



MD 4526 C1 2018.09.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală(11) **4526** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61B 17/435* (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 35/54 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
C12N 5/073 (2010.01)
C12N 5/078 (2010.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

| | |
|--|---|
| <p>(21) Nr. depozit: a 2014 0060 (22) Data depozit: 2012.11.21</p> <p>(31) Nr.: 61/629,651; 13/655,257 (32) Data: 2011.11.23; 2012.10.18 (33) Țara: US; US (41) Data publicării cererii: 2014.11.30, BOPI nr. 11/2014</p> | <p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.11.30, BOPI nr. 11/2017</p> <p>(85) 2014.06.20 (86) PCT/US2012/066258, 2012.11.21 (87) WO 2013/078312 A1, 2013.05.30</p> |
| <p>(71) Solicitant: MEZADATA MEDICAL IP HOLDING LLP, US (72) Inventatori: FESKOV Alexander, UA; FESKOVA Irina, UA; ZHYLKOVA Ievgeniia, UA; ZHILKOV Stanislav, US (73) Titular: MEZADATA MEDICAL IP HOLDING LLP, US (74) Mandatar autorizat: GLAZUNOV Nicolae</p> | |

(54) Metodă de fertilizare *in vitro* cu întârzierea transferului embrionar și
utilizarea celulelor mononucleare din sangele periferic

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de fertilizare *in vitro* cu întârzierea transferului embrionar și utilizarea celulelor mononucleare din sangele periferic.

Conform invenției, embrionul se implantează în uterul pacientei la cel puțin două luni, preferențial pe parcursul a 3...12 luni, după extragerea ovulelor de la pacientă, cu scopul de a reduce riscul respingerii embrionului de către sistemul autoimunitar al

2
pacientei și de a crește probabilitatea și rezultatul sarcinii, totodată, înainte de implantarea embrionului, este pregătit endometrul uterului prin introducerea în uter a celulelor mononucleare din sangele periferic (PBMCs). De asemenea, metoda este combinată cu tehnici de crioprezervare, pentru păstrarea ovocitelor sau a embrionilor obținuți prin fertilizarea *in vitro* a pacientei.

Revendicări: 26

MD 4526 C1 2018.09.30

(54) Method of *in vitro* fertilization with delay of embryo transfer and use of peripheral blood mononuclear cells

(57) Abstract:

1
The invention relates to medicine, in particular to a method of *in vitro* fertilization with delay of embryo transfer and use of peripheral blood mononuclear cells.

According to the invention, the embryo is implanted into the uterus of a female patient at least two, and preferably 3..12 months after the eggs are retrieved from the patient in order to reduce the risk of autoimmune rejection of the embryo by the patient's autoimmune system

2
and increase the probability and success of pregnancy and wherein prior to embryo implantation, the endometrium in the uterus is prepared for embryo implantation by introducing peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) into the uterus. The procedure is also combined with cryopreservation techniques to preserve the oocytes or the *in vitro* fertilization-produced embryos of the patient.

Claims: 26

(54) Метод оплодотворения *in vitro* с задержкой переноса эмбриона и использовании мононуклеарных клеток периферической крови

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к медицине, в частности к методу оплодотворения *in vitro* с задержкой переноса эмбриона и использовании мононуклеарных клеток периферической крови.

Согласно изобретению, эмбрион имплантируют в матку пациентки не менее чем через два месяца, предпочтительно в течение 3...12 месяцев после извлечения яйцеклеток от пациентки, с целью снижения риска отторжения эмбриона аутоиммунной системой пациентки и

2
увеличения вероятности и результата беременности, при этом до переноса эмбриона, подготавливают эндометрий матки путем введения в матку мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). Также, метод комбинируется с методами криоконсервации для сохранения ооцитов или эмбрионов полученных при оплодотворении *in vitro* пациентки.

П. формулы: 26

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Prezentă invenție nu a fost dezvoltată cu utilizarea unor Fonduri Federale, ci în mod independent, de către inventatorii enumerați.

Această cerere revendică prioritatea cererii de brevet depuse anterior (US 13/655.257 A1 2012.10.18), care revendică prioritatea cererii de brevet depuse anterior US 11/629,651 A1 2011.11.23, al cărei obiect este încorporat aici, prin referință, în întregime.

10 Prezentă invenție se referă la domeniul fertilizării *in vitro*, în mod special la femeile care au fertilitate scăzută ca rezultat al reacțiilor autoimune. Este dezvoltată o metodă utilizată pentru a spori rata și stabilitatea începutului sarcinii, combinând tehnicile de fertilizare *in vitro*, opțional cu crioprezervarea prelungită a ovocitelor lor sau a embrionilor produși prin FIV, combinată cu pregătirea controlată a endometrului, prin intermediul celulelor mononucleare din sângele periferic (PBMC), înainte de transferul embrionar.

15 Organizația Mondială a Sănătății raportează faptul că, în fiecare an, mai mult de 15% dintre femei la nivel mondial întâmpină dificultăți în a rămâne însărcinate și solicită asistență medicală (OMS 1997), estimate a fi între 60 și 80 de milioane de femei, pe plan mondial, în urmă cu un deceniu. Infertilitatea este definită în general de către Organizația Mondială a Sănătății ca fiind o absență a concepției, după o perioadă arbitrară de douăsprezece luni. Cu toate acestea, multe cupluri încearcă timp de ani de zile să conceapă în mod natural înainte de a solicita asistență medicală în efortul de a concepe o sarcină. O scădere a ratei fertilității este asociată cu factori medicali și non-medicali. De exemplu, s-a demonstrat că vârsta femeilor constituie un determinant major direct al timpului mediu necesar pentru a concepe. S-a demonstrat că insuficiența ovariană prematură apare la 1:1000 din femei înaintea vârstei de 25 de ani; 1:250 din femei până la vârsta de 35 de ani; și 1:100 până la vârsta de 40 de ani. Prin urmare, cea mai mare rată a natalității se situează în grupa de vârstă de 25...30 de ani și scade brusc după vârsta de 35 de ani. Infertilitatea este actualmente una dintre cele mai frecvente probleme de sănătate cu care se confruntă populația între 25 și 45 de ani. Ca atare, există un mare interes și necesitate în ceea ce privește o metodă de extindere a fertilității la femeile sănătoase, eventual, înlăturând barierele legate de vârstă pentru purtarea sarcinii și pentru femeile care sunt incapabile să conceapă prin metode naturale. Deși infertilitatea în sine nu poate amenința sănătatea fizică, ea are adeseori un impact serios asupra bunăstării emoționale, mintale și spirituale a femeilor și cuplurilor.

35 Tehnologiile de reproducere asistată sunt proceduri care implică manipularea extracorporală atât de celule umane (ovocite sau ovule), cât și de spermă (spermatozoizi) și de embrioni, în scopul de a instala o sarcină la un subiect feminin. Aceste proceduri includ, dar nu sunt limitate la, fertilizarea *in vitro* ("FIV"), incluzând transfer de embrioni, transfer intrafalopian de gamet, transfer intrafalopian de zigot, transfer embrionar tubar, crioprezervare a gametului și a embrionului, donare de ovocite sau embrion și surrogat gestațional. Fertilizarea *in vitro* ("FIV") a evoluat ca tratament major pentru infertilitate sau sub-fertilitate, atunci când alte metode de reproducere asistată au eșuat. În sensul său principal, procesul implică extragerea ovulului feminin de la o femeie și fecundarea ovulului de către spermă în afara corpului ("*in vitro*"). Procedul implică monitorizarea procesului ovulatoriu al femeii, extrăgând multiple ovule din ovarele femeii și permițând spermei să fecundeze ovulele într-un mediu lichid, în laborator. Ovulele sunt de obicei extrase de la pacientă prin extragere transvaginală a ovocitelor, care implică străpungerea peretelui vaginal cu un ac ghidat prin ultrasunete, pentru a ajunge la ovare. Prin acest ac, foliculii sunt aspirați, iar fluidul folicular este prelat la laboratorul FIV pentru a se identifica și diagnostica ovulele. De regulă, se extrag între zece și treizeci de ovule de la fiecare pacientă. Ovulul fecundat (embrion), sau, de obicei, embrioni multipli, sunt apoi transferați în uterul pacientei, cu intenția de a instala o sarcină de succes. A se vedea, de exemplu (US7781207 B2 2010.08.24).

55 Dezvoltată pentru prima dată în anii 1970, fertilizarea *in vitro* a oferit o formă eficientă de asistență pentru o mare parte din femei până în prezent. Actualmente, este raportat că FIV reprezintă 1,3% din totalul de nașteri viabile în Europa (Nygren și colab. 2001) și 1,7% din totalul de nașteri viabile în Australia (Hurst și colab. 2001). În Statele Unite, ciclurile tehnologiei de reproducere asistată FIV au debutat în 2006, conducând la 41,343 de nașteri (54,656 de copii), ceea ce reprezintă ceva mai mult de 1,0% din totalul nașterilor de pe teritoriul SUA din acel an. În anul 2010, Robert Edwards a primit Premiul Nobel în

Fiziologie sau Medicină, pentru dezvoltarea fertilizării *in vitro*. Următorul pas a fost posibilitatea de a îngheța și, ulterior, de a dezgheța și de a transfera embrionii, experimentată pentru prima dată de către Carl Wood, ceea ce a îmbunătățit semnificativ fezabilitatea tratamentului FIV.

5 Ratele tipice de succes al sarcinii obținute cu tehnici anterioare de fertilizare *in vitro* rămân relativ scăzute, în intervalul de la 15% la 25%, bazate pe un număr de studii raportate. Este acceptat pe scară largă de către profesioniștii în îngrijirea sănătății faptul că cel mai semnificativ factor de limitare pentru fertilizare este eșecul embrionilor de a se implanta în endometru, mucoasa uterină. Blake și colab. raportează faptul că 80...85% din embrioni

10 eșuează în a conduce la sarcină în urma transferului la pacienții FIV, cauzând o risipă enormă de embrioni. Simon și colab. au demonstrat că, la femeile supuse ciclului FIV, implantarea a fost detectată în 60% din cicluri, de aceea, din toți embrionii transferați pe parcursul FIV, 40% au eșuat implantarea.

15 Un posibil motiv pentru ratele scăzute de implantare pe parcursul FIV este acela că embrionii sunt transferați în uter la două zile după fertilizare, în stadiul celular 4...8. Un punct de vedere este acela că ar fi preferabil să se utilizeze embrioni în stadiul de blastocist atins la 5...7 zile de cultură. Avantajele sugerate includ sincronizarea îmbunătățită dintre embrion și uter și capacitatea de a selecta embrioni superiori calitativi pe parcursul perioadei mai lungi de cultură. Transferul de blastocist poate, de asemenea, să ajute la reducerea numărului de nașteri multiple rezultând din FIV, permițând selecționarea unui număr mai mic

20 de embrioni foarte apti per transfer. De obicei, în timpul procedurii FIV, doi până la cinci embrioni sunt transferați în uter, pentru a crește șansa de implantare, generând riscul sarcinilor multiple. Prin urmare, mai mult de jumătate din totalul copiilor născuți în Statele Unite după tratament FIV provin din sarcini multiple. Uneori, au loc mai multe implanturi în

25 uter și cum embrionii continuă să crească și să se dezvolte în uter, pacienta este incapabilă să ducă la termen mai mult de unul sau doi fetuși. În acel moment, este luată o decizie dificilă pentru a întrerupe acele sarcini și a extrage fătul sau feteșii suplimentari din uter, proces denumit reducere embrionară sau fetală, o procedură care reduce numărul embrionilor sau feteșilor viabili într-o sarcină multiplă. Astfel de decizii atrag atât implicații de ordin etic, cât și implicații psihologice traumatice. Dezvoltarea tehnicilor de laborator care ar crește

30 probabilitatea și certitudinea de implantare a fiecărui embrion sunt în continuare de dorit pentru o parte dintre motivele menționate mai sus.

Intr-un proces numit ciclu natural în fertilizarea *in vitro*, fertilizarea este efectuată prin colectarea unuia sau mai multor ovule selectate în mod natural de la pacientă în timpul

35 ciclului menstrual normal, fără a folosi vreun medicament. În ciclul natural modificat FIV, medicația de fertilitate este folosită timp de două până la patru zile în timpul ciclului natural al unei femei, pentru a se evita ovulația spontană și pentru spori șansele de succes ale tratamentului. "FIV cu stimulare moderată" este o metodă în care o mică doză de medicamente pentru stimulare ovariană este utilizată pe o perioadă scurtă, în timpul unui

40 ciclu natural al unei femei, care vizează producerea de 2...7 ovule și crearea de embrioni sănătoși. Această metodă pare să reducă complicațiile și efectele adverse pentru femei și are în vedere calitatea, nu cantitatea ovulelor și a embrionilor. Cu toate acestea, această metodă conduce la o rată de succes foarte scăzută a sarcinii.

