

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038427**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.27

(51) Int. Cl. **C12N 5/00** (2006.01)

(21) Номер заявки
201490996

(22) Дата подачи заявки
2012.11.21

**(54) СПОСОБ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ С ОТСРОЧКОЙ
ПЕРЕНОСА ЭМБРИОНА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ**

(31) 61/629,651; 13/655,257

(32) 2011.11.23; 2012.10.18

(33) US

(43) 2015.02.27

(86) PCT/US2012/066258

(87) WO 2013/078312 2013.05.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ПРОДЖЕНА ИНК. (US)

(56) YOSHIOKA et al. 'Intrauterine administration of autologous peripheral blood mononuclear cells promotes implantation rates in patients with repeated failure of IVF-embryo transfer.' Human Reproduction, Vol. 21, No. 12, Pages 3290-3294. entire document
US-A1-20050118563
US-A1-20060015961

(72) Изобретатель:
**Фесков Александр, Фескова
Ирина, Жилкова Евгения, Жилков
Станислав (UA)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Способ экстракорпорального оплодотворения, при котором эмбрион имплантируют в матку пациентки по меньшей мере через два месяца, а предпочтительно через три-двенадцать месяцев, после извлечения яйцеклетки у пациентки, с целью уменьшения эффекта аутоиммунного отторжения эмбриона аутоиммунной системой пациентки и увеличения вероятности успешной беременности, а также при котором до момента имплантации эмбриона, эндометрий в матке подготавливают к имплантации эмбриона путем введения моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) в матку. Эта процедура проводится в сочетании с методами криоконсервации с целью сохранения ооцитов или эмбрионов пациентки, полученных экстракорпоральным способом.

B1**038427****038427****B1**

Настоящее изобретение было самостоятельно разработано указанными изобретателями без привлечения какого-либо финансирования из Федерального Бюджета.

Притязание на приоритет

В данной заявке заявляется приоритет по предварительной заявке на выдачу патента США сер. № 13/655,257, поданной 18 октября 2012 года, заявляющей приоритет на основании предварительной заявки на патент США сер. № 61/629,651, поданной 23 ноября 2011 года, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к области экстракорпорального оплодотворения, в частности, женщин со сниженной вследствие аутоиммунных реакций репродуктивной функций. В данном документе описывается метод, который используется для увеличения частоты наступления и стабильности возникновения беременности путем комбинирования методов экстракорпорального оплодотворения, в некоторых случаях с длительной криоконсервацией ооцитов или эмбрионов, полученных методом ЭКО, и контролируемой подготовки эндометрия в матке с помощью мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), предшествующей переносу эмбриона.

Уровень техники

Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения, каждый год более 15% женщин во всем мире испытывают трудности с зачатием и обращаются за медицинской помощью (ВОЗ, 1997), что составляло от 60 до 80 миллионов женщин во всем мире десять лет назад. Согласно общему определению Всемирной Организации Здравоохранения, бесплодием является отсутствие зачатия после факультативного срока длительностью в двенадцать месяцев. Однако многие пары несколько лет пытаются зачать ребенка естественным путем, прежде чем обратиться за медицинской помощью в попытке забеременеть. Снижение репродуктивной функции связано как с медицинскими, так и с немедицинскими факторами. Например, было выявлено, что возраст женщины является основным прямым фактором, влияющим на среднее время, необходимое для зачатия. Было установлено, что преждевременное угасание функции яичников происходит у 1 женщины из 1000 в возрасте до 30 лет; у одной женщины из 250 до 35 лет; и у одной женщины из 100 в возрасте до 40 лет. Таким образом, самые высокие показатели рождаемости относятся к возрастной группе от 25 до 30 лет и резко снижаются в возрасте после 35 лет. В настоящее время бесплодие является одной из наиболее распространенных проблем со здоровьем, с которыми сталкивается население в возрасте от 25 до 45 лет. Таким образом, существует огромный интерес и потребность в повышении детородной функции у здоровых женщин с возможностью устранения возрастных барьеров к деторождению, а также у женщин, которые не могут забеременеть естественными способами. Хотя бесплодие само по себе не может угрожать физическому здоровью, оно часто оказывает серьезное влияние на эмоциональное, психическое и душевное благополучие женщин и супружеских пар.

Вспомогательные репродуктивные технологии являются процедурами, которые заключаются в экстракорпоральной обработке как женских яйцеклеток (ооцитов или яйцеклеток) и мужских спермий (сперматозоидов), так и эмбрионов с целью осуществления оплодотворения у пациентов женского пола. Такие процедуры включают, но не ограничиваются такими: экстракорпоральное оплодотворение ("ЭКО"), в том числе перенос эмбрионов, перенос гамет в маточные трубы, перенос зигот в маточные трубы, перенос эмбрионов в маточные трубы, криоконсервация гамет и эмбрионов, донорство ооцитов и эмбрионов и суррогатное материнство. Экстракорпоральное оплодотворение ("ЭКО") стало основным методом лечения бесплодия или недостаточности репродуктивной функции в случаях, когда другие методы вспомогательных репродуктивных технологий не дали результата. В самом широком смысле этот процесс включает извлечение женской яйцеклетки и оплодотворение яйцеклетки спермой вне организма ("in vitro"). Указанный процесс включает мониторинг процесс овуляции у женщины, извлечение нескольких яйцеклеток из яичников женщины и оплодотворение спермой яйцеклетки в жидкой среде в лаборатории. Яйцеклетки, как правило, извлекают путем трансвагинального извлечения ооцитов при помощи пункции вагинальной стенки для получения доступа к яичникам под контролем ультразвукового аппарата. С помощью пункции фолликулы могут быть аспирированы, и фолликулярная жидкость передается ЭКО лаборатории для выявления и диагностирования яйцеклетки. В норме извлекается от десяти до тридцати яйцеклеток из организма каждой пациентки. Затем оплодотворенную яйцеклетку, (эмбрион), или, как правило, несколько эмбрионов, переносят в матку пациентки с целью осуществления успешного оплодотворения. См., например, патент США № 7781207.

