины, входящие в состав среды, представляют собой холинхлорид,
 миоинозит, никотинамид, D-пантотеновую кислоту, пиридоксин HCl, рибофлавин,
 тиамин HCl, фолиевую кислоту, витамин B12, витамин E или любую их комбинацию;

где витамины, входящие в состав среды, присутствуют в концентрациях: от 0,004
 мМ (0,0005 г/л) до 0,005 мМ (0,0007 г/л) для холинхлорида; от 0,0024 мМ (0,0006 г/л)
 до 0,0028 мМ (0,0007 г/л) для D-биотина; от 0,0067 мМ (0,0012 г/л) до 0,0078 мМ (0,0014
 г/л) для миоинозита; от 0,005 мМ (0,0006 г/л) до 0,0057 мМ (0,0007 г/л) для
 никотинамида; от 0,0025 мМ (0,0005 г/л) до 0,003 мМ (0,0007 г/л) для D-пантотеновой
 кислоты; от 0,003 мМ (0,0006 г/л) до 0,0034 мМ (0,0007 г/л) для пиридоксина HCl;
 от 0,00016 мМ (0,00006 г/л) до 0,00019 мМ (0,00007 г/л) для рибофлавина; от 0,0018
 мМ (0,0005 г/л) до 0,0021 мМ (0,0006 г/л) для тиамин HCl; от 0,0014 мМ (0,006 г/л)
 до 0,0016 мМ (0,0007 г/л) для фолиевой кислоты; от 443 пМ (600 нг/л) до 885 пМ (1,2
 мг/л) для витамина B12 и от 0,008 мМ (0,003 г/л) до 0,012 мМ (0,005 г/л) для витамина E;

где питательные вещества, входящие в состав среды, представляют собой D-
 глюкозу, пируват, фруктозу, молочную кислоту или любую их комбинацию;

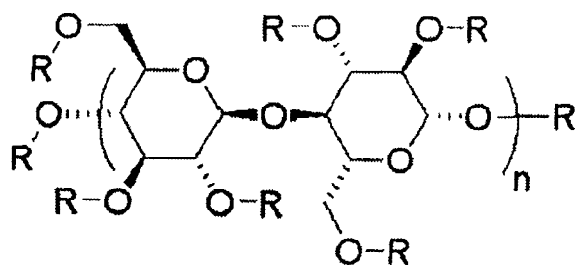
где питательные вещества присутствуют в концентрациях: от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6
 мМ (1,0 г/л) для D-глюкозы; 0,3 мМ (0,02975 г/л) для пирувата натрия; от 0,5 до 6,0 мМ
 для фруктозы и 10 мМ (1,13 г/л) для лактата натрия;

где антибиотики представляют собой пенициллин G и сульфат гентамицина или
 сульфат гентамицина;

где пенициллин G присутствует в концентрации 75 мг/л и сульфат гентамицина
 присутствует в концентрации 1,5 мг/л или сульфат гентамицина присутствует в
 концентрации 4 мг/л.

2. Безбелковая среда по п.1, в которой указанная метилцеллюлоза характеризуется
 тем, что 2%-ный раствор имеет вязкость 15 сП при 25°C.

3. Безбелковая среда по п.1, в которой указанная метилцеллюлоза имеет формулу I



в которой каждый R представляет собой независимо H или CH₃
 и n представляет собой целое число от 34 до 43, и в которой метоксильное
 замещение составляет от 27,5 до 31,5 мас. %.

4. Безбелковая среда по п.3, где среднее число заместителей CH₃, присоединенных к
 каждой единице сахара соединения формулы I, составляет от 1,5 до 1,9.

5. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, дополнительно содержащая ЭДТА.

6. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, дополнительно содержащая феноловый
 красный или другой индикатор pH.

7. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, дополнительно содержащая бикарбонат
 натрия.

8. Безбелковая клеточная культуральная среда для репродуктивных клеток
 человека по пп.1, 2, 3 или 4, приготовленная из, по меньшей мере, одного или из
 некоторого числа базовых растворов минеральных солей, аминокислот,
 антиоксидантов, витаминов, питательных веществ, антибиотиков, D-маннитола и

метилцеллюлозы, имеющей молекулярный вес 14000 Дальтон, в которой указанные базовые растворы разбавляют водой для получения, по существу, безбелковой клеточной культуральной среды.

9. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой указанная метилцеллюлоза присутствует в растворе в концентрации от 0,01 г/л (0,71 мкмоль) до 0,15 г/л (0,011 мМ).

10. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой указанная метилцеллюлоза присутствует в растворе в концентрации 0,1 г/л (0,0071 мМ).

11. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой аминокислоты присутствуют в концентрации: 0,072 мМ L-аргинин; 0,01 мМ L-цистин.2HCl; 0,02 мМ L-гистидин, 0,04 мМ L-изолейцин; 0,04 мМ L-лейцин; 0,05 мМ L-лизин.HCl; 0,01 мМ L-метионин; 0,02 мМ L-фенилаланин; 0,04 мМ L-треонин; 0,005 мМ L-триптофан; 0,02 мМ L-тирозин.2Na2H2O; 0,04 мМ L-валин; 0,5 мМ L-аланин; 20 мМ L-таурин; 0,5 мМ

глутаминовая кислота и 20 мМ L-глутамин или 0,25 мМ L-глицин.

12. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой минеральные соли, входящие в состав среды, присутствуют в концентрации: 3,1 мМ (0,235 г/л) для хлорида кальция; 0,72 мМ (0,087 г/л) для сульфата магния; 4,8 мМ (0,355 г/л) для хлорида калия; 0,11 М (6,171 г/л) для хлорида натрия и 0,88 мМ (0,108 г/л) для однозамещенного фосфорнокислого натрия.

13. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой витамины, входящие в состав среды, присутствуют в концентрации 0,004 мМ (0,0005 г/л) для холинхлорида; 0,0024 мМ (0,0006 г/л) для D-биотина; 0,0067 мМ (0,0012 г/л) для миоинозита; 0,005 Мм (0,0006 г/л) для никотинамида; 0,0025 мМ (0,0005 г/л) для D-пантотеновой кислоты; 0,003 (0,0006 г/л) для пиридоксина HCl; 0,00016 мМ (0,00006 г/л) для рибофлавина; 0,0018 мМ (0,0005 г/л) для тиамина HCl; 0,0014 мМ (0,006 г/л) для фолиевой кислоты; 616 пМ (800 нг/л) для витамина B12 и 0,010 мМ (0,004 г/л) для

витамина E.

14. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой D-глюкоза присутствует в концентрации 4,3 мМ (0,78 г/л).

15. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой фруктоза присутствует в концентрации 5,1 мМ (0,92 г/л).

16. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой концентрация глутатиона составляет 0,3 мМ (0,092 г/л).

17. Безбелковая среда по п.5, в которой концентрация ЭДТА составляет от 0,1 мМ (0,0416 г/л) до 0,103 мМ (0,043 г/л).

18. Безбелковая среда по п.17, в которой концентрация ЭДТА составляет 0,1 мМ (0,0418 г/л).

19. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, дополнительно содержащая HEPES.

20. Безбелковая среда по п.19, в которой концентрация HEPES составляет 15 мМ (3,5745 г/л) или 25 мМ (5,9575 г/л) и концентрация D-глюкозы составляет от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л).

21. Безбелковая среда по п.6, в которой концентрация фенолового красного составляет 0,031 мМ (0,011 г/л).

22. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой сульфат гентамицина присутствует в растворе в концентрации от 1,5 до 4 мг/л.

23. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой пенициллин G присутствует в концентрации 75 мг/л.

24. Безбелковая среда по пп.1, 2, 3 или 4, в которой D-маннитол присутствует в

концентрации 2,8 мкмоль.

25. Безбелковая среда по п.7, в которой бикарбонат натрия присутствует в концентрации 26,2 мМ (2,2 г/л).

26. Безбелковая среда по п.25, в которой бикарбонат натрия присутствует в концентрации от 4,0 мМ (0,336 г/л) до 26,2 мМ (2,2 г/л).

27. Применение среды по п.1 для вспомогательной репродуктивной технологии, включающее стадию применения безбелковой культуральной среды в отношении репродуктивных клеток человека.