Tehnici suplimentare sunt, prin urmare, utilizate în mod curent, în scopul de a crește

45 șansele de sarcină. Cea mai comună este hiperstimularea ovariană sau superovulația care este utilizată pentru a stimula ovarele, în scopul de a produce ovule multiple care apoi sunt extrase de la pacientă. Protocolul lung implică, de regulă, reducerea (suprimarea sau epuizarea) axei pituitare ovariene, prin utilizarea prelungită a unui agonist al hormonului de eliberare a gonadotropinei (GnRH). Hiperstimularea ovariană ulterioară, folosind de obicei hormonul foliculostimulant (FSH), începe odată ce procesul de reducere este complet, în general, după

50 10 până la 14 zile. Un ciclu FIV utilizând acest protocol este cunoscut ca fiind fertilizare convențională *in vitro*. Protocolul scurt ignoră procedura de reducere și constă într-un regim medicamentos pentru fertilitate, pentru a stimula dezvoltarea de foliculi multipli ai ovarelor. Alte proceduri folosesc agoniști ai hormonilor eliberatori de gonadotropină (GnRH_a), care

55 reduc necesitatea de monitorizare prin prevenirea ovulației premature și, mai recent, au fost utilizați antagoniști ai hormonilor eliberatori de gonadotropină, care au o funcție similară. La majoritatea pacienților, sunt utilizate gonadotropinele injectate (de obicei analogi FSH) sub o atentă monitorizare. O astfel de monitorizare verifică frecvent nivelul de estradiol al pacientei și, prin intermediul ecografiei ginecologice, creșterea foliculară. De obicei, sunt necesare

injecții pe parcursul a 10 zile. Stimularea ovariană comportă riscul de stimulare excesivă care conduce la sindromul de hiperstimulare ovariană (SHSO), o complicație ce poate pune viața în pericol, cu distensie abdominală, hipertrofie ovariană, și complicații respiratorii, hemodinamice și metabolice. În plus, recent s-a demonstrat, de asemenea, că medicamentele pentru fertilitate utilizate pentru stimularea ovulației la pacienții supuși tratamentului FIV contribuie la compromiterea receptivității implantării embrionului în uter și conduc la o rată scăzută a instalării sarcinii (Ertzeid și colab. 2001).

Fertilitatea femeii poate fi afectată de către disfuncțiile aparatului reproducător, ale sistemului neuroendocrin sau ale sistemului imunitar. Unele femei suferinde de cancer riscă să își piardă fertilitatea, deoarece anumite tipuri de tratamente prin chimioterapie, precum și anumite tipuri de tratamente cu radiații, pot conduce la menopauză prematură, provocându-le sterilitate. În Europa de Vest și America de Nord, disfuncția endocrină este identificată la circa 10...20% dintre femeile care se prezintă cu infertilitate (Crosignani și colab. 2000). Totuși, în circa 10...20% din cazuri, cauza infertilității rămâne necunoscută. Este acceptat faptul că reacțiile autoimune ale corpului pot constitui cauza infertilității la multe din astfel de femei. Eșecul reproductiv autoimun și disfuncțiile pot fi asociate cu activarea generală a sistemului imunitar sau cu reacțiile sistemului imunitar care sunt în mod specific îndreptate împotriva antigenelor ovariene.

Haller-Kikkatalo explică faptul că mecanismele de toleranță activă sunt necesare pentru a preveni răspunsurile inflamatorii autoprotectoare ale corpului uman în fața multor antigene externe aeropurtate și antigene din hrană, care sunt întâlnite la suprafețele mucoase ale organismului. Cu toate acestea, cel mai important aspect al toleranței este autotoleranța, care împiedică organismul să genereze un atac imun împotriva propriilor țesuturi – aceasta este prevenția reacțiilor autoimune. Autoimunitatea este asociată cu un dezechilibru al diferitelor componente ale răspunsului imun și cu dezvoltarea de autoanticorpi îndreptați împotriva antigenelor gazdă normale. Fertilitatea femeii este reglată de o serie de interacțiuni puternic coordonate și sincronizate pe axa hipotalamică-pituitară-ovariană. Sindromul eșecului autoimun reproductiv a fost inițial descris de către Gleicher și colab. în cazul femeilor cu endometrioză, infertilitate și nivel crescut de autoanticorpi. Deși impactul anumitor autoanticorpi în patogeneza infertilității nu este încă uniform înțeles, mecanismele autoimune, la fel ca și o producție crescută de mulți autoanticorpi sunt implicate în astfel de disfuncții asociate infertilității, cum ar fi insuficiență ovariană prematură (IOP), forme subclinice de insuficiență ovariană, pierderi recurente ale sarcinii, endometrioză, sindromul ovarului polichistic (SOP), infertilitate inexplicabilă, încercări nereușite repetate ale FIV și avorturi spontane. Unele studii au sugerat importanța mai scăzută a anticorpilor specifici și au subliniat rolul cheie al activării totale a sistemului imunitar în fecundarea redusă. (N. Gleicher, 2001; Dmowski și colab, 1995).

Un grup de cercetători sa-u concentrat pe elaborarea unor metode pentru a depăși infertilitatea asociată sistemului imunitar. Prima și cea mai obișnuită abordare este utilizarea medicației care suprimă răspunsul autoimun la pacient, pentru a permite instalarea sarcinii. De exemplu, o terapie pe cale orală cu prednisolon în doză mică a fost sugerată pentru îmbunătățirea ratei de sarcină la pacientele cu eșec recurent la FIV. Totuși, datele contradictorii existente indică faptul că anumiți anticorpi deteriorează embrionul, interferează cu procesul de implantare sau interferează cu formarea placentei. Aceasta face dificil de prezis succesul terapiei, folosind exact aceste medicamente imunosupresoare. S-au dezvoltat metode utilizând un pretratament mai ușor cu acid acetilsalicilic sau heparină. Cu toate acestea, deși acest tratament a devenit general universal, rata de sarcină folosind această metodă rămâne relativ scăzută (Maghraby și colab., 2007).

A doua abordare a fost recent introdusă. Procedura implică pregătirea atât a endometrului cât și a mediului său înconjurător, prin intermediul celulelor mononucleare din sângele periferic. (PBMCs) (Fujiwara și colab., Kosaka și colab., Yoshioka și colab). Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMCs) permit endometrului uterului să crească în mărime suficientă înainte de implantarea embrionului și, de asemenea, acționează ca subsansamburi în raport cu organismul pentru creșterea embrionului (embrionilor), după implantarea lor în uterul femeii. Conform susținătorilor, PBMC au fost identificate ca fiind celule multipotente. Celulele multipotente produc celule dintr-o anumită linie, foarte apropiată. Ele s-au dovedit a avea capacitatea de a fi transformate în mod natural în orice tip de țesut uman. Celulele multipotente sunt o resursă valoroasă pentru cercetare și tratamente

terapeutice. Descoperirile recente în bioinginerie sunt destul de promițătoare în repararea, construcția, inginerizarea, regenerarea, generarea și creșterea țesutului.

5 Sursa EP1581637 A2 2005.10.05 dezvăluie celule stem adulte derivate din monocite, care sunt izolate din sângele periferic al mamiferelor și metode de preparare, înmulțire și utilizare a acestor celule stem. Sursa US 7795018 B2 2010.09.14 dezvăluie celule multipotente derivate din monocite (MOMCs) care se pot diferenția în celule endoteliale într-un mediu de cultură, în condiții care induc diferențierea în endoteliu. În continuare este dezvăluită o metodă de preparare a MOMCs, care implică cultivarea de PBMCs *in vitro* pe fibronectină și colectarea celulelor asemănătoare fibroblastelor. S-a demonstrat faptul că prin cultivarea într-un mediu EBM-2, un mediu de menținere a celulelor endoteliale, timp de șapte zile, MOMCs se diferențiază în celule endoteliale, modificând morfologia celulelor dintr-o formă de ax la o morfologie având mai multe proiecții conform sursei US7795018 B2 2010.09.14. Cercetătorii implicați în prezenta invenție au emis ipoteza că, prin urmare, utilizarea de PBMCs poate fi utilă pe parcursul procesului reproductiv și au inclus folosirea de PBMCs într-o tehnică nouă de fertilizare *in vitro*.

15 A fost dezvoltat un grup de diferiți agenți de inițiere, care, separat sau în combinație, pot fi aplicați în timpul tratamentului FIV pentru a promova acceptarea embrionului de către sistemul imunitar al unei femei. Printre acești agenți, antigenul leucocitar uman solubil G (sHLA-G), pare a fi promițător. Clasa s-HLA de molecule a fost recunoscută a fi implicată în răspunsul imun și în modularea relației imune materno-fetale în timpul sarcinii. Sher și colab. dezvăluie în sursa US 10/829,081 izolarea sHLA-G din mediul de cultură din jurul embrionilor în cursul dezvoltării embrionilor și blastocistelor. Ei au observat că absența sHLA-G din supernatantul care înconjoară grupurile de embrioni din cultură este asociată cu implantare FIV semnificativ și rate de sarcină redusă. Ei au sugerat faptul că adaosul de sHLA-G la mediul în care embrionii sunt cultivați și / sau livrați în mediul uterin prin transfer de embrioni, ar spori implantarea și potențialul de sarcină al acestor embrioni. Cu toate că această tehnică este utilă, nici această metodă, nici oricare alta, în mod individual, nu a rezolvat problema infertilității autoimune. Se sugerează aici ca astfel de agenți de inițiere să fie utilizați împreună cu procedura din prezenta invenție, pentru a spori probabilitatea și succesul instalării sarcinii.

20 În sfârșit, construcțiile moleculare glicolipidice inginerizate asemănătoare s-au dovedit a fi capabile să modifice embrionii și să consolideze interacțiunea dintre embrion și țesutul țintă, endometrul. Construirea unei matrice macromoleculare pe suprafața exterioară a unui embrion și încărcarea matricei respective cu anumiți agenți de stimulare a instalării sarcinii sunt tehnici care, conform susținătorilor, vor avea aplicații foarte largi în tratamentul FIV în viitor. Această modificare a embrionilor prin această abordare constructivă nu numai că a fost demonstrată cu succes într-un sistem de cultură *in vitro*, dar animalele au dat naștere la pui sănătoși derivați din astfel de embrioni modificați. Cu toate acestea, această abordare nu a fost încă testată în studiile clinice și este în continuare prematur a fi luată în considerare, printre utilizările medicale curente.

25 Multe cercetări au fost îndreptate pentru îmbunătățirea probabilității unei sarcini de succes și nașterii unui copil. În ciuda cercetărilor considerabile, progreselor tehnice și variațiilor în ceea ce privește procedurile, rata sarcinii de succes folosind tratamentul FIV rămâne încă, în medie, la nivelul de 15...25% *per* ciclu. Prezenții cercetători au încercat să abordeze provocarea implantării embrionului și reducerii riscului de răspunsuri ale sistemului autoimunitar, prin prezentarea unei soluții direcționate pe stabilizarea interacțiunii dintre sistemul imunitar al unei femei și embrion.

30 În sensul cel mai larg al invenției, este furnizată o metodă de fertilizare *in vitro* pentru un pacient de sex feminin, metoda cuprinzând etapele de introducere în uter a unei cantități eficiente de o compoziție cuprinzând celule mononucleare din sângele periferic și transferare în uterul pacientei, a cel puțin un embrion, după o întârziere predeterminată ulterioară inițierii fertilizării *in vitro* a pacientei menționate; și în care rezultatele metodei conduc la o creștere a probabilității de implantare a embrionului în uter, cu instalare de succes a sarcinii, în comparație cu metodele de fertilizare *in vitro* care nu includ astfel de pași. Întârzierea predeterminată de timp este o perioadă de timp suficientă pentru a scădea respingerea autoimună a embrionului sau riscul răspunsului autoimun al pacientei. Întârzierea de timp preferată înainte de transferul de embrioni este de cel puțin două cicluri menstruale sau două cicluri ovulatorii ale pacientei, cu toate că întârzierea va varia de la pacientă la pacientă și

între specii, hibridi și varietăți de animale. Întârzierea de timp preferată la un pacient uman este între trei și douăsprezece luni.

5 Acesta este un alt aspect al invenției care, spre sfârșitul perioadei de intarziere, endometrul femeilor este astfel pregătit încât să optimizeze acceptarea embrionului de către
cavitatea uterină. Conform invenției, aceasta se realizează prin injectarea intrauterină a
celulelor mononucleare din sângele periferic (PBMCs), cel mai preferabil obținute de la
pacientă. S-a observat că această metodă crește probabilitatea instalării cu succes a sarcinii și
dezvoltării timpurii a sarcinii. Combinarea întârzierii de implantare cu crioprezervarea
embrionului și pregătirea cu PBMCs a endometrului femeii este esența prezentei invenției.

10 În mod special, este dezvăluită o metodă de fertilizare *in vitro* pentru o pacientă, incluzând pașii de: a) obținere a cel puțin unui ovocit și fecundarea ovocitului cu
spermatozoizi pentru a forma un zigot; b) dezvoltare a zigotului *in vitro* până la stadiul
embrionar; (c) crioprezervare a embrionului; (d) așteptare pentru o perioadă predeterminată
de timp, suficientă pentru a scădea riscul răspunsului autoimun al pacientei; (e) extragere a
15 unei prime cantități de celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs) al pacientei cu 2
până la 4 zile înainte de perioada de așteptare; (f) cultivare a respectivei prime cantități de
PBMCs într-un mediu de cultură adecvat c (g) extragere a unei a doua cantități proaspete de
PBMCs din sângele pacientei în ultima zi a perioadei de așteptare; (h) combinare a primei
cantități cultivate de PBMCs cu a doua cantitate proaspătă de PBMCs, pentru a obține o
20 compoziție care conține PBMCs proaspete și de cultură; (i) introducerea compoziției de
PBMCs în uterul pacientei; (j) scoatere din starea de crioprezervare a embrionului, prin
decongelare; și (k) transferarea cel puțin a unui embrion decongelat în uterul pacientei, pentru
a efectua sarcina.