Метод экстракорпорального оплодотворения был впервые разработан в 1970 году и до теперешнего момента стал эффективной формой оказания помощи значительной части женского населения. Как сообщается, в настоящее время 1,3% всех случаев рождения живых детей в Европе [Nygren et al. 2001] и 1,7% всех случаев рождения живых детей в Австралии [Hurst et al. 2001.] происходит в результате использования ЭКО. В результате использования циклов вспомогательных репродуктивных технологий ЭКО в Соединенных Штатах Америки, которое началось в 2006 году, произошло 41 343 случая родов (54 656 новорожденных), что составило чуть более 1,0% от общего количества случаев родов в США в упомянутом году. В 2010 году Роберт Эдвардс был удостоен Нобелевской Премии по Физиологии или

Медицине за разработку метода экстракорпорального оплодотворения. Следующим шагом стало изобретение метода заморозки, а затем разморозки и переноса эмбрионов, который впервые был разработан Карлом Вудом, что значительно улучшило возможность практической реализации метода ЭКО.

Согласно ряду зарегистрированных исследований показатели усредненных случаев оплодотворения, достигнутые с использованием метода ЭКО, остаются относительно низким и находятся в диапазоне от 15 до 25%. Работники сферы здравоохранения признают, что наиболее значимым ограничивающим фактором, влияющим на оплодотворение, является неспособность эмбрионов внедриться в эндометрий - слизистую оболочку матки. В соответствии с докладом Блейка с соавт. перенос 80-85% эмбрионов с помощью ЭКО не приводит в результате к наступлению беременности, что представляет собой очень большой уровень потери эмбрионов. Доклад Симона с соавт. показал, что у женщин, проходящих ЭКО циклы, оплодотворение было зарегистрировано в 60% циклов, следовательно 40% всех эмбрионов, перенесенных в процессе ЭКО, не приживаются.

Одной из возможных причин низкого уровня имплантации при использовании метода ЭКО является то, что эмбрионы переносят в матку через два дня после оплодотворения, на стадии 4-8 клеток. Существует мнение, что, возможно, было бы желательно использовать эмбрионы на стадии бластоцисты, которая достигается на 5-7 день культивирования. Преимуществами предлагаемой возможности является улучшение синхронизации между эмбрионом и маткой, а также возможность отбора эмбрионов лучшего качества в процессе продленного периода культивирования. Перенос бластоцисты также может помочь уменьшить число многоплодных родов в результате ЭКО путем отбора меньшего количества высокопродуктивных эмбрионов для одного переноса. В процессе осуществления процедуры ЭКО в матку, как правило, переносят от двух до пяти эмбрионов с целью увеличения вероятности имплантации, что приводит к риску многоплодной беременности. Таким образом, более половины детей, рожденных в Соединенных Штатах Америки в результате использования метода ЭКО, появляются в результате многоплодной беременности. Бывают случаи, когда в матке происходит множественная имплантация и эмбрионы продолжают расти и развиваться в утробе матери, которая не в состоянии выносить более одного или двух плодов за один срок. В таком случае принимается трудное решение о прекращении такой беременности и изъятии дополнительного плода или плодов из утробы матери. Вышеуказанный процесс называется изъятием эмбриона или плода и представляет собой процедуру, направленную на уменьшение количества жизнеспособных эмбрионов или плодов при многоплодной беременности. Такие решения приводят как к этическим последствиям, так и к частым психологическим травмам. Разработка лабораторных методов, которые могли бы увеличить вероятность и реальность имплантации каждого эмбриона, по-прежнему желательна по ряду вышеуказанных причин.

В процессе, который носит название естественного цикла экстракорпорального оплодотворения, оплодотворение осуществляется путем отбора у пациентки одной или более яйцеклеток, полученных естественным путем в процессе естественного менструального цикла женщины без использования каких-либо препаратов. В модифицированном естественном цикле ЭКО применяются препараты для лечения бесплодия в течение двух-четырех дней во время природного женского цикла во избежание спонтанной овуляции и получения более успешного результата процедур. "Умеренное ЭКО" представляет собой метод, при котором в течение короткого периода времени используется небольшая доза препаратов для стимулирования яичников в процессе естественного цикла женщины для получения 2-7 яйцеклеток и создания здоровых эмбрионов. Данный метод приводит к сокращению осложнений и побочных эффектов у женщин, и нацелен на качество, а не количество яйцеклеток и эмбрионов. Однако этот метод приводит к очень низкому уровню успешной беременности.

Поэтому, для увеличения вероятности наступления беременности обычно используются дополнительные методы. Наиболее распространенным методом является гиперстимуляция яичников, или супер-овуляция, используемая для стимулирования яичников с целью получения нескольких яйцеклеток, которые затем извлекают из организма пациентки. Длинный протокол обычно включает десенсибилизацию (подавление или истощение) оси яичник-гипофиз путем длительного использования агониста гонадотропин-высвобождающего гормона (ГнВГ). Последующая гиперстимуляция яичников, которая, как правило, осуществляется путем использования фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), начинается после окончания процесса десенсибилизации, обычно спустя от 10 до 14 дней. Цикл ЭКО с использованием этого протокола известен как традиционное экстракорпоральное оплодотворение. Процедура короткого протокола не включает десенсибилизацию и состоит из режима приема препаратов, способствующих зачатию, с целью стимулирования роста множественных фолликулов в яичниках. Во время других процедур используют агонист гонадотропин-высвобождающего гормона (ГнВГ), что уменьшает необходимость осуществления контроля путем предотвращения преждевременной овуляции, а в последнее время используют антагонисты гонадотропин-высвобождающего гормона (ант-ГнВГ), которые выполняют аналогичную функцию. У большинства пациентов инъекционные гонадотропины (обычно аналоги ФСГ) используются под строгим контролем. Во время осуществления такого контроля у пациентов часто проверяют уровень эстрадиола, а также уровень фолликулярного роста с помощью гинекологического УЗИ. Как правило, необходим примерно десятидневный курс инъекций. Стимуляция яичников несет риск чрезмерной стимуляции, которая приводит к синдрому гиперстимуляции яичников (СГСЯ) - потен-

циально опасному для жизни осложнению, которое заключается во вздутии живота, увеличении яичников, а также респираторных, гемодинамических и метаболических осложнениях. Кроме того, в последнее время также было продемонстрировано, что препараты, способствующие зачатию, используемые для стимуляции овуляции у пациенток, которые проходят процедуру ЭКО, способствуют сниженной имплантационной восприимчивости эмбриона в матке и приводят к снижению частоты наступления беременности. [Ertzeid et al. 2001].