28. Применение среды для вспомогательной репродуктивной технологии по п.27, где репродуктивная клетка человека представляет собой неоплодотворенную яйцеклетку или некоторое количество сперматозоидов и где среда является специализированной средой для внутриматочного оплодотворения.

29. Безбелковая клеточная культуральная среда для репродуктивных клеток человека, подходящая для применения в процессе обработки *in vitro* репродуктивных клеток человека, которые используются в оплодотворении *in vitro* и в других вспомогательных репродуктивных технологиях, содержащая 0,1 г/л (0,0071 мМ) метилцеллюлозы, имеющей молекулярный вес 14000 Дальтон; 0,5 мМ L-аргинина; 0,01 мМ L-цистин.2HCl; 0,02 мМ L-гистидина, 0,04 мМ L-изолейцина; 0,04 мМ L-лейцина; 0,05 мМ L-лизин.HCl; 0,01 мМ L-метионина; 0,02 мМ L-фенилаланина; 0,04 мМ L-треонина; 0,005 мМ L-триптофана; 0,02 мМ L-тирозин.2Na2H2O; 0,04 мМ L-валина; 0,5 мМ L-аланина; 20 мМ L-таурина; 0,5 мМ глутаминовой кислоты (0,39 мМ); 20 мМ L-глутамин или 0,25 мМ L-глицина; 3,1 мМ (0,235 г/л) хлорида кальция; 0,72 мМ (0,087 г/л) сульфата магния; 4,8 мМ (0,355 г/л) хлорида калия; 0,11 М (6,171 г/л) хлорида натрия; 0,88 мМ (0,108 г/л) однозамещенного фосфорнокислого натрия; 0,004 мМ (0,0005 г/л) холинхлорида; 0,0024 мМ (0,0006 г/л) D-биотина; 0,0067 мМ (0,0012 г/л) миоинозита; 0,005 мМ (0,0006 г/л) никотинамида; 0,0025 мМ (0,0005 г/л) D-пантотеновой кислоты; 0,003 мМ (0,0006 г/л) пиридоксина HCl; 0,00016 мМ (0,00006 г/л) рибофлавина; 0,0018 мМ (0,0005 г/л) тиамина HCl; 0,0014 мМ (0,006 г/л) фолиевой кислоты; 616 пМ (800 нг/л) витамина B12; 0,010 мМ (0,004 г/л) витамина E; от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л) D-глюкозы; 0,3 мМ (0,02975 г/л) пирувата натрия; 5,1 мМ (0,92 г/л) фруктозы; 10 мМ (1,13 г/л) лактата натрия; 0,3 мМ (0,092 г/л) глутатиона; 0,1 мМ (0,0418 г/л) ЭДТА; 0,031 мМ (0,011 г/л) фенолового красного; 2,8 мМ D-маннитола; 26,2 мМ (2,2 г/л) бикарбоната натрия и 75 мг/л пенициллина G или от 1,5 до 4 мг/л сульфата гентамицина.

30. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.29, в которой концентрация сульфата гентамицина составляет 4 мг/л.

31. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.29, в которой концентрация D-глюкозы составляет от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л) и дополнительно содержащая 15 мМ (3,5745 г/л) HEPES.

32. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.29, в которой концентрация D-глюкозы составляет от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л) и дополнительно содержащая 25 мМ (5,9575 г/л) HEPES.

33. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.30, в которой концентрация D-глюкозы составляет от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л) и дополнительно содержащая 15 мМ (3,5745 г/л) HEPES.

34. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.30, в которой концентрация D-глюкозы составляет от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л) и дополнительно содержащая 25 мМ (5,9575 г/л) HEPES.

35. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.29, в которой концентрация сульфата гентамицина составляет 1,5 мг/л.

36. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.35, в которой концентрация D-глюкозы составляет от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л) и дополнительно
5 содержащая 15 мМ (3,5745 г/л) HEPES.

37. Безбелковая клеточная культуральная среда по п.35, в которой концентрация D-глюкозы составляет от 4,2 мМ (0,75 г/л) до 5,6 мМ (1,0 г/л) и дополнительно
10 содержащая 25 мМ (5,9575 г/л) HEPES.

10

15

20

25

30

35

40

45

50