25 Un aspect suplimentar al invenției este o compoziție care conține PBMCs, o metodă
pentru producerea compoziției și aplicarea compoziției PBMC în tratamentul FIV și pentru
creșterea și inginerizarea anumitor țesuturi țintă ale unui organism, cel mai preferabil
endometrul uterului unei femei. O astfel de metodă implică extragerea de PBMCs din sângele
unei paciente; înmulțirea unei cantități din PBMCs extrasă în prezența a 4,8...6,0% dioxid de
30 carbon (CO₂) la 36,7...37,3°C într-un mediu de cultură care conține (i) mediu RPMI 1640 cu
L-glutamină și bicarbonat de sodiu, (ii) albumină umană recombinată și (iii) un agent
promotor capabil să îmbunătățească capacitatea PBMCs de consolidare a creșterii țesutului,
cum ar fi gonadotropina corionică umană (hCG); și combinarea cantităților proaspete și de
cultură de PBMCs pentru a obține compoziția menționată.

35 Prezența invenție va fi înțeleasă mai bine prin definirea anumitor termeni care sunt
utilizați și care au fost avuți în vedere pe parcursul descrierii.

"Blastocistul" este un embrion, la cinci sau șase zile după fertilizare, cu o masă de celule
interne, un strat exterior de celule numit trofocoderm și o cavitate blastocelică plină cu lichid
care conține masa de celule interne din care derivă întreg embrionul. Trofocodermul este
precursorul placentei. Blastocistul este înconjurat de zona pelucidă care este ulterior
40 eliminată când blastocistul "clocește." Zona pelucidă, compusă dintr-un strat de
glicoproteine, înconjoară ovocitul din stadiul de celulă unică la stadiul de dezvoltare de
blastocist. Înainte de fixarea și implantarea embrionului, zona pelucidă este eliminată din
embrion prin mai multe mecanisme, incluzând degradarea proteolitică. Zona pelucidă
funcționează inițial pentru a preveni intrarea în ovocit a mai mult de un spermatozoid, iar mai
45 târziu pentru a preveni fixarea prematură a embrionului înainte de ajungerea sa în uter.

"FIV cu embrion crioprezervat" se referă la un procedeu de fertilizare *in vitro* în care
embrionul este crioprezervat și apoi decongelat, înainte de transferul embrionar sau un proces
în care ovocitul utilizat pentru fecundare a fost anterior înghețat și apoi dezghețat. "FIV cu
embrion proaspăt" se referă la un procedeu de fertilizare *in vitro* în care embrionul nu este
50 congelat înainte de transferul în cavitatea uterină și în care ovocitele utilizate pentru a pregăti
embrionul nu au fost anterior congelate.

"Embrionul" este produsul diviziunii zigotului la sfârșitul etapei embrionare, opt
săptămâni de la fecundare. Etapa de clivaj a embrionului are loc în timpul primelor trei zile
de cultură.

55 "Transferul embrionar" este procedura prin care unul sau mai mulți embrioni și/sau
blastocite sunt plasate în uter sau tuburi falopiene. Ca atare, termenii "blastocist" și
"embrion" sunt utilizați aici interschimbabil, în scopul de a defini termenul "transfer de
embrion" și în aplicarea termenului "transfer embrionar", în scopul și domeniul de aplicare al
invenției, astfel cum este descrisă și revendicată.

"Endometrul" se referă la țesutul mucoasei suprafeței interne a uterului, care este compus dintr-un strat de celule epiteliale. Embrionul intră în contact mai întâi cu endometrul și matricea extracelulară ("mucus") pentru implantare. Stratul epitelial și cel de la bază de celule stromale se îngroașă ciclic, secretă mucus și este desprins din corp sub influența hormonilor ale ciclului menstrual. Prin termenul "implantare" aici se înțelege fixarea și penetrarea ulterioară de către blastocist (după ce și-a desprins zona pelucidă), de obicei în endometru. Fixarea pe mucoasa endometrului poate avea loc prin interacțiunea dintre moleculele de fixare și pe una sau mai multe componente ale endometrului, incluzând membrane ale celulelor epiteliale, mucus, componente mucinoase de mucus, sau o componentă introdusă exogen a uterului.

"Fertilizarea" se referă la penetrarea ovulului de către spermatozoizi și combinația dintre materialul genetic al acestora, ducând la formarea unui zigot. "Inițierea fertilizării *in vitro*" așa cum este utilizată aici, reprezintă inițierea stimulării ovariene controlate la un pacient de sex feminin, care implică tratament farmacologic în care femeile sunt stimulate să inducă dezvoltarea de foliculi multipli ovarieni, pentru a obține mai multe ovocite la aspirația foliculară.

"Uter", este principalul organ sexual reproductiv sensibil la hormoni în cazul celor mai multe mamifere, inclusiv la oameni, care conține colul uterin la un capăt în timp ce celălalt este conectat la unul sau la ambele trompe uterine, în funcție de specie. Funcția de reproducere a uterului este aceea de a accepta un ovul fecundat care trece prin joncțiunea utero-tubară din tuburile falopiene. Acesta se plantează în endometru și se hrănește din vasele de sânge care se dezvoltă exclusiv în acest scop. Ovulul fecundat devine un embrion, se fixează pe un perete al uterului, creează o placentă și se transformă într-un fetus pe parcursul gestației, până la nașterea copilului. Așa cum este folosit aici, termenul "uter" încorporează tuburile falopiene în scopul transferului embrionar. Termenul "uter" este, de asemenea, utilizat interschimbabil cu termenul "cavitate uterină", care este cavitatea corpului uterului.

În timpul tratamentului FIV, sistemul imunitar al unei femei trece printr-o producție și furnizare stimulată de ovocite. Dacă embrionul produs prin FIV este transferat în cavitatea uterină la scurt timp după extracția ovocitelor, sistemul imunitar poate genera o reacție exagerată. Astfel de reacție exagerată a sistemului imunitar poate fi cauza incapacității organismului de a implanta embrionul și conduce la infertilitate autoimună. În primul său aspect, invenția prezintă întârzierea introducerii embrionului în uter, pentru a permite sistemului imunitar al femeii să se stabilească și să-și recapete echilibrul hormonal adecvat. Pe parcursul întârzierii, ovocitele sau embrionii pacientului feminin sunt opțional prezervate prin crioprezervare.

Întârzierea utilă în metoda prezentei invenții este o perioadă predeterminată de timp, pentru fiecare pacient în parte. Pentru pacienții umani, timpul de întârziere poate fi o perioadă de timp plasată oriunde în timpul a cel puțin două luni sau două cicluri de ovulație. În varianta de realizare preferată, întârzierea predeterminată este de trei cicluri de ovulație, ceea ce corespunde în mod tipic la trei luni. Cele mai multe femei au un ciclu de ovulație la fiecare 28 de zile. Este de înțeles, totuși, că, din cauza faptului că ciclurile de ovulație variază de la femeie la femeie, numărul de zile efective de întârziere va varia de la pacientă la pacientă în cursul tratamentului conform procedurii FIV a invenției. Este posibil ca un pacient de sex feminin să aibă doar două cicluri de ovulație într-o perioadă de trei luni, sau, de asemenea, o femeie poate avea mai mult de trei cicluri de ovulație într-o perioadă de trei luni. În unele cazuri, este posibil ca o pacientă să nu aibă nici o ovulație suplimentară după inițierea ovulației post inițierii tratamentului FIV. Întârzierea de timp poate fi, de asemenea, de o durată mai mare de trei luni, dar va fi, de preferință, în termen de trei luni până la un an. S-a demonstrat aici că perioada predeterminată de întârziere scade semnificativ riscul de infertilitate autoimună și, prin urmare, crește semnificativ probabilitatea de succes al sarcinii.

În limitele invenției se află variante de realizare în care ovocitele sau embrionii care sunt obținuți de la o femeie sau femei, altele decât pacienta, sunt folosite pentru instalarea sarcinii, denumite "ovule donatoare" sau, respectiv, "embrioni donatori". Acest lucru ar avea loc în situațiile în care pacientul femeie nu este capabil să ovuleze sau să producă ovule viabile, sau în care se stabilește că embrionii obținuți prin fecundarea propriilor ovule ale pacientei prezintă deficiență sporită pentru a face posibil transferul de embrioni, sau au o probabilitate scăzută de supraviețuire, pe baza testării morfologice sau genetice.

În metoda obișnuită, femeile care sunt supuse la FIV necesită injecții cu hormoni, pentru a stimula dezvoltarea foliculară și producerea de ovule multiple. Acest proces de stimulare necesită, de obicei, utilizarea inițială a unui agonist al hormonului de eliberare a gonadotropinei (GnRH), pentru a suprima funcția ovariană, împiedicând ovulația până la momentul dorit. Medicația care este cel mai frecvent utilizată este clomifen citrat (Clomid®), un modulator selectiv al receptorului de estrogen, care crește producția de gonadotropine prin inhibarea feedbackului negativ de la estrogen la hipotalamus. Această inducere a maturării finale și eliberare a ovocitelor este adesea indusă prin administrarea de hormon luteinizant. Protocoalele pentru aceste injecții sunt bine cunoscute și stabilite în domeniu și sunt utilizate în oricare dintre variantele de realizare ale metodelor invenției.

Conform metodei acestei invenții, ovulele nefecundate sunt recoltate și preluate de la pacientul de sex feminin prin tehnici cunoscute în domeniu. Astfel de tehnici implică plasarea unui ac special proiectat în foliculul ovarian și eliminarea fluidului care conține ovulele. Odată ce fluidul folicular este eliminat din folicul, ovulele pot fi examinate microscopic și diagnosticate pentru a observa caracteristicile lor morfologice. O metodă de a obține ovocite pentru FIV este dezvăluită în [1]. În metoda de față, șase ovocite sunt recoltate de la pacientă, cu toate că, de preferință, se obțin patru. Ovulele sunt apoi plasate într-un incubator. Pentru a fertiliza ovulele este folosită înseninarea convențională sau injectarea intracitoplasmatică de spermă (ICSI). Tipul de fertilizare utilizat se bazează adesea pe parametrii materialului seminal masculin sau alți factori cum ar fi tipul de analiză care poate fi necesară embrionului. În timpul înseninării convenționale, sperma este amestecată cu ovulele într-un vas de cultură și sunt incubate peste noapte, pentru a fi supuse procesului de fertilizare. În timpul injectării intracitoplasmatică a spermei, un spermatozoid este injectat direct într-un ovul. Indiferent de tehnică, ovulele sunt observate în ziua următoare pentru a fi evaluate în ceea ce privește diviziunea celulară. Ovulele fecundate, acum numite embrioni, sunt apoi plasate în medii de cultură specifice pentru îmbunătățirea creșterii și dezvoltării.

Conform invenției, ovocitele sau embrionii obținuți prin FIV sunt crescuți pe mediu de cultură adecvat. Mediul de cultură disponibil încearcă să furnizeze substanțele nutritive necesare pentru ca celulele să crească și să se dezvolte și caută să copieze cât mai mult posibil condițiile care apar în mod normal în sistemul de reproducere feminin. Aici pot fi utilizate medii de cultură cunoscute în domeniu, care sunt potrivite pentru a fi utilizate pentru ajutorarea *in vitro* a dezvoltării și creșterii celulei în experimente de laborator. Exemplele includ, dar nu sunt limitate la, fluid tubal uman, (HTF) (Irvine Scientific), mediu de N-2-hidroxietyl-piperazin-N'-2-etan (HEPES) (Irvine Scientific), FIV-50 (Scandinavian FIV Science), S2 (Scandinavian IVF Science), G1 și G2 (Scandinavian IVF Science), UniIVF, ISM-1, BlastAssist, mediu UTM (comercializat ca MEDICULT® mediu de Origio A/S), Mediu Whittens modificat, mediu Wittinghams T6, mediu Ham F-10, soluție Earle. Sunt de obicei furnizate sisteme de tampon, cum ar fi acidul 4-morfolino propansulfonic (MOPS). Procedurile sunt bine stabilite în (Trousseau și colab., 1980 și 1982) și (Quinn și colab., 1985).

Mediile de cultură de țesut, în general, sunt sisteme complicate, care conțin o serie de aminoacizi, vitamine și alți compuși. Unele medii constau din soluții de săruri echilibrate, suplimentate cu surse de energie de carbohidrați, cum ar fi glucoza, piruvatul și lactatul. Mediul poate fi, de asemenea, completat cu aminoacizi non-esențiali. Componentele din mediu sunt adesea derivate din surse non-umane și non-animale, cum ar fi microorganisme recombinante. Este de dorit să se ia măsuri pentru a reduce posibilitatea de contaminare, cum ar fi purificarea adecvată și tehnici de preparare practicate în domeniu. În plus, mediul poate include antibiotice, cum ar fi penicilina sau streptomycină, pentru a distruge bacteriile care pot fi introduse în mediu în timpul procesului de colectare a ovocitelor.