На женскую репродуктивную функцию могут повлиять дисфункции воспроизводительного тракта, а также дисфункции нейроэндокринной или иммунной систем. Некоторые пациентки с онкологическим диагнозом рискуют потерять репродуктивную функцию вследствие применения некоторых видов химиотерапии, а также некоторых видов лучевой терапии, которые могут привести к преждевременной менопаузе и, соответственно, бесплодию. В Западной Европе и Северной Америке эндокринная дисфункция обнаруживается приблизительно у 10-20% женщин с бесплодием [Crosignani et al. 2000.] Тем не менее, в 10-20% случаев причина бесплодия остается неизвестной. Допускается, что у многих таких женщин аутоиммунные реакции организма могут быть причиной бесплодия. Репродуктивная аутоиммунная недостаточность и дефекты могут быть связаны с общей активацией иммунной системы или с реакциями иммунной системы, которые направлены непосредственно против овариальных антигенов.

Халлер-Киккатало поясняет, что для предотвращения возникновения самозащитных воспалительных реакций в организме человека на многие чужеродные воздушно-капельные и пищевые антигены, которые встречаются на поверхности слизистых оболочек организма, требуются активные механизмы толерантности. Тем не менее, самым важным аспектом толерантности является ауто толерантность, которая предотвращает иммунную агрессию собственных тканей организма, что является профилактикой аутоиммунных реакций. Аутоиммунитет связан с дисбалансом различных компонентов иммунной реакции, а также с развитием аутоиммунных антител, направленных против обычных антигенов клетки-хозяина. Женская репродуктивная функция регулируется серией высоко скоординированных и синхронизированных взаимодействий в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Синдром репродуктивных аутоиммунных потерь первоначально был описан Гляйхером в соавт. у женщин, страдающих эндометриозом, бесплодием и увеличенным количеством аутоантител. Несмотря на то, что влияние определенных аутоантител на патогенез бесплодия еще не было унифицировано изучено, аутоиммунные механизмы и увеличенная выработка множественных аутоантител участвуют в таких связанных с бесплодием нарушениях, как преждевременное угасание функции яичников (ПУФЯ), субклинической недостаточности яичников, невынашивание беременности, эндометриоз, синдром поликистозных яичников (СПКЯ), бесплодия неясного генеза, неоднократных неудачных попыток ЭКО и самопроизвольных аборт. Некоторые исследования продемонстрировали меньшую роль специфических антител и подчеркнули ключевую роль общей активации иммунной системы при сниженной фертильности. [N. Gleicher, 2001; Dmowski et al, 1995.].

Одна группа исследований была сосредоточена на разработке подходов к преодолению иммунологического бесплодия. Первым и наиболее часто используемым подходом является использование препаратов, которые направлены на подавление аутоиммунной реакции у пациента с целью обеспечения успешного наступления беременности. Например, для улучшения частоты наступления беременности у пациенток с рецидивирующими неудачными попытками забеременеть при использовании ЭКО были предложены низкие дозировки преднизолона в процессе оральной терапии. Однако существуют противоречивые данные, указывающие на то, что определенные антитела повреждают эмбрионы, мешают процессу имплантации или процессу образования плаценты. Это затрудняет прогнозирование успешности терапии при использовании этих определенных иммуноподавляющих препаратов. Были разработаны методы более умеренной предварительной терапии с использованием ацетилсалициловой кислоты или гепарина. Однако несмотря на то, что такой вид терапии стал универсальным, частота наступления беременности в результате использования такого подхода остается относительно низкой. [Maghraby et al, 2007].

Недавно был разработан второй подход. Процедура представляет собой подготовку как эндометрия, так и окружающей его среды при использовании мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). [Fujiwara et al., Kosaka et al., Yoshioka et al.] Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) позволяют эндометрию матки расти до достаточных размеров до момента имплантации эмбриона, а также выступать в качестве строительных блоков в организме для выращивания эмбриона(ов) после их имплантации в матку женщины. По мнению сторонников указанного подхода, МКПК были определены как мультипотентные клетки. Мультипотентные клетки производят клетки определенного типа или близкородственные клетки. Было показано, что они имеют способность превращается в любой вид человеческой ткани естественным путем. Мультипотентные клетки являются ценным материалом для проведения научных исследований и выполнения лечебных процедур. Последние достижения в области биоинженерии весьма перспективны в области восстановления, строительства, культивирования, регенерации, получения и выращивания тканей.

Заявка на Европейский патент EP1581637 описывает взрослые моноцитарные стволовые клетки, которые были выделены из периферической крови млекопитающих, и методы подготовки, распростране-

ния и использования таких стволовых клеток. Авторы патента США № 7795018, М. Кувана и Х. Кодамо описывают моноцитарные мультипотентные клетки (ММК), которые могут дифференцироваться в эндотелиальные клетки в питательной среде в условиях, стимулирующих дифференцировку в эндотелий. Далее описывается способ получения ММК, который включает культивирование МКПК экстракорпоральным способом на фибронектин и отбор фибробластоподобных клеток. Было показано, что при культивировании в ЭБС-2 среде, среде поддержания эндотелиальных клеток, в течение семи дней, ММК дифференцируются в эндотелиальные клетки с изменением морфологии клеток от формы шпинделя в морфологию, имеющую множество проекций (см. патент США № 7795018). Исследователи данного изобретения предположили, что использование МКПК может, таким образом, играть важную роль в репродуктивном процессе, и включили использование МКПК в новую технику экстракорпорального оплодотворения, представленную в данном документе.

Была разработана группа различных препаратов для зачатия, которые могут применяться по отдельности или совокупно во время проведения ЭКО, в целях содействия принятию эмбриона иммунной системой женщины. Одним из таких препаратов является растворимый человеческий лейкоцитарный антиген G (рЧЛА-G), применение которого представляется перспективным. Класс молекул рЧЛА был признан таким, который принимает участие в иммунологической реакции и в модуляции трансплацентарных иммунных отношений во время беременности. В патентной заявке США № 10/829081 Шер с соавт. описывают процесс изоляции рЧЛА-G из питательной среды, которая окружает объединенные развивающиеся эмбрионы и бластоцисты. Они отметили, что отсутствие рЧЛА-G в супернатанте, окружающем группы эмбрионов при культивировании, связано со значительно более низкой частотой имплантации при ЭКО и наступлении беременности. Они предположили, что добавление рЧЛА-G в среду, в которой эмбрионы культивируются и/или доставляются в uterine среду матки путем переноса эмбрионов, увеличит степень имплантации и возможности наступления беременности при использовании таких эмбрионов. Несмотря на полезность метода, ни этот, ни любой другой подход сам по себе не решил проблему аутоиммунного бесплодия. В этом документе предлагается использовать препараты для зачатия в совокупности с описываемой здесь процедурой изобретения с целью увеличения вероятности и успешности наступления беременности.