În timpul dezvoltării *in vivo* în cadrul sistemului de reproducere feminin, ovocitul este produs și eliberat din ovar în timpul ovulației și înaintează prin oviduct spre uter. Lichidul oviductului conține o serie de componente care oferă hrană pentru ovocit și celulele cumulus din jurul său. După ce are loc fecundarea, zigotul rezultat se deplasează în jos prin oviduct și intră în uter aproximativ trei zile mai târziu, fiind supus la transformare internă și confruntându-se cu un mediu în schimbare. Schimbări semnificative în dezvoltare apar pe măsură ce zigotul/embrionul/blastocistul se dezvoltă. Compoziția fluidului în uter care înconjoară embrionul în dezvoltare este adaptată la aceste nevoi în schimbare.

Niciun mediu nu este optimizat pentru sprijinirea gameților, fertilizarea, maturizarea zigotului și dezvoltarea embrionului, comparativ cu mediul natural al sistemului de reproducere feminin. Astfel, un număr de medii specializate au devenit disponibile pentru a

aborda etapele diferite de dezvoltare a embrionului. De exemplu, mediile G1 și G2 au fost formulate în mod special pentru a satisface nevoile fiziologice ale etapei de clivaj embrionar și ale embrionului, în stadiul de dezvoltare de blastocist, cu opt celule. Sursa US 6605468 B1 2003.08.12, Robertson și colab. dezvoltă un mediu pentru propagarea de embrioni în stadiu incipient către etapa de blastocist. Mediul conține o cantitate eficientă de factor stimulator al coloniilor de granulocite-macrofage (GM-CSF), pentru a crește procentul de embrioni pre-blastocist care se dezvoltă în blastociste gata de a fi transferate. Este dezvoltată, de asemenea, o metodă de creștere a embrionilor umani în stadiu incipient către blastociste gata de a fi transferate. Rezultatul este că o proporție mai mare de embrioni poate fi adusă la stadiul de blastocist și utilizată pentru implantare într-un program FIV. Un număr de studii au fost realizate folosind tehnici de cultură în care embrionii sunt co-cultivați cu celule de hrănire (Menezes și colab., 1990.; Planchot și colab., 1995). Alți factori stimulatori cum ar fi citokinele pot fi adăugate la mediu pentru a propaga creșterea embrionului, cum ar fi factorul de inhibare a leucemiei (LIF), a se vedea, de exemplu, sursa US 5418159 A 1995.05.23, Factorul inhibitor al leucemiei este un hormon puternic având utilitate generală în domeniul embriologiei *in vitro*, cum ar fi menținerea liniilor de celule stem embrionare și creșterea eficienței transferului de embrioni.

În sursa [2] se menționează că în loc de cufundarea celulelor de reproducere umane într-un unic mediu de cultură pe tot parcursul procesului FIV, celulele de reproducere pot fi deplasate printr-o secvență de medii de cultură distincte, pe măsură ce sunt efectuate diferitele proceduri FIV. Într-o formulare, mediul de cultură este special conceput pentru a oferi un mediu fizic similar celui găsit în tractul reproductiv feminin și care să conducă la creșterea și dezvoltarea de embrioni. Dezvoltarea sugerează că mediul specializat poate fi oferit pentru extragerea și manipularea ovocitelor, maturarea ovocitului, fecundare obișnuită, examinarea și biopsia ovocitului, zigotului și embrionului, dezvoltarea embrionară la stadiul de 8 celule, dezvoltarea embrionară la stadiul de blastocist, transferul de embrioni și crioprezervarea.

În plus față de utilizarea mediilor de cultură disponibile în mod obișnuit pentru prepararea embrionului, metoda invenției poate fi combinată cu alte tehnici, pentru a crește probabilitatea și succesul instalării sarcinii. Au fost dezvoltate o serie de metode în care embrionul este modificat în anumite moduri înainte de transferul în cavitatea uterină. De exemplu, sursa [3] dezvoltă modificarea enzimatică a antigenului H de pe suprafața celulară, prin adăugarea uneia sau mai multor unități de monozaharide care generează celule care sunt serologic echivalente cu celulele roșii din sânge antigen A sau B. Cercetările indică faptul că există un receptor pentru hialuronat pe embrion și că există, de asemenea, un receptor pentru hialuronat pe endometru uterului mamei. Hialuronatul se consideră că acționează ca adeziv biologic care ajută embrionul în legarea la endometru și, în consecință, sprijină implantarea. Sursa [4], Carter și colab. dezvoltă o metodă de localizare a acidului hialuronic la suprafața unei celule sau structuri multicelulare (un embrion), pentru a fi utilizată în proceduri FIV. Dezvoltarea furnizează structuri de carbohidrați-lipide care se încorporează stabil în bistratul de lipide sau în membrana unei celule sau embrion, modificând activitatea sa biologică în scopul de a îmbunătăți anumite caracteristici, cum ar fi caracteristicile de creștere, caracteristicile de depozitare și de supraviețuire a embrionului și probabilitatea de transpunere a embrionului în urma transferului în uter. În mod similar, sursa [5], Blake și colab. dezvoltă un alt construct preparat exogen pentru a îmbunătăți fixarea și implantarea unui embrion. Embrionul este modificat de glicolipide cu cozi de lipide, care sunt inserate în membrana celulară a embrionului sau în zona pelucidă în care glicolipida a fost modificată pentru a încorpora o parte de legare, în care partea de legare este adaptată pentru a permite legarea la o moleculă de fixare. Fixarea embrionului de endometru se poate produce direct prin porțiunile de legare sau prin intermediul unei molecule de legătură. O altă metodă, colorarea proteinelor, este o metodă pentru modificarea antigenelor externe ale membranelor celulare fără transfer de gene. Descrierea pentru cererea internațională [6] indică creșterea implementării prin punerea în contact a embrionului cu o moleculă lipidică de adeziune modificată, astfel încât să modifice dezvoltarea embrionului. Sursa US 2013067021 A1 2013.03.14 descrie o altă metodă non-transgenică pentru schimbări calitative și/sau cantitative eficiente în antigenele de suprafață exprimate de o celulă. Constructele de molecule sintetice dezvoltate de către cercetători se încorporează în bistratul lipidic al celulei, și se propune ca o astfel de inserție să fie favorizată termodinamic. Metodele anterioare de

preparare a embrionilor, precum și alte metode practicate în domeniu, sunt avute în vedere în scopul invenției de față.

5 În procesul FIV tradițional, embrionii sunt transferați în cavitatea uterină la două zile după fecundare, atunci când fiecare embrion este la stadiul patru celular sau la trei zile după
10 fecundare, când embrionul este la stadiul opt celular. Este recunoscut faptul că este de dorit să se utilizeze embrioni în stadiul de blastocist, când a ajuns la cinci - șapte zile de cultură. Metoda FIV, conform invenției prezente, permite transferul de embrioni în orice moment de-a lungul spectrului dezvoltare a embrionului/blastocistului. Prin observarea vizuală, cum ar fi prin cu utilizarea microscopului, blastocistele sau embrionii sunt considerați a fi gata de a fi transferați la uter atunci când cavitatea blastocelică este evidentă vizibil și cuprinde mai mult de 50% din volumul embrionului. Într-un mediu *in vivo*, această etapă ar fi atinsă, în general, la patru până la cinci zile după fecundare, la scurt timp după ce embrionul a traversat tubul falopian și ajunge în uter.

15 Conform celui de al doilea aspect al invenției, s-a descoperit de către inventatorii de față că introducerea unei compoziții conținând celule mononucleare din sânge periferic (PBMCs) în uterul unei paciente înaintea transferului de embrioni în timpul tratamentului FIV crește în mod clar probabilitatea de succes a implantării embrionilor în endometrul uterului, conducând astfel la sarcină viabilă. Fără intenția de a fi legat de teoria științifică, se crede că PBMCs promovează sănătatea și viabilitatea endometrului unei femei și a embrionului transferat.

20 PBMCs sunt celule progenitoare multipotente, care au potențialul de a genera celule de multiple forme, dar un număr limitat de linii. La sfârșitul unor lungi serii de diviziuni celulare care formează embrionul sunt celule care sunt diferențiate terminal, sau care sunt considerate a fi dedicate permanent unei anumite funcție. Experimente cu celule stem au fost capabile de a determina celule stem din sânge să se comporte precum neuronii, sau precum celulele creierului - un proces cunoscut sub numele de transdiferențiere. Utilizarea de celule stem pluripotente de la fetuși, cordoane ombilicale sau țesuturi embrionare derivate din ovule fecundate *in vitro* ridică probleme etice și juridice în cazul materialelor umane, prezintă un risc de transmitere a infecțiilor și/sau pot fi ineficiente, deoarece acestea pot fi respinse de către sistemul imunitar al unui primitor. Se poate argumenta că utilizarea de PBMCs ridică probleme mai puțin etice și legale, deoarece PBMCs sunt celulele care sunt obținute din sânge și nu constituie celule stem, fiind însă capabile de a se diferenția.

25 Așa cum este utilizată aici, o celulă mononucleară din sânge periferic (PBMC) este o celulă multipotentă, care este extrasă, recoltată, derivată, izolată sau altfel obținută din sangele unui subiect. O PBMC este o celulă de sânge și care are un nucleu rotund. Clasa PBMC include, dar nu se limitează la, limfocite, monocite a și macrofage. Aceste celule sanguine sunt o componentă importantă în sistemul imunitar al organismelor utilizate în combaterea infecțiilor și în operarea altor funcții care implică sistemul imunitar. Populația de limfocite este formată din celule T (CD4 și CD8 pozitive ~ 75%), celule B și celule NK (~ 30 25% combinate). Populația PBMC include și celule bazofile și dendritice.

35 PBMCs pot fi izolate din sânge periferic uman prin metode obișnuite cunoscute în domeniu. Celulele pot fi extrase din sange integral utilizand FICOLL® (GE Healthcare Bio-Sciences AB LLC din Suedia), o polizaharidă hidrofیلă care separă straturile de sânge, care va separa sangele într-un strat superior de plasmă, urmat de un strat de PBMCs și o fracțiune bazală de leucocite, eritrocite și celule polimorfonucleare (precum neutrofile, eozinofile). Celulele polimorfonucleare pot fi apoi izolate prin lizarea celulelor roșii din sange. Ficoll® este parte a Ficoll-Paque® (GE Healthcare Bio-Sciences AB SRL din Suedia). Ficoll-Paque® este, în mod normal, plasat în partea de jos a unui tub conic și sângele este apoi stratificat lent deasupra Ficoll-Paque®. După ce a fost centrifugat, mai multe straturi vor fi vizibile în tubul
40 conic, de sus în jos: plasmă și alte componente, stratul de celule mononucleare conținând PBMCs, Ficoll-Paque® și eritrocitele și granulocitele care sunt prezente în formă de pelete. Această separare permite recoltarea facilă de PBMCs. Poate interveni captarea unora dintre celule roșii din sânge (prezența eritrocitelor și granulocitelor) în stratul PBMC sau Ficoll-Paque®. Poate apărea uneori coagularea majoră a sângelui în stratul PBMC.
45 Etilendiamintetraacetat (EDTA)) și heparina sunt utilizate în mod obișnuit în combinație cu Ficoll-Paque® pentru a preveni coagularea. Deoarece stratificarea Ficoll-Paque® este un proces foarte lent, au fost dezvoltate dispozitive care ajută la dispunere, care constituie etapa consumatoare de cel mai mult timp. Un astfel de produs este SepMate™ -50 (StemCell Technology Inc din Canada), un tub specializat care conține o inserție poroasă, care formează

o barieră fizică între Ficoll-Paque® și proba de sânge. Acest lucru permite ca proba de sânge să fie picurată rapid pe inserție, evitând necesitatea suprapunerii direct pe Ficoll-Paque®. Inserția SepMate™ reduce, de asemenea, durata etapei de centrifugare și, după centrifugare, stratul superior conținând plasmă și PBMCs poate fi turnat într-un recipient separat. Alte dispozitive includ o coloană care conține o barieră cu mare densitate poroasă polietilenică sau "frită." Aceste produse permit sângelui să fie întins mult mai rapid, fără amestecare de polizaharidă și sânge. Un exemplu de un astfel de produs este "System Accuspin Histopaque-1077" comercializat de Sigma Aldrich. De asemenea, este posibil ca sistemul de separare Ficoll-Paque® să fie inclus într-un tub vacutainer de colectare a sângelui. Astfel de vacutainere sporesc confortul și siguranța de colectare a produselor din sânge, dar sunt mult mai costisitoare decât vacutainerul de bază. Un alt astfel de produs, Floaties™, a fost demonstrat a dispune în mod eficient sângele sau o suspensie celulară pe Ficoll® folosind un amestec special de granule polimerice sau pelete. Acest produs este ieftin, reduce dependența cercetătorului de tehnică și, de fapt, accelerează procesul de suprapunere. Oricare dintre tehnicile de mai sus, inclusiv alte tehnici, care sunt sau vor deveni practicate în domeniul colectării, izolării, extragerii, recoltării, separării, eliminării, sau în orice alt mod destinate a obține PBMCs din sângele unui organism, uman sau animal, sunt avute în vedere în domeniul de aplicare al variantelor de realizare ale invenției de față.

Intr-unul din aspectele invenției prezentate aici, este un procedeu de cultivare a celulelor PBMCs. Metoda cuprinde cultivarea celulelor pe plăci acoperite cu fibronectină într-o atmosferă umedă care conține de la 4,8% la 6,0% dioxid de carbon (CO₂), la o temperatură în intervalul de la 36,7°C la 37,3°C, la o densitate de la 104 la 107/mL. Intr-o variantă de realizare preferată a metodei, PBMCs sunt cultivate pentru o perioadă de timp aflată în intervalul de la 46 de ore la 72 de ore. În varianta cea mai preferată, PBMCs sunt cultivate pe plăci acoperite cu fibronectină într-o atmosferă de 5,0% CO₂ la o temperatură de 37,1°C, timp de 48 de ore.

Mediul de cultură utilizat aici pentru propagarea de PBMCs extrase este un mediu Roswell Park Memorial Institute, cunoscut sub numele de mediu RPMI, disponibil din diferite surse. Mediul RPMI este adesea folosit pentru celule și țesuturi de cultură. Mediul RPMI 1640 a fost în mod tradițional folosit pentru creșterea celulelor limfoide umane fără ser, celule de măduvă osoasă și celule de tip hibridoma. Mediul RPMI 1640 utilizează un sistem de tamponare pe bază de bicarbonat și diferă de majoritatea mediilor de cultură de celule de mamifer în formularea sa pH 8. Mediul preferat în conformitate cu metodele din invenție utilizează un mediu de cultură RPMI 1640 conținând L-glutamină și bicarbonat de sodiu.

Conform unui alt aspect al invenției, albumina umană recombinantă (HRA) se adaugă la mediul de cultură. HRA este binecunoscută ca fiind o proteină purtătoare prezentă în concentrații mari în plasmă, cu un timp circulator de înjumătățire de aproximativ 19 zile. Aceasta operează în transporturile de acizi grași la nivelul țesuturilor, stabilizarea proteinelor, legarea ionilor metalici la suprafețe și are un efect antioxidant în plasmă. HRA este disponibilă pe scară largă de la un număr de furnizori, de exemplu de la Novozymes, Inc sau Sigma-Aldrich, LLC. Adăugarea HRA în timpul metodei invenției la mediul de cultură acționează ca un supliment alimentar care îmbunătățește creșterea PBMCs.

Intr-un alt aspect al invenției, gonadotropina corionică umană (hCG) se adaugă la mediul de cultură RPMI 1640. Gonadotropina corionică umană (hCG) este eliberată în organism, în circulația maternală în timpul sarcinii prin sincițiotrofoblaste placentare. Aceasta s-a dovedit a fi un hormon imuno-modulator și s-a raportat că administrarea de hCG crește succesul sarcinii și antiserul hCG inhibă implantarea fetală. hCG interacționează cu anumiți receptori (receptorii LHCG) și promovează menținerea corpului luteinic în timpul începutului sarcinii, făcându-l să secrete hormonul progesteron. Progesteronul îmbogățește uterul cu o căptușeală groasă a vaselor de sânge și a capilarelor, astfel încât să poată susține dezvoltarea embrionului și fătului. Datorită încărcăturii sale înalt negative, hCG poate respinge celulele imune ale mamei, protejând fătul în timpul primului trimestru. De asemenea, s-a emis ipoteza că hCG ar putea constitui o legătură placentară pentru dezvoltarea imunotoleranței materne locale. De exemplu, celulele endometriale tratate cu hCG induc o creștere în apoptoza celulei T (dizolvarea de celule T). Aceste rezultate sugerează că hCG ar putea fi o verigă în dezvoltarea toleranței imune peritrofoblastice, și poate facilita invazia trofoblastică, care este cunoscută a accelera dezvoltarea fetală în endometru (Kayisli și colab., 2003). S-a sugerat, de asemenea, că nivelurile de hCG sunt legate de severitatea stării de rău matinal la femeile

gravide. Concentrația minimă de hCG a mediului de cultură al invenției nu este mai mică de 5 UI/mL. În scopul clarității, s-a constatat aici că prezența hCG în mediul de cultură preparat conform metodei invenției funcționează ca un agent promotor care îmbunătățește capacitatea PBMCs de a stimula creșterea țesutului, în mod special creșterea endometriului în timpul procesului FIV al invenției. PBMCs cultivate și/sau compoziția de cultură proaspătă și combinată de PBMC are capacitatea de a modifica dimensiunea și receptivitatea țesutului endometrial al pacientei, atunci când este tratat cu compoziția PBMC a invenției. Acest lucru duce la o creștere a dimensiunii, în mod special o creștere a grosimii endometriului, precum și la o capacitate sporită a endometriului de a fixa embrionul după implantare.

Metoda de fertilizare *in vitro* a invenției furnizează utilizarea de PBMCs obținute prin tehnica de cultivare de mai sus, în scopul de a îmbunătăți instalarea sarcinii. După obținerea de ovocite de la un pacient de sex feminin, o cantitate de PBMCs este extrasă din sângele pacientei. Această cantitate de PBMCs este apoi cultivată într-un mediu de cultură adecvat, în conformitate cu metoda dezvoltată mai sus, pentru a obține o cantitate și calitate dorită a PBMCs. După o perioadă de timp de așteptare sau întârziere predeterminată discutată aici, o cantitate suplimentară de sânge este obținută de la pacient și o nouă cantitate de PBMCs este extrasă din sânge. Alternativ, lotul de sânge obținut la început de la pacientă poate fi împărțit în diferite fracțiuni conținând PBMCs, dintre care una sau unele sunt cultivate, și una sau unele sunt menținute în stare proaspătă. Cantitatea proaspătă este preferabil obținută în ultima zi a perioadei de timp de așteptare predeterminată. Unele PBMCs proaspete sau toate sunt apoi combinate cu o parte sau cu întreaga cantitate de cultură de PBMCs, pentru a obține o compoziție care conține atât PBMCs proaspete, cât și cultivate. Concentrația de PBMCs într-o compoziție preferată a PBMC conform invenției se află în intervalul de la 4 la 5 milioane de celule pe fiecare mililitru de compoziție; totuși concentrații de până la 8 milioane de celule/mL de compoziție sunt operabile în domeniul de aplicare al invenției. Compoziția poate fi amestecată sau mixată în continuare sau prelucrată prin orice metodă dezirabilă, astfel încât să combine PBMCs fără a deteriora celulele. Această compoziție de PBMCs este apoi introdusă, în mod obișnuit, prin injecție prin cateter în cavitatea uterină a pacientei. Conform invenției, între 20 și 72 de ore mai târziu, cel mai preferabil în 24 de ore, unul sau mai mulți embrioni sunt transferați în uter, pentru implantare, în scopul de a se efectua sarcina. Cercetătorii de față au demonstrat că această tehnică permite corpului să utilizeze PBMCs ca subansambluri, pentru a crește grosimea stratului de endometru la nivelul uterului și, prin aceasta, să reducă riscul de eșec al instalării sarcinii.

Este important ca PBMCs să fie extrase chiar de la pacient în cursul tratamentului FIV al invenției. Cu toate acestea, se prevede în sfera de aplicare a invenției, că cantitatea de cultură de PBMCs poate fi obținută de la un individ, altul decât pacienta care este supusă transferului de embrioni *in vitro*. În acest caz, cantitatea proaspătă de PBMCs se obține, preferabil, de la pacienta supusă transferului de embrioni, pentru a pregăti răspunsul autoimun al pacientei.

Diagnosticile de preimplantare, atât pentru embrioni, cât și pentru sistemul reproductiv al pacientei, constituie un alt aspect al prezentei invenții. În ceea ce privește diagnosticul pacientei, examinarea grosimii endometriului, care poate fi măsurată în mod tipic prin ultrasunete, este preferabil să fie situată în intervalul de la 9 mm la 11 mm, în momentul transferului de embrioni.

De asemenea, în mod obișnuit sunt efectuate diagnostice post-implantare. Testarea pentru a determina dacă unul sau mai mulți embrioni au fost implantați în endometru, adică, dacă procedura a condus la instalarea unei sarcini viabile, este realizată la două săptămâni după transfer, folosind, de exemplu, teste de sânge pe b-hCG (gonadotropina corionică umană) și alte tehnici cunoscute în domeniu. hCG este esențial în diagnosticul de sarcină și în condițiile legate de sarcină, cum ar fi sarcina ectopică, avort spontan, trisomia 21, sarcină molară și coriocarcinom. Apariția "sarcinii biochimice", se petrece atunci când o sarcină este diagnosticată prin detectarea de hCG în ser sau urină, care nu se dezvoltă într-o sarcină clinică. Sursa US 4315908 A 1982.02.16, Zer și colab. stabilește o metodă pentru detectarea hCG în urină prin radioimunoanaliză. Brevetul US 8163508 B2 2012.04.24, O'Connor și colab. furnizează o metodă și un kit pentru estimarea sarcinii la un subiect prin metoda hCG, determinând cantitatea de izoform de hCG asociat sarcinii premature dintr-o probă. Aceste metode de diagnostic, precum și altele, sunt utile în domeniul de aplicare al invenției.

Medicii depun eforturi pentru a identifica acei embrioni pentru transfer care sunt cei mai potriviți pentru a obține o sarcină viabilă. În anumite variante de realizare, prezenta invenție prevede testarea morfologică, genetică și cinetică a ovulelor, blastocistelor sau embrionilor

prelevați de la pacientă și preparați *in vitro*. Metodele de diagnostic includ analiza microscopică fizică a embrionului, pentru a identifica acei embrioni care par să se dezvolte normal, prin observarea caracteristicilor morfologice ale embrionului și testarea genetică a embrionului. "Diagnosticul genetic de preimplantare" constată dacă embrionul conține modificări sau anomalii genetice, structurale, și/sau cromozomiale, prin analiza corpurilor polare, blastomerilor sau trofocitului. "Screening-ul genetic de preimplantare" implică analiza corpurilor polare, blastomerilor sau trofocitului embrionilor pentru detectarea aneuploidiei, mutației și/sau rearanjării ADN. Cel puțin trei tehnici de incubare de bază și de biopsie asistată sunt cunoscute în domeniu pentru diagnosticarea embrionilor. Aceste tehnici includ crearea mecanică a unei incizii în zona pelucidă a embrionului cu ajutorul unui cuțit microchirurgical specializat sau a unui ac de sticlă; digerând chimic o porțiune din zona pelucidă cu acid, cum ar fi soluție Tyrode; sau îndepărtarea zonei pelucide folosind un laser pentru a ajuta la separarea blastocistului.

Intr-o variantă de realizare preferată, prin observare vizuală a embrionului cu ajutorul microscopiei (de exemplu, microscop Nikon Eclipse TE 2000-S), embrionul va prezenta anumite caracteristici fizice sau morfologice determinate simultan, înainte de a fi implantat în uter. Starea maturității blastocistului va fi determinată ca fiind în intervalul II AB - VI AA, conform clasificării (Gardner și colab, 1994), încorporată aici prin referire, prin care sunt clasificate masa intracelulară și grosimea stratului trofocit. Nivelul VI AB reprezintă maturizarea blastocistului la cel mai înalt nivel, corespunzând unui blastocist format care incubează din zona pelucidă.

Diagnosticul genetic al embrionului poate fi realizat prin orice tehnici cunoscute în domeniu, cum ar fi tehnica tradițională matricială CGH pentru cromozomul artificial bacterian (BAC), și altele asemenea. Tehnicile micromatriceale, de asemenea denumite microchip, biochip, au devenit utilizate pe scară largă pentru exprimarea genelor și alte cercetări genomice și oferă avantaje tehnice pentru BAC. Micromatricea este în general executată prin imprimare sau sinteză de acid nucleic, care este complementar cu secvențele cunoscute într-un genom pe o suprafață. Întregul genom al unui organism sau părți ale acestuia pot fi evaluate prin hibridizare amplificată și marcarea fluorescentă a AND-ului (acid dezoxiribonucleic) la matrice. Sursa US 2012/587406, inclus aici prin referință în totalitatea sa, dezvăluie metode de fertilizare *in vitro*, în care diagnosticul genetic de preimplantare al tuturor celor 24 de cromozomi din embrionul FIV este realizat prin amplificarea întregului genom și prin analize micromatriceale de polimorfisme. Metoda presupune biopsierea embrionului FIV pentru a îndepărta una sau mai multe celule și extragerea acidului nucleic din celule. Efectuarea amplificării genomului permite apoi colectarea de informații genetice ale embrionului în scopul de a anticipa normalitatea genetică a embrionului, pe baza informațiilor genetice obținute. Această tehnică face posibilă, de asemenea, determinarea cariotipului embrionului. După ce embrionii sunt analizați, ei sunt clasificați în funcție de potențialul de implantare în uter. În variante de realizare în care embrionii sunt analizați din punct de vedere genetic, unul sau mai mulți embrioni potriviți pentru implantare în uter sunt selectați pe baza predicțiilor genetice.