Наконец, было продемонстрировано, что сконструированные гликолипидоподобные молекулярные конструкции способны модифицировать эмбрионы и повышать взаимодействие между эмбрионом и тканью-мишенью - эндометрием. Создание макро-молекулярной матрицы на внешней поверхности эмбриона и загрузка указанной матрицы определенными препаратами для стимуляции наступления беременности представляют собой методы, которые, по мнению сторонников такого подхода, будут иметь очень широкое применение в процессе использования метода ЭКО в будущем. Путем использования этого конструктивного подхода модификация эмбрионов не только была успешно продемонстрирована в системе культивирования *in vitro*, но и привела к рождению животными здорового потомства, полученного из таких модифицированных эмбрионов. Однако этот подход еще не прошел испытание в процессе клинических испытаний и рассматривать его в качестве современных медицинских методов пока преждевременно.

Множество исследований было посвящено процедурам повышения вероятности наступления успешной беременности и рождения ребенка. Несмотря на значительное количество проведенных исследований, на технические достижения и вариативность процедур, частота успешного наступления беременности с использованием метода ЭКО по-прежнему остается на уровне в среднем от 15 до 25% за цикл. Исследователи данного метода попытались решить проблему имплантации эмбриона и снизить риск реакций аутоиммунной системы, представив решение, которое ориентируется на стабилизацию взаимодействия между женской иммунной системой и эмбрионом.

Краткое описание изобретения

В самом широком смысле данное изобретение предлагает метод искусственного оплодотворения пациентки, который включает стадии введения в полость матки эффективного количества состава, содержащего моноклеарные клетки периферической крови, и переноса, по меньшей мере, одного эмбриона в матку пациентки после заранее определенной отсрочки начала экстракорпорального оплодотворения указанной пациентки; этот метод приводит к увеличению вероятности имплантации эмбриона в матку с успешным наступлением беременности по сравнению с методами экстракорпорального оплодотворения, которые не включают таких стадий. Предопределенная временная отсрочка является периодом времени, достаточным для уменьшения аутоиммунного отторжения эмбриона или риска аутоиммунной реакции пациентки. Предпочтительная длительность отсрочки, предшествующей переносу эмбрионов, составляет не менее двух менструальных циклов или двух циклов овуляции пациентки, при этом длительность отсрочки будет варьироваться от пациентки к пациентке, а также в зависимости от видов, гибридов и пород животных. Предпочтительная длительность отсрочки у пациента-человека составляет от трех до двенадцати месяцев.

Еще одним аспектом данного изобретения является то, что к концу периода времени отсрочки, эндометрий женщины подготовлен таким образом, чтобы оптимизировать принятие эмбриона в полость матки. Согласно изобретению, это достигается путем внутриматочного введения моноклеарных клеток

периферической крови (МКПК), которые, наиболее предпочтительно, были полученных от пациентки. В этом документе отмечено, что данный метод повышает вероятность успешного наступления беременности и развития беременности раннего срока. Временная отсрочка имплантации в сочетании с криоконсервацией эмбрионов и подготовкой эндометрия женщины с помощью МКПК является основой настоящего изобретения.

В частности, описываемый метод экстракорпорального оплодотворения пациентки включает стадии: (a) получения, по меньшей мере, одного ооцита и оплодотворения ооцита с помощью сперматозоидов для образования зиготы; (b) развития зиготы вне организма до стадии эмбриона; (c) криоконсервация эмбриона; (d) ожидание заданного периода времени, достаточного для снижения риска аутоиммунной реакции пациентки; (e) извлечение первой части моноклеарных клеток периферической крови из крови пациентки за 2-4 дня до окончания периода ожидания; (f) культивирование указанной первой части МКПК в подходящей питательной среде; (g) извлечения второй свежей порции МКПК из крови пациента в последний день периода ожидания; (h) объединение культивированной первой части МКПК со свежей второй частью МКПК для получения состава, содержащего свежие и культивированные МКПК; (j) введение состава МКПК в матку пациентки; (k) выведение эмбриона из состояния криоконсервации; и (l) перенос, по меньшей мере, одного оттаявшего эмбриона в матку пациентки для стимулирования беременности.

Дополнительным аспектом данного изобретения является состав, содержащий МКПК, метод получения такого состава, применение состава МКПК в процессе экстракорпорального оплодотворения, а также для выращивания и воспроизводства определенной ткани-мишени в организме, наиболее предпочтительно эндометрия матки женщины. Такой способ предусматривает извлечение МКПК из крови пациентки; репродукцию части извлеченных МКПК в от 4,8% до 6,0% растворе двуокиси углерода (CO₂) при температуре от 36,7 до 37,3°C в питательной среде, содержащей (i) среду RPMI 1640 с L-глутамином и бикарбонатом натрия (ii) рекомбинантный человеческий альбумин и (iii) стимулирующее вещество, позволяющее повысить способность МКПК к улучшению роста тканей, такое как хорионический гонадотропин человека (ХГЧ); и объединения свежих и культивированных частей МКПК для получения указанного состава.

Подробное описание изобретения

Суть данного изобретения можно понять более четко путем определения некоторых терминов, используемых в описании и спецификации.

"Бластоцист" представляет собой эмбрион на пятый-шестой день после оплодотворения, имеющий внутреннюю клеточную массу, внешний слой клеток, называемый трофэктодермой, и заполненную жидкостью сегментационную полость, содержащую внутреннюю клеточную массу, из которой развивается весь эмбрион. Трофэктодерма является предшественницей плаценты. Бластоциста окружена вителлиновым слоем, который впоследствии выводится при "созревании" бластоцисты. Вителлиновый слой, состоящий из гликопротеинового покрытия, окружает яйцеклетку с одноклеточной стадии до стадии развития бластоцисты. Перед прикреплением и имплантацией эмбриона вителлиновый слой выводится из эмбриона несколькими способами, включая протеолитический распад. Первоначальной функцией вителлинового слоя является предотвращение попадания в яйцеклетку более чем одного сперматозоида, а затем предотвращение преждевременного прикрепления эмбриона до его попадания в матку.

"Криогенное ЭКО" представляет собой процесс оплодотворения, в котором происходит криоконсервация эмбриона, который затем оттаивает до момента его переноса, или процесс, в котором для оплодотворения используется ооцит, который ранее был заморожен, а затем разморожен.