Diagnoza cinetică a embrionului este o altă procedură importantă, disponibilă în vederea selectării embrionilor cei mai potriviți, cei mai sănătoși, pentru transferul embrionilor. Un instrument disponibil este sistemul de monitorizare al embrionului Primo Vision cu filmare spațială (Vitrolife AB, Göteborg, Suedia). Primo Vision este un și sistem computerizat și de fotografiere, care este conceput să capteze imaginile embrionilor, utilizat în ciclurile de fertilizare *in vitro*, pe măsură ce aceștia cresc în incubator. Imaginile embrionului care se dezvoltă într-un vas de cultura, captate de aparatul de fotografiat, sunt afișate pe un ecran de computer în laborator. Sistemul computerizat furnizează nu numai imaginile embrionilor, dar și informații despre tiparul lor de creștere. Aceste informații permit embriologilor și clinicienilor să observe dezvoltarea sănătoasă a embrionilor și să detecteze orice probleme în momentul diviziunii celulare care ar putea apărea în timpul primelor etape de creștere. Avantajul suplimentar al Primo Vision este acela că permite ca aceste observații să fie făcute fără îndepărtarea embrionilor din incubatorul lor. Acest lucru permite embrionilor să rămână într-un mediu controlat, în care tind să crească mai repede. Conform invenției, embrionii cei mai dezirabili a fi selectați pentru transferul de embrioni ar trebui să afișeze următoarele criterii cinetice: un factor de timp de 5...12 ore pentru divizare din etapa de 2 celule în etapa de 3 celule; ar trebui să aibă 3 celule la 35...40 de ore după stadiul de zigot; 5 celule la 48...56 de ore după etapa de zigot; 8 celule la începutul celei de a treia zi de dezvoltare.

Toate celulele ar trebui să aibă, preferabil, aceeași dimensiune, sau cât mai apropiată posibil, iar nivelul de fragmentare ar trebui să nu fie mai mare de 5...10 %.

5 Conform prezentei invenții, ovocitele obținute de la pacient sau ovocitele fecundate care s-au dezvoltat până la stadiul de embrion gata de transfer sunt păstrate pe parcursul perioadei de timp până când sistemul imunitar al pacientului este suficient de pregătit să accepte embrionul pentru gestație, pentru perioada de timp necesară pentru a suprima răspunsul autoimun al pacientului. Cei mai mulți pacienți doresc să conceapă propriii descendenți, dacă este posibil și, prin urmare, doresc să utilizeze propriile ovocite sau embrioni. Prin urmare, în cele mai multe situații, trebuie să fie prezervați ovocitele sau embrionii pacientului.

10 Intr-o anumită categorie de femei care prezintă infertilitate, femeia nu este aptă să producă ovule sau să ovuleze, sau întâmpină anovulație sau oligoovulație, astfel încât ovocitul (ovocitele) donator (donatoare) sau embrionul (embrionii) donator (donatori), care sunt obținuți de la un alt individ de sex feminin, sunt furnizați pentru procedura *in vitro*. Prin urmare, este de așteptat în domeniul de aplicare al anumitor variante de realizare ale invenției

15 faptul că pacientul va fi înșeninat cu embrionii care nu au fost obținuți de la pacienta însăși, ci sunt obținuți de la un individ diferit, prin urmare, un ovocit donator sau un embrion donator este transferat pacientei pentru instalarea sarcinii.

De asemenea, în cadrul scopului invenției se află variante de realizare în care ovulele sau embrionul de la o specie sunt transferate la o specie diferită de cea de la care oul sau embrionul sunt obținuți. De exemplu, un embrion de la un măgar poate fi implantat în uterul unui cal.

20

Totuși, cazul cel mai frecvent întâlnit rămâne în continuare acela în care se cere conservarea ovocitelor sau embrionilor (de obicei obținute din cele ale pacientului, dar, posibil, și din altă sursă). Conservarea poate fi asigurată prin supunerea ovocitului sau embrionului la condiții de temperatură scăzută, cum ar fi răcire lentă, congelare rapidă și vitrificare. Spre deosebire de spermă, care a fost înghețată cu succes și utilizată pe parcursul anilor, ovulele conțin o mare cantitate de apă, ceea ce face mai dificilă congelarea. Atunci când ovulele sunt înghețate, se pot forma cristale de gheață în interiorul ovulului. Aceste cristale de gheață pot distruge structura celulei. Pentru a ajuta la diminuarea cantității de cristale de gheață, oamenii de știință au eliminat o parte din apă pe măsură ce ovulul a fost înghețat lent. Sursa US 2010/777149 descrie o metodă care cuprinde centrifugarea ovocitelor sau embrionilor (de exemplu de la câini, pisici, porci, efective de animale, șoareci, șobolani și maimuțe), pentru a polariza lipidele citoplasmice în afara ovocitului sau celulelor embrionare, supunând ovocitele sau embrionii la condiții de temperatură scăzută în prezența unui crioprotector care duce la înghețarea ovocitelor sau embrionilor înainte de depolarizarea lipidelor, urmată de depozitare la temperatură scăzută a ovocitelor sau embrionilor congelați.

25

30 Cu toate acestea, până acum s-a dovedit a fi imposibil de îndepărtat toată apa, și, astfel, formarea de cristale de gheață intra și extracelulară nu poate fi prevenită prin congelare lentă. Astfel, fertilizarea ovocitelor, viabilitatea embrionilor și instalarea sarcinii, în cazul acestor ovule congelate lent, odată dezghețate, este scăzută.

40

Congelarea rapidă a fost încercată cu utilizarea de crioprotectori. Un crioprotector este o substanță care este folosită pentru a proteja țesutul biologic de deteriorarea survenită prin formarea de gheață. Crioprotectorii operează prin creșterea concentrației substanței dizolvate în celule. Pentru a fi viabili din punct de vedere biologic, crioprotectorii trebuie să penetreze celulele cu ușurință și să nu fie toxici pentru celule. Crioprotectorii convenționali sunt glicoli, cum ar fi etilen glicol, propilenglicol și glicerol; 2-metil-2,4-pentanediol (MPD); sulfoxid de dimetil (DMSO) și sucroză. Glicerolul și DMSO au fost utilizate timp de decenii de către criobiologiști pentru a reduce formarea de gheață în sperma și embrionii care sunt conservați prin răcire în azot lichid. S-a constatat că amestecurile de crioprotectori au o toxicitate mai mică și sunt mai eficiente decât crioprotectorii utilizați ca agent unic. Un amestec de formamidă cu DMSO, propilenglicol și un coloid a fost timp de mulți ani cel mai eficient crioprotector creat în mod artificial. Mulți crioprotectori funcționează, de asemenea, prin formarea de legături de hidrogen cu molecule biologice pe măsura ce moleculele de apă sunt dislocate. Legarea hidrogenului în soluțiile apoase este importantă pentru funcționarea adecvată a proteinei și ADN-ului. Astfel, pe măsură ce crioprotectorul înlocuiește moleculele de apă, materialul biologic își păstrează structura și funcția sa fiziologică nativă, deși ele nu mai sunt scufundate într-un mediu lichid.

45

50

55

Mai recent, procesul vitrificării, un proces de înghețare și solidificare fără formare de cristale de gheață, a fost aplicat pentru a prezerva ovocitele și embrionii, țesuturile biologice

și organele pentru transplant și în crionizare. Unii crioprotectori operează prin scăderea temperaturii de tranziție vitroasă a unei soluții sau a unui material. În acest fel, crioprotectorul previne congelarea reală, iar soluția își menține o anumită flexibilitate în fază sticloasă. Deși congelarea lentă și rapidă sunt operabile, vitrificarea este metoda preferată de
5 prezervare a ovocitelor sau embrionilor, în conformitate cu metoda invenției. În timpul vitrificării, ovocitul sau embrionul este înghețat suficient de rapid astfel încât cristalele de gheață să nu aibă timp să se formeze. Orice tehnică de vitrificare cunoscută poate fi utilizată în cadrul metodei invenției pentru conservare și depozitare. De obicei, ovocitul sau embrionul este inițial introdus într-o baie cu o concentrație mai mică de antigel, împreună cu sucroză,
10 pentru a elimina apa din ovocit sau embrion. Ovocitul este apoi introdus într-o baie cu concentrație mare de antigel pentru mai puțin de un minut, timp în care îngheață instantaneu. Un exemplu al procesului vitrificării operabil în cadrul procesului invenției, implică plasarea embrionilor menținuți în mediu MEDICULT®, la o temperatură de 37°C, iar apoi plasarea embrionilor în mediu la 22...24°C, care este ulterior plasat într-un recipient special pentru crionizare sau purtător de tip crioleaf în azot lichid.

Conform metodei FIV a invenției, pacienta este gata să continue transferul de embrioni atunci când este stabilit faptul că sistemul autoimun al pacientei și-a recăpătat echilibrul hormonal. La acel moment, crioprezervarea ovulelor sau embrionilor obținuți prin FIV este încheiată. Ovocitul (ovocitele) sau embrionul (embrionii) se îndepărtează din soluția antigel și sunt decongealați. Odată decongelat, un ovul nefecundat poate fi fecundat prin oricare dintre
20 tehnicile descrise mai sus printr-o tehnologie de reproducere asistată care injectează un spermatozoid direct într-un ovul. Embrionul este decongelat prin extragerea acestuia din soluția de azot lichid, plasarea într-o soluție cu o temperatură de aproximativ 37°C, spălarea la temperatura camerei, plasarea din nou într-o soluție de 37°C, plasarea într-un mediu de cultură, apoi plasarea într-un incubator menținut la o temperatură similară cu temperatura internă a cavității uterine feminine, 36,8...37,2°C, pentru o perioadă de la 5 la 24 de ore, cel mai preferabil la o temperatură de 37,1°C, timp de 5 până la 7 ore.

În etapa finală a procedurii conform invenției este procedura prin care unul sau mai mulți embrioni sunt introduși în corpul pacientei într-o încercare de a produce sarcina.
30 Această procedură este numită "transfer de embrioni" și implică transferul embrionului în uter, cavitate uterină sau tuburi falopiene. Transferul embrionilor implică de obicei plasarea embrionilor selectați prin colul uterin în cavitatea uterină a pacientei cu ajutorul unui cateter mic, maleabil și ghidat de o sondă cu ultrasunete. După cum s-a menționat anterior, în conformitate cu metoda conform invenției, de preferință cu cel puțin 24 de ore înainte de transferul de embrioni, endometrul uterului pacientei este pregătit prin injectarea unei compoziții de PBMCs în cavitatea uterină, folosind un cateter adecvat pentru livrare. Embrionul este de obicei menținut într-un mediu de transfer de embrioni, de exemplu, mediu UTM Medicult®, și poate conține HAS, insulină umană recombinantă, gentamicină.

Este un alt aspect suplimentar al prezentei invenții faptul că instalarea sarcinii este mai departe promovată prin introducerea de antigene de histocompatibilitate, cum ar fi antigenul leucocitar uman solubil G (sHLA-G) în sistem, care funcționează ca "comunicatori-prieteni sau dușmani", pentru a permite recunoașterea pozitivă și acceptarea embrionului de către sistemul imunitar al femeii. HLA-G, precursorul formei sale solubile, sHLA-G, a fost detectat de către cercetători în preimplantarea embrionilor și în mediile de cultură înconjurătoare
45 obținute în timpul studiilor FIV. Aceste constatări au sugerat că sHLA-G este implicat încă de la primele etape ale sarcinii. De asemenea, este sugerat potențialul sHLA-G de a opera ca indicator al calității embrionilor (Menicucci și colab., 1999). Un studiu sugerează că nivelurile sHLA-G la supernatanți în preimplantarea embrionilor pot fi cuantificate și sugerează rezultate pozitive cu probabilitatea de sarcină, acționând ca un indicator util al calității embrionului, care poate fi utilizat în asociere cu testarea morfologică în cadrul criteriilor de selecție a embrionului, pentru a crește probabilitatea de implantare de succes. Într-o variantă de realizare, s-HLA-G este adăugat la mediul de transfer embrionar, cu o măsurare a concentrației preferate în mediul de transfer embrionar situată în intervalul de densitate optică (OD) de la 0,175 la 0,350, unde OD înseamnă densitatea optică măsurată la o lungime de undă în intervalul de la 400 la 450 nm, mai precis, la o lungime de undă de 405 nm. Procedura de determinare a concentrației de sHLA prin măsurarea densității optice este descrisă pe larg într-un număr de publicații (de exemplu, S. Marti și colab., 2007). s-HLA-G este adăugat la mediul de transfer embrionar, iar embrionul este apoi cultivat în mediul

respectiv, timp de 5 până la 20 min și mai preferabil timp de aproximativ 10 min, imediat înainte de transferul embrionului în uter.

Un aspect înrudit al invenției furnizează o metodă de creștere, reparare, inginerizare, restaurare, sau altă modalitate de tratare a unui țesut țintă al unui pacient prin creșterea țesutului țintă în prezența compoziției PBMC, conform procedurii stabilit în această dezvoltare. țesutul este crescut prin introducerea țesutului în prezența PBMCs cultivate, sau prin cultivare utilizând compoziție PBMC combinată din PBMCs cultivate și proaspete. Ambele procese, atât procesul *in vivo*, cât și cel *in vitro* sunt avute în vedere. O variantă de realizare a unei asemenea metode este aceea că țesutul țintă este endometrul uterului unei paciente. Cu toate acestea, așa cum este dezvoltat în sursele US 7795018 B2 2010.09.14 și US 8216838 B2 2012.07.10, Kuwana și colab., PBMCs sunt recunoscute ca fiind celule multipotente care sunt foarte potrivite pentru transplant de celule în vederea regenerării organelor, inclusiv oase, cartilajii, mușchi scheletic, țesut adipos, mușchi cardiac, vascular, endotelial și neuronal. Prin urmare, procedeul, mediul de cultură și compoziția conform invenției cuprinzând o combinație de PBMCs, atât de cultură, cât și proaspete din prezența invenției pot fi extinse mult dincolo de limitele tratamentului FIV și tratarea endometrului, la aplicațiile care implică creșterea, repararea și inginerizarea altor țesuturi, care sunt apte de a fi tratate prin PBMCs.

Este de remarcat aici că conceptul și aplicarea acestei invenții are relevanța cea mai mare pentru om, dar este aplicabilă implantării embrionului la o mare varietate de animale. Această invenție nu este limitată la fertilizarea *in vitro* umană sau implantarea embrionului folosind sistemul de întârziere autoimună cu utilizarea compozițiilor PBMC. De exemplu, tehnica poate fi utilizată pe animale, cum ar fi animalele murine, inclusiv șobolanul cenușiu și șoarecele de casă; cu animalele de companie, inclusiv câini și pisici; și cu efectivul de animale domestice, cum ar fi porci, cai, măgari, capre, oi, lame și alpaca, printre altele, în scopul de a crește rata natalității la astfel de animale. Aceste creșteri vor avea implicații financiare semnificative în industria efectivelor de animale și implicații sociale în domeniile cercetării și dezvoltării științifice și medicale.

Deși invenția este în general definită ca mai sus, specialiștii în domeniu vor aprecia că aceasta nu se limitează la aceasta și include variante de realizare din care exemplele următoare furnizează o descriere suplimentară. Este de înțeles că alte modificări funcționale specifice pot fi efectuate în scopul de aplicare în domeniu, fără a ne îndepărta de scopul prezentei invenții. Avantajele invenției sunt demonstrate de către exemplele de mai jos, care sunt expuse pentru a ilustra metodele și compoziția invenției și sunt menite a fi pur exemplificative în ceea ce privește principiile și aplicările invenției și nu trebuie văzute ca o limitare în ceea ce privește domeniul acesteia.

Exemplele de mai jos ilustrează prezenta invenție. A fost efectuat un studiu pentru a examina și compara cele două proceduri FIV. Prima procedură a fost denumită metoda "FIV cu embrion proaspăt" și a doua procedură a fost denumită metoda "FIV cu embrion crioprezervat". Comparația statistică a rezultatelor clinice a fost realizată pentru a examina efectul în ratele de sarcină la femeile care prezintă infertilitate sau întârziere în implantarea embrionului sau a blastocistului în cavitatea uterină a femeii după extragerea ovocitului. Termenii "rata sarcinii", "rata clinică a sarcinii" și "rata de implantare" sunt utilizați aici interschimbabil și se referă la numărul de sarcini clinice exprimate per 100 de cicluri de transfer de embrion. În continuare a fost investigat efectul administrării celulelor mononucleare din sângele periferic intrauterin (PBMC) asupra ratelor de sarcină, pentru ambele proceduri, atât pentru "FIV cu embrion proaspăt", cât și pentru "FIV cu embrion crioprezervat".

Subiecți: au fost examinate în total o sută optzeci (180) de femei prezentând infertilitate. Anterior prezentului studiu, fiecare pacientă fusese supusă în prealabil la două sau mai multe tratamente "FIV cu embrion proaspăt" eșuate și cel puțin un "FIV cu embrion crioprezervat" eșuat, înainte de participarea la prezentul studiu. Femeile au fost împărțite în 2 grupe a câte 90 de femei per grup. Varsta medie a femeilor din grupul 1 a fost de $35,5 \pm 3,4$ ani. Varsta medie a pacientelor din grupul 2 a fost de $36,5 \pm 5,5$ ani. Subiecții au fost pregătiți după cum urmează.

Procedura FIV: s-a aplicat protocolul standard FIV folosind un a-GnRH (hormonul de eliberare a gonadotropinei) pentru stimularea ovariană controlată a pacientelor din ambele grupuri. Perioada de stimulare a ovarului pentru fiecare pacientă a fost între 10 și 12 zile. Mărimea medie a foliculilor a fost măsurată ca fiind de aproximativ 18 mm la momentul

puncției transvaginale. Au fost aplicate pacientelor din ambele grupuri Gonal, Menopur, Choragon, pentru menținerea fazei luteale. În general, 10 până la 12 ovule au fost extrase de la fiecare pacientă. Nu mai puțin de 80% din ovocitele obținute au fost suficient de mature pentru a fi fecundate (etapă de maturizare MII, conform determinării prin clasificarea Gardner).

După extragerea ovocitelor, ele au fost cultivate în mediu FIV Universal (MEDICULT® disponibil de la Origio A/S Corporation, Danemarca) având concentrația de CO₂ în intervalul 5,5...5,7%, la o temperatură de 36,8...37,1°C. Ovocitele au fost apoi fecundate atât prin ICSI, cât și prin procedura standard FIV. Tehnica a fost aleasă luând în considerare indicatori referitori la spermă, vârsta pacientei, experiența încercărilor FIV anterioare cu rezultat negativ. În cazul procedurii FIV standard, spermatozoizii au fost adăugați ovocitelor în mediu UniFIV. Zigoții dezvoltăți în ziua următoare au fost plasați într-un mediu ISM-1. În cazurile în care ovocitele au fost obținute prin puncție transvaginală, acestea au fost plasate în mediu UniFIV. După fertilizarea prin procedura ICSI, ovulele au fost imediat plasate în ISM-1. Embrionii au fost cultivați în mediu FIV MEDICULT® Universal pe parcursul primelor trei zile pentru dezvoltarea embrionului de clivare și în mediu MEDICULT® BlastAssist pe parcursul zilei a patra și a cincea de cultură, până la formarea blastocistului. Transferul de embrion a fost efectuat utilizând mediu UTM MEDICULT®.

Vitrificare: vitrificarea a fost aplicată blastocistelor sau embrionilor în ziua a 5-a de dezvoltare, utilizând metoda standard MEDICULT®. Embrionii au fost plasați în soluțiile specificate, pentru a îndepărta cât mai posibil din apă. Embrionii au fost plasați pe purtători de crionizare în azot lichid. Nu au fost plasați mai mult de doi embrioni pe un purtător. Embrionii congelați au fost depozitați pe durata așteptării o perioadă de trei luni până la un an.

Preparare PBMC: celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) au fost extrase de la fiecare pacientă. Prima cantitate de PBMCs a fost preluată de la pacientă în ziua primirii ovocitelor în protocoalele "FIV cu embrion proaspăt", sau cu trei zile înainte ca embrionii să fie transferați în uter în protocoalele "FIV cu embrion crioprezervat". Inițial, 10 mL de sânge periferic au fost recoltați de la fiecare pacientă. Întreaga cantitate (10 mL) din sângele periferic a fost amestecată cu 10 mL de mediu RPMI 1640 MEDICULT® cu L-glutamină și bicarbonat de sodiu, formând un volum combinat de 20 mL de sânge diluat. Un mediu de separare a limfocitelor (mediu gradient de densitate) a fost apoi folosit pentru a separa PBMCs de sânge. Un volum de 7 mL de sânge diluat a fost dispus pe 3 mL din mediul de gradient de densitate. După stratificare, centrifugarea sângelui stratificat a fost realizată la o viteză de 1500 de rotații pe minut, timp de 30...35 min pentru a genera PBMCs. PBMCs astfel obținute au fost spălate de două ori în RPMI prin centrifugare, timp de 10 min, la o viteză de 1600 rotații pe minut, la 4°C. PBMCs spălate au fost transferate în mediul de cultură. Mediul de cultură l-a constituit un amestec de mediu RPMI 1640 cu L-glutamină și bicarbonat de sodiu, cu adăugare de gonadotropină corionică umană (hCG) și albumină umană recombinantă (de la Sigma-Aldrich Co, LLC). Condițiile culturii au fost menținute la 5,0% CO₂ și 37°C. Perioada de cultură a PBMCs a fost de 48...52 de ore. După 48...52 de ore, a fost recoltată o cantitate suplimentară din cantitatea totală de sânge de la aceeași pacientă. PBMCs suplimentare au fost extrase prin aceeași metodă. Al doilea lot din PBMCs au fost combinate cu PBMCs de cultură și amestecul a fost transferat în cavitatea uterină a pacientei printr-un cateter. Procedura se realizează rapid, într-un total de 10...15 min. Volumul amestecului total de PCMBs pentru aplicarea intrauterină pentru fiecare pacientă în parte a fost în intervalul 0,2...0,3 mL.

Dezghetarea și transferul embrionului: pentru fiecare pacientă, au fost selectate câte două blastociste pentru transferul de embrioni. Decongelarea a fost realizată folosind protocolul standard MEDICULT®. Embrionii au fost îndepărtați din azotul lichid și plasați într-o soluție de 37°C, apoi spălați cu mai multe soluții la temperatura camerei, plasați din nou într-o soluție la 37°C, apoi plasați într-un mediu de cultură într-un incubator, la o temperatură de temperatură de 37,1°C, timp de 6 ore. Embrionii au fost cultivați în mediu BlastAssist MEDICULT® sau 3...4 ore după decongelare. Embrionii au fost apoi plasați într-un mediu UTM MEDICULT® timp de aproximativ 15 min. Transferul de embrioni a fost realizat cu utilizarea mediului UTM MEDICULT®, prin catetere cu control prin ultrasunete Cook® Medical.

Procedura FIV: ambele grupuri de femei au fost supuse tratamentului FIV. Procedura FIV efectuată pe grupul 1 nu a implicat utilizarea de PCMBs; în timp ce procedura FIV pentru

grupul 2 a fost efectuată cu utilizarea de PBMCs. Durata tratamentului pentru fiecare grup de femei a inclus două etape - un ciclu "FIV cu embrion proaspăt" și un ciclu "FIV cu embrion crioprezervat", așa cum este descris aici. În ziua transferului embrionar, dimensiunea endometrului a fost măsurată la 9...11 mm, în ambele grupuri de paciente. După transferul embrionar, tuturor pacientelor li s-a administrat progesteron, astfel cum se obișnuiește pe parcursul tratamentului FIV, pentru a pregăti endometrul pentru implantarea embrionului. Implantarea embrionului a fost confirmată prin teste de sânge pe b-hCG, efectuate la două săptămâni după transferul de embrioni. Sarcina clinică a fost confirmată prin examinarea cu ultrasunet la trei săptămâni după transferul de embrioni.

Ambele grupuri de femei au fost supuse unui ciclu "FIV cu embrion proaspăt", cu transferul a două blastociste. Fiecare pacientă a fost testată în ce privește apariția sarcinii. Eșecul a reieșit atunci când testarea a arătat o absență a sarcinii clinice sau biochimice. În acele cazuri în care ciclul "FIV cu embrion proaspăt" a eșuat în a avea ca rezultat o implantare cu succes a embrionului, a fost realizat un ciclu "FIV cu embrion crioprezervat", prin care în cavitatea uterină a pacientei au fost introduși embrioni congelați, după o perioadă de timp de întârziere situată între 2 și 3 cicluri menstruale după ciclul "FIV cu embrion proaspăt" negativ, care a fost măsurat la aproximativ trei luni după ziua în care au fost extrase ovocitele din ovarele pacientei.

Femeile din grupul 1 nu au primit niciun tratament cu PBMCs; femeile din grupul 2 au primit un tratament cu PBMCs, imediat după încheierea perioadei de așteptare. În timpul ciclurilor "FIV cu embrion proaspăt", PBMCs au fost administrate în uterul fiecărui subiect, în a doua zi de cultură embrionară, la 48...52 de ore de la extragerea ovulului. În timpul ciclurilor "FIV cu embrion crioprezervat", au fost administrate PBMCs în uter, cu aproximativ 24 de ore înainte de transferul de embrioni.

Rezultate: grupul pacientelor supuse tratamentului FIV cu embrion proaspăt fără PBMCs, a avut ca rezultat o rată a implantării de 22,2% (20 de sarcini clinice după 90 TE). Utilizarea de PBMCs în timpul metodei "FIV cu embrion proaspăt" a determinat o creștere a ratei implantării de până la 31,1% (28 de sarcini clinice după 90 TE). În grupul femeilor supuse încercărilor prin tratament "FIV cu embrion crioprezervat" (timpul de întârziere având o durată de cel puțin 3 luni, atât pentru grupul 1, cât și pentru grupul 2), rata de implantare fără aplicarea intrauterină de PBMCs a fost de 21,4% (15 sarcini clinice, după 70 TE), în timp ce după aplicarea de PBMCs, rata de implantare a fost de aproape două ori mai mare 41,9% (26 de sarcini clinice, după 62 TE). Rata totală de succes pentru grupul 1 (90 de paciente fără aplicare de PBMCs) a fost de 38,9% (35 de sarcini clinice). Rata totală de succes pentru grupul 2 (90 de paciente cu aplicare de PBMCs) a fost de 60,0% (54 de sarcini clinice). Rezultatele clinice ale studiului sunt prezentate în tab. 1 de mai jos. Abrevierea "TE" indică "transfer de embrioni".

Rata de implantare în ciclurile "FIV cu embrion proaspăt" și "FIV cu embrion crioprezervat", cu și fără administrare de PBMCs la pacientă.