"Свежее ЭКО" представляет собой процесс искусственного оплодотворения, в котором эмбрион не замораживается до его переноса в полость матки, и при котором ооциты, используемые для получения эмбриона, ранее не были заморожены.

"Эмбрион" является продуктом деления зиготы до окончания эмбриональной стадии, по прошествии восьми (8) недель после оплодотворения. Стадия дробления эмбриона происходит в течение первых трех дней культивирования.

"Перенос эмбрионов" представляет собой процедуру, при которой один или более эмбрионов и/или бластоцист помещаются в полость матки или фаллопиевых труб. Как таковой, термины "бластоцист" и "зародыш" используются здесь взаимозаменяемо для целей определения термина "перенос эмбрионов" и при применении термина "перенос эмбрионов" в рамках сферы и применения данного изобретения в соответствии с описанием и заявкой.

Термин "эндометрий", используемый в данном документе, относится к ткани, выстилающей внутреннюю поверхность матки и состоящей из слоя эпителиальных клеток. Эмбрион первоначально вступает в контакт со слизистой оболочкой и внеклеточным матриксом ("слизью") с целью имплантации. Слой эпителиальных и подстилающих стромальных клеток утолщается циклически, выделяет слизь и выводится из организма под гормональных влияний менструального цикла. Под термином "имплантация" следует понимать присоединение и последующее проникновение бластоцисты (после выведения ее вителлинового слоя), как правило, в эндометрий. Присоединение к выстилке эндометрия может происходить путем взаимодействия между присоединительными молекулами и одним или более компонентами

эндометрия, в том числе мембран эпителиальных клеток, слизи, муциновых компонентов слизи, или экзогенно введенного компонента матки.

"Оплодотворение" означает проникновение сперматозоидов в яйцеклетку и комбинирование их генетического материала, что приводит к образованию зиготы.

Термин "начало экстракорпорального оплодотворения", который используется в данном документе, означает начало контролируемой стимуляции яичников пациентки, что включает фармакологическое лечение, при котором у женщин происходит стимуляция развития множественных фолликулов яичника для получения нескольких ооцитов в процессе фолликулярной аспирации.

Термин "матка", часто называемый утробой, является основным женским гормонально-активным репродуктивным половым органом большинства млекопитающих, включая человека, который содержит шейку матки на одном конце, а другой соединяется с одной или обеими фаллопиевыми трубами, в зависимости от вида. Репродуктивная функция матки заключается в принятии оплодотворенной яйцеклетки, которая проходит через маточно-трубное соустье из фаллопиевой трубы. Она имплантируется в эндометрий и получает питание из кровеносных сосудов, которые развиваются исключительно для этой цели. Оплодотворенная яйцеклетка становится эмбрионом, присоединяется к стенке матки, создает плаценту и развивается в плод в процессе беременности до момента родов. В том значении, которое он имеет в этом документе, термин "матка" включает фаллопиевы трубы для целей переноса эмбриона. Термин "матка" также используется взаимозаменяемо с термином "полость матки", который обозначает полость тела матки.

В процессе ЭКО происходит стимулируемая выработка и созревание ооцитов, что влияет на иммунную систему женщины. Перенос эмбриона культивированного с помощью ЭКО в полость матки вскоре после извлечения ооцитов может вызвать чрезмерную реакцию иммунной системы. Такая чрезмерная реакция иммунной системы может стать причиной неспособности организма имплантировать эмбрион и привести к аутоиммунному бесплодию. Первый аспект изобретения представляет отсрочку введения эмбриона в матку с целью предоставления возможности иммунной системе женщины стабилизироваться и восстановить свой естественный гормональный баланс. За время отсрочки, ооциты или эмбрионы пациентки могут по усмотрению сохраняться с помощью криоконсервации.

Период отсрочки, используемый в данном изобретении, выражается в заранее установленном периоде времени для каждого конкретного пациента. Для людей временная отсрочка может составлять любой отрезок времени равняющийся, по крайней мере, двум месяцам или двум циклам овуляции. В предпочтительном варианте заранее установленная отсрочка равняется трем циклам овуляции, что обычно соответствует трем месяцам. У большинства женщин один цикл овуляции происходит каждые 28 дней. Следует понимать, однако, что, поскольку циклы овуляции варьируются от женщины к женщине, число фактических дней отсрочки изменяется от пациентки к пациентке в процессе использования ЭКО данного изобретения. Вполне возможно, что пациентка будет иметь только два цикла овуляции в течение трех месяцев, или, таким же образом, что женщина может иметь более трех циклов овуляции в течение трех месяцев. В некоторых случаях возможно, что у пациентки не будет дополнительной овуляции после первоначальной овуляции, происходящей после начала использования процедуры ЭКО. Длительность периода отсрочки может после превышать три месяца, но предпочтительно должна равняться периоду от трех месяцев до одного года. Данная заявка демонстрирует, что заранее установленное время отсрочки существенно снижает риск аутоиммунного бесплодия и, следовательно, значительно повышает вероятность успешного наступления беременности.

В рамках настоящего изобретения присутствуют варианты, при которых ооциты или эмбрионы, полученные от женщины или женщин, отличных от пациентки, используются для оплодотворения, и которые носят название "донорских яйцеклеток" или "донорских эмбрионов" соответственно. Это случается в ситуациях, когда пациентка не в состоянии овулировать или производить жизнеспособное яйцеклетки, или в которых эмбрионы, полученные путем искусственного оплодотворения собственных яйцеклеток пациентки, обладают недостаточностью для переноса или имеют низкую вероятность выживания согласно морфологическому или генетическому тестированию.

В процессе обычной процедуры ЭКО женщинам требуются гормональные инъекции для стимуляции развития фолликулов и множественных яйцеклеток. Такой процесс стимуляции обычно требует первоначального использования агониста гонадотропин-высвобождающего гормона (ГнВГ) для подавления функции яичников с целью предотвращения овуляции до наступления желаемого момента. Наиболее часто используется препарат под названием цитрат кломифена (Clomid®), являющегося селективным модулятором рецептора эстрогена, который повышает выработку гонадотропинов путем ингибирования отрицательной обратной связи от эстрогена к гипоталамусу. Такая индукция окончательного созревания и выделения ооцитов часто провоцируется введением лютеинизирующего гормона. Протоколы для этих инъекций хорошо известны, установлены в этой области техники и используются в любом из вариантов метода данного изобретения.

В соответствии с методом изобретения неоплодотворенные яйцеклетки отбирают и извлекают из организма пациентки способами, известными в данной области техники. Такие способы включают помещение специально разработанной иглы в яичниковый фолликул и извлечение жидкости, которая со-

держит яйцеклетки. После извлечения фолликулярной жидкости из фолликула яйцеклетки могут быть проверены микроскопическим способом и продиагностированы для наблюдения за их морфологическими особенностями. Один из способов получения ооцитов для реализации метода ЭКО раскрывается в патенте США № 4725579. В соответствии с данным методом у пациентки извлекают шесть ооцитов, хотя предпочтительно получение четырех. После этого яйцеклетки помещаются в инкубатор. Для оплодотворения яйцеклеток прибегают к традиционному способу инсеминации или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ИКСИ). Используемый способ оплодотворения часто основан на параметрах мужской спермы или других факторах, таких как тип анализа, требуемого в отношении эмбриона. В процессе традиционного оплодотворения сперматозоиды смешивают с яйцеклетками в чашке для культивирования и инкубируют в течение ночи с целью осуществления оплодотворения. В процессе интрацитоплазматической инъекции один сперматозоид вводится непосредственно в одну яйцеклетку. При использовании любого метода, на следующий день проводится наблюдение за яйцеклеткой для оценки клеточного деления. Оплодотворенные яйцеклетки, называемые теперь эмбрионами, затем помещают в определенную питательную среду, способствующую росту и развитию.

В соответствии с изобретением, ооциты или эмбрионы, полученные в результате применения метода ЭКО, выращивают в подходящей питательной среде. Доступные питательные среды пытаются обеспечить питательные вещества, необходимые для роста и развития клетки, и стремятся максимально воспроизвести условия, которые обычно существуют в женской репродуктивной системе. В описываемом процессе могут использоваться питательные среды, известные в данной области и пригодные для экстракорпоральной поддержки развития и роста клеток в лабораторных процедурах. Примеры включают, но не ограничиваются, человеческой трубной жидкостью (ЧТЖ) (Irvine Scientific), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этановая (HEPES) среда (Irvine Scientific), IVF-50 (Scandinavian IVF Science), S2 (Scandinavian IVF Science), G1 и G2 (Scandinavian IVF Science), UniIVF, ISM-1, BlastAssist, среда UTM (продаваемая как MEDICULT® среда Origio A/S), Модифицированная среда Виттена, T6 среда Виттингема, F-10 среда Хэма, раствор Эрла. Как правило, предлагаются буферные системы, такие как 4-морфолинопропансульфокислота (MOPS). Эти процедуры хорошо изложены Трусоном в соавт. (Trousseau et al.) (1980 и 1982 гг.), а также Куинном в соавт. (Quinn et al.) (1985).

Среды культивирования ткани обычно представляют собой сложные системы, содержащие множество аминокислот, витаминов и других составляющих. Некоторые среды состоят из сбалансированных солевых растворов с добавлением углеводных источников энергии, таких как глюкоза, пируваты и лактата. Среды также могут дополняться незаменимыми аминокислотами. Компоненты сред часто получают из источников нечеловеческого и неживотного происхождения, таких как рекомбинантные микроорганизмы. Желательно принять меры для уменьшения возможности заражения, такие, как надлежащая очистка и методы подготовки, практикуемые в данной области техники. Кроме того, среды могут включать антибиотики, такие как пенициллин или стрептомицин для уничтожения бактерий, которые могут вводиться в среду в процессе сбора ооцитов.

В процессе интракорпорального развития в пределах женской репродуктивной системы, ооцит закладывается внутри и выходит из яичника во время овуляции и движется через яйцевод к матке. Жидкость яйцевода содержит ряд компонентов, обеспечивающих питание такого ооцита и окружающих его кучевых клеток. После того как происходит оплодотворение, возникшая в результате этого зигота проходит вниз по яйцеводу и выходит в матку примерно через три дня, пройдя внутреннюю трансформацию и испытывает изменения окружающей среды. В процессе роста зиготы/эмбриона/бластоцисты происходят существенные изменения развития. Состав жидкости, окружающей развивающийся в матке эмбрион, адаптируется к этим меняющимся потребностям.

Ни одна из сред не является настолько оптимальной для поддержания гамет, оплодотворения, созревания зиготы и развитие эмбриона, как природная среда женской репродуктивной системы. Таким образом, ряд специализированных сред разработан для применения на различных стадиях развития эмбриона. Например, среды G1 и G2 были специально разработаны для удовлетворения физиологических потребностей стадии дробления эмбриона и зародыша на 8-ми клеточной стадии вплоть до стадии бластоцисты. Патент США № 6,605,468 [Robertson et al.] описывает среду для размножения эмбрионов на ранних стадиях вплоть до стадии бластоцисты. Среда содержит эффективное количество гранулоцитарно-макрофагальных колониестимулирующих факторов (ГМКФ) для увеличения процентного соотношения предбластоцистных эмбрионов, которые развиваются до стадии готовых к переносу бластоцист. Описываемый метод также используется для выращивания человеческих эмбрионов до стадии готовых к передаче бластоцист. В результате этого метода большая часть эмбрионов может быть выращена до стадии бластоцист и использована для имплантации в процессе реализации метода ЭКО. Был проведен ряд исследований с использованием методов культивирования, в результате которых эмбрионы выращивают совместно с питательными клетками. [Menezes et al., 1990; Planchot et al., 1995] Для стимулирования роста эмбриона к среде могут быть добавлены другие стимулирующие факторы, такие как цитокины, фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), см., например, патент США № 5,418,159 [Gough et al.]. Фактор, ингибирующий лейкемию, является мощным гормоном, обладающим общей полезностью в области экстракорпорального оплодотворения, например при поддержании линий эмбриональных стволовых клеток и по-

вышение эффективности переноса эмбрионов.

Патент США № 6,838,235, [Gardner et al.] предусматривает, что вместо погружения репродуктивных клеток человека в одну питательную среду в течение всего процесса ЭКО, репродуктивные клетки могут помещаться в последовательность различных питательных сред, в процессе проведения процедуры ЭКО. Один состав питательной среды специально разрабатывается для обеспечения физической среды, аналогичной той, которая существует в женском репродуктивном тракте и способствует росту и развитию эмбрионов. Описание предполагает, что специализированные среды могут использоваться для извлечения и обработки ооцитов; созревания ооцитов; обычного оплодотворения; наблюдения и биопсии ооцитов, зиготы и эмбрионов; эмбрионального развития до 8-ми клеточной стадии; эмбрионального развития до стадии бластоцисты; переноса эмбрионов; и криоконсервации.