Tabelul 1

| | Rata de sarcină clinică | |
|-------------------------------------|---|---|
| | Grupul 1 (fără PBMC) | Grupul 2 (cu PBMC) |
| FIV cu embrion proaspăt | 22,2% (20 de sarcini după 90 TE) | 31,1% (28 de sarcini după 90 TE) |
| FIV cu embrion crioprezervat | 21,4% (15 sarcini după 70 TE) | 41,9% (26 de sarcini după 62 TE) |
| Total | 38,9% (35 de sarcini pentru 90 de paciente) | 60,0% (54 de sarcini pentru 90 de paciente) |

Tab. 1 demonstrează rata crescută a sarcinii obținută, comparativ cu FIV tradițional, prin utilizarea propriilor PBMCs ale femeii, prin pregătirea uterului înainte de transferul de embrioni. Se demonstrează mai departe faptul că, combinând întârzierea sau tehnica "FIV cu embrion crioprezervat" cu pregătirea pentru concepție a uterului unei paciente prin administrarea de PBMCs proprii ale femeii în timpul procesului de fertilizare *in vitro*, produce o creștere semnificativă a ratei de sarcină la femeile infertile, în comparație cu procedurile FIV cunoscute anterior, posibil ca un rezultat sinergic atât al faptului că se permite sistemului autoimun al pacientului feminin să își recapete echilibrul hormonal, cât și

al faptului că se permite procesului de instalare să fie realizat într-o cavitate uterină având o abilitate sporită pentru implantarea embrionului.

5 Orice referire din această descriere la "o anumită variantă de realizare," "o variantă de realizare," "exemplu de variantă de realizare," etc, înseamnă că o anumită trăsătură, structură, sau caracteristică descrisă în legătură cu varianta de realizare este inclusă în cel puțin o variantă de realizare a invenției. Aparițiile unor astfel de expresii în diferite locuri din descriere nu se referă în mod neapărat, în totalitate, la aceeași variantă de realizare. Mai mult, atunci când o anumită trăsătură, structură sau caracteristică este descrisă în legătură cu orice variantă de realizare, este presupus că este de competența unui specialist în domeniu

10 efectuare acestei trăsături, structuri sau caracteristici în legătură cu alte variante de realizare. Deși variantele de realizare au fost descrise cu referire la un număr de variante de realizare ilustrative ale acestora, trebuie să se înțeleagă faptul că pot fi concepute numeroase alte modificări și variante de realizare de către specialiștii în domeniu care se afla în spiritul și domeniul de aplicare al principiilor acestei dezvăluiri. Mai specific, sunt posibile diverse variații și modificări în părțile componente și/sau aranjamente combinate ale subiectului în domeniul de aplicare al dezvăluirii, desenelor și revendicărilor anexate. În plus față de variațiile și modificările în părțile componente și/sau aranjamente, utilizări alternative vor fi de asemenea evidente pentru specialiștii în domeniu.

20

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. US 4725579 A 1988.02.16
2. US 6838235 B2 2005.01.04
3. WO 2005121322 A1 2005.12.22
4. US 8183214 B2 2012.05.22
5. US 7819796 B2 2010.10.26
6. WO 99/05255 A1 1999.02.04

(57) Revendicări:

1. Compoziție de celule mononucleare din sangele periferic (PBMCs) pentru fertilizarea *in vitro* a unei paciente, care conține:

a) o primă cantitate de celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs) al pacientei, pentru cultivarea ulterioară într-un mediu de cultură;

b) o a doua cantitate proaspătă de celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs).

2. Compoziție, conform revendicării 1, unde prima cantitate de celule mononucleare (PBMCs) este extrasă cu 2...4 zile înainte de sfârșitul perioadei de așteptare, care constituie cel puțin 2 luni sau două cicluri de ovulație, pentru scăderea riscului răspunsului autoimun sau influenței sistemului endocrin, sau funcției reproductive a pacientei.

3. Compoziție, conform revendicării 1, unde a doua cantitate de celule mononucleare (PBMCs) este extrasă în ultima zi a perioadei de așteptare, care constituie cel puțin 2 luni sau două cicluri de ovulație, pentru scăderea riscului răspunsului autoimun sau influenței sistemului endocrin, sau funcției reproductive a pacientei.

4. Compoziție, conform revendicărilor 1-3, unde concentrația de celule mononucleare (PBMCs) este în intervalul de la 4 la 8 milioane de celule într-un mililitru de compoziție menționată.

5. Compoziție, conform revendicărilor 1-4, unde prima și/sau a doua cantitate de celule mononucleare (PBMCs) conține extract de celule mononucleare (PBMCs) din sângele periferic al unei paciente.

6. Compoziție, conform revendicărilor 1-4, unde prima și/sau a doua cantitate de celule mononucleare (PBMCs) conține extract de celule mononucleare (PBMCs) din sângele periferic al unei alte paciente.

7. Metodă de preparare a compoziției de celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs) pentru fertilizarea *in vitro* a unei paciente, care include:

a) obținerea unei prime cantități de celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs) al pacientei;

b) cultivarea primei cantități de celule mononucleare menționate într-un mediu de cultură adecvat;

c) obținerea unei a doua cantități de celule mononucleare (PBMCs) din sângele pacientei;

d) amestecarea primei cantități cultivate cu a doua cantitate proaspătă de celule mononucleare (PBMCs).

8. Metodă, conform revendicării 7, unde ulterior se așteaptă cel puțin 2 luni sau două cicluri de ovulație pentru scăderea riscului răspunsului autoimun sau influenței sistemului endocrin, sau funcției reproductive a pacientei.

9. Metodă, conform revendicării 7 sau 8, unde prima cantitate de celule mononucleare din sângele pacientei se obține cu 2...4 zile înainte de sfârșitul perioadei de așteptare.

10. Metodă, conform revendicării 7 sau 8, unde a doua cantitate proaspătă de celule mononucleare din sângele pacientei se obține în ultima zi a perioadei de așteptare.

11. Metodă, conform revendicărilor 7-10, unde prima și/sau a doua cantitate de celule mononucleare (PBMCs) conține extract de celule mononucleare (PBMCs) din sângele periferic al unei paciente.

12. Metodă, conform revendicărilor 7-10, unde prima și/sau a doua cantitate de celule mononucleare (PBMCs) conține extract de celule mononucleare (PBMCs) din sângele periferic al unei alte paciente.

13. Metodă, conform revendicărilor 7-12, unde cantitatea de celule mononucleare (PBMCs) menționată se cultivă pe plăci acoperite cu fibronectină într-o atmosferă umedă, care conține 4,8...6,0% de dioxid de carbon (CO₂) la o temperatură de 36,7... 37,3°C și o densitate a celulelor de 104...107/ml.

14. Metodă, conform revendicărilor 7-13, unde cultivarea celulelor mononucleare menționate se efectuează într-un mediu de cultură adecvat care include: mediul RPMI 1640, L-glutamină, bicarbonat de sodiu, albumină umană recombinată și opțional gonadotropină corionică umană (hCG); la care concentrația minimă de hCG în mediul de cultură este de cel puțin 5 UI/ml.

15. Metodă, conform revendicărilor 7-14, unde cultivarea celulelor mononucleare (PBMCs) se efectuează timp de 46...72 ore.

16. Metodă de fertilizare *in vitro* pentru o pacientă, care include următoarele etape:

a) obținerea cel puțin a unui ovocit de la o pacientă;

b) fecundarea ovocitului de către spermatozoid, pentru formarea unui zigot și dezvoltarea zigotului *in vitro* până la stadiul embrionar;

c) crioprezervarea embrionului;

d) obținerea unei prime cantități de celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs) al pacientei;

e) cultivarea primei cantități de celule mononucleare menționate într-un mediu de cultură adecvat;

f) așteptarea pentru o perioadă de timp predeterminată, suficientă pentru a reduce riscul răspunsului autoimun al pacientei;

g) extragerea unei a doua cantități proaspete de celule mononucleare din sângele periferic (PBMCs) al pacientei în ultima zi a perioadei de așteptare;

(h) combinarea primei cantități cultivate de celule mononucleare (PBMCs) cu a doua cantitate proaspătă de celule mononucleare (PBMCs), pentru a obține o compoziție care conține celule mononucleare (PBMCs) proaspete și cultivate;

(i) introducerea compoziției de celule mononucleare (PBMCs) în uterul pacientei;

(j) decongelarea embrionului;

(k) transferarea cel puțin a unui embrion decongelat în uterul pacientei pentru a iniția sarcina.

17. Metodă, conform revendicării 16, unde embrionul este crioprezervat prin vitrificare.

18. Metodă, conform revendicării 16, unde prima cantitate de celule mononucleare (PBMCs) este extrasă cu 2...4 zile înainte de sfârșitul perioadei de așteptare, care este de cel puțin 2

luni sau două cicluri de ovulație pentru scăderea riscului răspunsului autoimun sau influenței sistemului endocrin, sau funcției reproductive a pacientei.

19. Metodă, conform revendicării 16, unde a doua cantitate de celule mononucleare (PBMCs) este extrasă în ultima zi a perioadei de așteptare, care este de cel puțin 2 luni sau două cicluri de ovulație pentru scăderea riscului răspunsului autoimun sau influenței sistemului endocrin, sau funcției reproductive a pacientei.

20. Metodă, conform revendicării 16, unde volumul de compoziție introdusă în uter în etapa (i) se află în intervalul de 0,1...0,3 ml.

21. Metodă, conform revendicării 16, unde transferul de embrioni se efectuează când embrionul are o maturitate a stării de blastocist în intervalul II AB - V AA, determinată în conformitate cu clasificarea lui Gardner.

22. Metodă, conform revendicării 16, unde embrionul este transferat în uter cu un mediu de transfer de embrioni, care conține o substanță care stimulează concepția.

23. Metodă, conform revendicării 22, unde substanța care stimulează concepția reprezintă antigenul leucocitar uman solubil din clasa G (sHLA-G), concentrația de sHLA-G în mediul de transfer al embrionilor se află în intervalul 0,175...0,350 DO, unde DO semnifică densitatea optică măsurată la o lungime de undă în intervalul de la 400...450 nm.

24. Metodă, conform revendicării 16, unde adițional se efectuează cultivarea embrionului în mediul de transfer al embrionilor menționat pentru o perioadă cuprinsă în intervalul de la 5...20 min înainte de transferul embrionului în uter.

25. Metodă, conform revendicării 16, unde pacienta este o ființă umană și introducerea embrionului în uterul pacientei se efectuează peste 20...72 de ore după introducerea compoziției de celule mononucleare (PBMCs).

26. Compoziție conform revendicărilor 1-6 sau compoziție obținută prin metoda conform revendicărilor 7-15 utilizate pentru creșterea, repararea, regenerarea sau tratarea țesutului unei paciente.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2014 0060

(32) Data de prioritate recunoscută:

2011.11.23; 2012.10.18

(22) Data depozit: 2012.11.21

Raport de documentare internațională: da

(71) Solicitant: **MEZADATA MEDICAL IP HOLDING LLP, US**

(54) **Titlul: Metodă de fertilizare *in vitro* cu întârzierea transferului embrionar și utilizarea celulelor mononucleare din sangele periferic**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *A61B 17/435* (2006.01) *A61P 13/00* (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01) *C12N 5/073* (2010.01)

A61K 35/54 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): **Int.Cl:** *A61B 17/435* (2006.01) *A61P 13/00* (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01) *C12N 5/073* (2010.01)

A61K 35/54 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)

celule mononucleare, PBMCs, fertilizare

"Worldwide" (Espacenet): Int.Cl: *A61B 17/435* (2006.01) *A61P 13/00* (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01) *C12N 5/073* (2010.01)

A61K 35/54 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)

mononuclear cells, PBMCs, fertilization

EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: *A61B 17/435* (2006.01) *A61P 13/00* (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01) *C12N 5/073* (2010.01)

A61K 35/54 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)

мононуклеарные клетки, МКПК, оплодотворение

SU (nonpublic): Int.Cl: *A61B 17/435* (2006.01) *A61P 13/00* (2006.01)

A61K 35/14 (2006.01) *C12N 5/073* (2010.01)

A61K 35/54 (2006.01) *C12N 5/078* (2010.01)

мононуклеарные клетки, МКПК, оплодотворение

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante

| Categoria* | Date de identificare ale documentelor citate si, unde este | Numărul revendicării |
|------------|--|----------------------|
|------------|--|----------------------|

| | | |
|---------|---|--------|
| | cazul, indicarea pasajelor pertinente | vizate |
| A, D | US 4725579 A 1988.02.16 | 26 |
| A, D | US 6838235 B2 2005.01.04 | 26 |
| A, D | WO 2005121322 A1 2005.12.22 | 26 |
| A, D | US 8183214 B2 2012.05.22 | 26 |
| A, D | US 7819796 B2 2010.10.26 | 26 |
| A, D, C | WO 99/05255 A1 1999.02.04 | 26 |
| A | US 20060015961 a1 2006.01.19 | 26 |
| Y | US 20050118363 A1 2005.06.02 | 26 |
| Y | Yoshioka et. al. Intrauterine administration of autologous peripherel blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer. Human Reproduction. V.21, No.12, p. 3290-3294 | 26 |

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

| | |
|--|--|
| A – document care definește stadiul anterior general | T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția |
| X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur | E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată |
| Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie | D – document menționat în descrierea cererii de brevet |
| O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare | C – document considerat ca cea mai apropiată soluție |
| | & – document, care face parte din aceeași familie de brevete |
| P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate | L – document citat cu alte scopuri |

Data finalizării documentării 2017.06.12

Examinator GROSU Petru