В дополнение к использованию общедоступных питательных сред для подготовки эмбрионов, метод изобретения можно комбинировать с другими методами для увеличения вероятности и успешности наступления беременности. Был разработан ряд методов, в которых эмбрион каким-либо образом модифицируется до момента его переноса в полость матки. Например, Европейский патент EP 1765987 (WO 2005121322 A1) описывает ферментативную модификацию клеточной поверхности H-антигена путем добавления одного или нескольких моносахаридных единиц, которые генерируют клетки, серологически эквивалентные А или В антигенам эритроцитов. Исследования показывают, что эмбрионы имеют рецепторы, связывающиеся с гиалуронатом, а также, что на эндометрии матки матери есть рецепторы гиалуроната. Считается, что гиалуронат действует как биологический клей, который помогает эмбриону связываться с эндометрием и, соответственно, способствует имплантации. Патент США № 8,183,214 [Carter et al.] описывает способ локализации гиалуроновой кислоты на поверхности клетки или многоклеточной структуры (эмбриона) для использования в процедурах ЭКО. Описываемый метод предусматривает углеводно-липидные конструкции, которые прочно встраиваются в липидный двойной слой или мембрану клеток или эмбрионов, меняя его биологическую активность для улучшения определенных характеристик, таких как характеристики роста, хранения и выживания эмбриона, а также вероятности встраивания эмбриона после его переноса в матку. Аналогично, в патенте США № 7,819,796 [Blake et. al.] описывается другая экзогенно подготовленная конструкция для повышения присоединения и имплантации эмбриона. Эмбрион модифицируется с помощью гликолипидов, имеющих липидные отростки, которые вставляются в клеточную мембрану эмбриона или вителлиновый слой, в котором гликолипид был модифицирован для внедрения связывающей части, в то время как связывающая часть адаптируется для связывания с присоединительной молекулой. Присоединение эмбриона к эндометрию может происходить непосредственно через присоединительные элементы или через соединяющие молекулы. Еще один метод, протеиновое окрашивание, представляет собой способ модификации внешних антигенов клеточных мембран без переноса генов. Спецификация международной заявки PCT/US98/15124 (публикация WO 99/05255) описывает улучшение внедрения путем установления связи эмбриона с липидно-модифицированной адгезивной молекулой с целью модификации развития эмбриона. Патент США № 13/067,021 описывает другой нетрансгенный метод для осуществления эффективных качественных и/или количественных изменений в поверхностных антигенах, выраженных клеткой. Синтетические молекулярные конструкции, описанные исследователями, встраиваются в липидный двойной слой клетки, и предполагается, что такое внедрение термодинамически предпочтительнее. Указанная выше подготовка эмбриона, а также другие способы, практикуемые в данной области техники, рассматриваются в пределах области изобретения, описываемого в данной заявке.

В процессе традиционной процедуры ЭКО эмбрионы переносят в полость матки через два дня после оплодотворения, когда каждый эмбрион находится на 4-х клеточной стадии или через три дня после оплодотворения, когда эмбрион находится на 8-ми клеточной стадии. Было признано, что, возможно, желательно использовать эмбрионы на стадии бластоцисты, которая достигается на пятый-седьмой день культивирования. Метод ЭКО, описываемый в данном изобретении, позволяет переносить эмбрион в любой момент из спектра развития эмбриона/бластоцисты. Путем визуального наблюдения, например, с использованием микроскопии, бластоцисты или эмбрионы считаются готовыми к переносу в матку, когда бластоцельная полость ясно видна и составляет более 50% объема эмбриона. В естественных условиях, этот этап обычно достигается через четыре-пять дней после оплодотворения - вскоре после прохождения эмбрионом маточной трубы и достижения им матки.

Согласно второму аспекту данного изобретения, изобретатели обнаружили, что введение состава, содержащего мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), в матку пациентки до переноса эмбриона во время проведения ЭКО, несомненно увеличивает вероятность успешной имплантации эмбриона в эндометрий матки, что приводит к возникновению жизнеспособной беременности. Не преследуя цели быть связанными научной теорией, считается, что МКПК укрепляют здоровье и жизнеспособность эндометрия женщины и переносимого эмбриона.

МКПК являются мультипотентными прогениторными клетками, которые имеют способность давать потенциал для развития клеток из множественного, хотя и ограниченного количества, клеточных линий. В конце длинной серии клеточных делений, формирующих эмбрион, образуются клетки, которые являются окончательно дифференцированными, или которые, как считается постоянно нацеле-

ны на выполнение определенной функции. Благодаря экспериментам со стволовыми клетками, стволовые клетки крови могут выполнять функцию нейронов или клеток мозга - процесс, известный под названием трансдифференциация. Использование плюрипотентных стволовых клеток, взятых из эмбрионов, пуповины или эмбриональных тканей, полученных из яйцеклеток, оплодотворенных методом экстракорпорального оплодотворения, поднимает этические и правовые вопросы в случае человеческого материалом, создает риск передачи инфекции и/или может оказаться неэффективным, так как такие клетки могут быть отклонены иммунной системой реципиента. Можно утверждать, что использование МКПК поднимает меньше этических и правовых проблем, потому что МКПК являются клетками, которые получают из крови и которые не являются стволовыми клетками, в то же время все же обладая способностью дифференцироваться.

В том значении, в котором термин периферическая мононуклеарная клетка крови (МКПК) используется в этой заявке, он означает мультипотентную клетку, которую выделяют, собирают, получают, изолируют или иным образом извлекают из крови пациентки. МКПК является клеткой крови, обладающей круглым ядром. Класс ПКМК включает, но не ограничивается, лимфоцитами, моноцитами и макрофагами. Эти клетки крови являются важнейшим компонентом в иммунных системах организмов, используемые в борьбе с инфекциями, а также работе других функций, связанных с иммунной системой. Популяция лимфоцитов состоит из Т-клеток (CD4 и CD8 положительных ~ 75%), В-клеток и NK-клеток (~25% комбинированные). Популяция МКПК также включает базофильные и дендритные клетки.

МКПК могут быть выделены из периферической крови человека с помощью распространенных методов, известных в данной области. Клетки могут быть извлечены из цельной крови с помощью технологии FICOLL® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, ООО, Швеция), гидрофильного полисахарида, который разделяет слои крови на верхний слой плазмы, за которым следует слой МКПК и нижняя фракция лейкоцитов, эритроцитов и полиморфно-ядерных клеток (таких как нейтрофилы, эозинофилы). Кроме того, полиморфно-ядерные клетки могут быть далее выделены с помощью лизиса эритроцитов. Ficoll® является частью Ficoll-Paque® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, ООО, Швеция). Ficoll-Paque®, как правило, размещаются в нижней части конической трубки, и кровь затем медленно наслаивается сверху на Ficoll-Paque®. После центрифугирования, в конической трубке будут видны несколько слоев, сверху вниз: плазма и другие компоненты, слой мононуклеарных клеток, содержащий МКПК, Ficoll-Paque®, а также эритроциты и гранулоциты, присутствующие в форме гранул. Такое разделение позволяет легко собрать МКПК. В слое МКПК или Ficoll-Paque® может произойти захват некоторых эритроцитов (наличие эритроцитов и гранулоцитов). В слое МКПК может иногда происходить значительное свертывание крови. В целях предотвращения свертывания Ficoll-Paque® обычно используют в сочетании с этилен диамин тетра-уксусной кислотой (ЭДТА) и гепарином. По той причине, что наслоение Ficoll-Paque® является очень медленным процессом, были разработаны устройства, которые помогают в процессе наслоения, который требует наибольшего количества времени. Одним из таких продуктов является SepMate™-50 (StemCell Technology Inc., Канада), который представляет собой специализированную трубку, содержащую пористый вкладыш, образующий физический барьер между Ficoll-Paque® и образцом крови. Это позволяет поместить образец крови, с помощью пипетки на вставку, устраняя необходимость в наложении его непосредственно на Ficoll-Paque®. Вставка SepMate™ также уменьшает длительность стадии разделения в центрифуге, и после такого разделения, верхний слой, содержащий плазму и МКПК, может быть слит в отдельный контейнер. Другие устройства представляют собой столбец, содержащий пористый полиэтиленовый барьер высокой плотности или "фритту". Эти устройства позволяют крови наслаиваться гораздо быстрее без смешивания полисахарида и крови. Примером такого продукта является система Accuspin System Histopaque-1077, продаваемая компанией Sigma Aldrich. Кроме того, можно пользоваться раздельной системой Ficoll-Paque®, включенной в пробирку с вакуумом, используемую для сбора крови. Такие пробирки с вакуумом повышают удобство и безопасность сбора препаратов крови, однако являются гораздо более дорогостоящими по сравнению с обычными вакуумными пробирками. Другим вариантом такой продукции является Floaties™, который, как было продемонстрировано, позволяет эффективно наслаивать кровь или клеточную суспензию на Ficoll® с помощью специального состава полимерных гранул или шариков. Эта продукция является не дорогостоящей, снижает зависимость исследователей от оборудования и, на самом деле, ускоряет процесс наслоения. Любая из вышеуказанных методов, в том числе другие методы, которые используются или будут использоваться в процессе сбора, выделения, извлечения, забора, разделения, удаления или получения МКПК из крови организма, человеческого или животного, любым другим способом, рассматриваются в рамках вариантов использования изобретения, описываемого в данной заявке.

Одним из аспектов изобретения, представленного в данной заявке, является способ культивирования клеток МКПК. Этот способ заключается в культивировании клеток на пластинах, покрытых фибронектином в увлажненной среде, содержащей от 4,8 до 6,0% двуокиси углерода (CO₂) при температуре в диапазоне от 36,7 до 37,3°C при плотности от 104 до 107/мл. Предпочтительным является способ, при котором МКПК культивируют в течение периода времени в интервале от 46 до 72 ч. Самым предпочтительным является культивирование МКПК на пластинах, покрытых фибронектином, в 5,0% CO₂ среде

при температуре 37,1°C в течение 48 ч.

Питательная среда, используемая в данном методе для разведения извлеченных МКПК, являются средой Мемориального Института Розуэлла Парка, широко известной как среда RPMI, которую можно получить из нескольких источников. Среда RPMI часто используется культивирования клеток и тканей. Среда RPMI 1640 традиционно используется для роста бессывороточных человеческих лимфоидных клеток, клеток костного мозга и клеток гибридомы. Среда RPMI 1640 использует систему буферизации бикарбоната и отличается от большинства клеточных питательных сред млекопитающих своим pH 8 составом. Предпочтительная среда в соответствии с методами данного изобретения является питательной средой RPMI 1640, содержащей L-глутамин и бикарбонат натрия.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, рекомбинантный человеческий альбумин (РЧА) добавляют в питательную среду. РЧА является известным белком-носителем, присутствующим в высокой концентрации в плазме с циркулярным полураспадом, равным, примерно, 19 дням. Он принимает участие в перемещении жирных кислот к тканям, стабилизации белков, связывании ионов металлов с поверхностями, а также в антиоксидантном эффекте в плазме. РЧА широко доступен и может быть получен от нескольких поставщиков, например, таких как Novozymes, Inc. или Sigma-Aldrich, LLC. Добавление РЧА в процессе реализации техники изобретения к питательной среде имеет эффект пищевой добавки, которая улучшает рост МКПК.

Еще одним аспектом данного изобретения является метод добавления хорионического гонадотропина человека (хГЧ) в питательную среду RPMI 1640. Хорионический гонадотропин человека (хГЧ) освобождается в организме в кровотоке матери во время беременности с помощью плацентарных синцитиотрофобласт. Было показано, что указанный гормон обладает иммуномодулирующим свойством и сообщено, что введение хГЧ увеличивает успешность беременности, а антисыворотки к хГЧ ингибируют внутриутробную имплантацию. хГЧ взаимодействует с определенными рецепторами (рецепторы лютропина хориогонадотропина) и способствует поддержанию желтого тела во время начала беременности, заставляя его вырабатывать гормон прогестерон. Прогестерон обогащает матку толстой оболочкой кровеносных сосудов и капилляров, чтобы она могла выдержать рост эмбриона и плода. Благодаря своему высокому отрицательному заряду хГЧ способен отталкивать иммунные клетки матери, защищая плод в течение первого триместра. Было также предположено, что хГЧ может служить плацентарным звеном для развития местной материнской иммунологической толерантности. Например, хГЧ-обработанные клетки эндометрия вызывают увеличение апоптоза Т-клеток (растворение Т-клеток). Эти результаты демонстрируют, что хГЧ может служить звеном в развитии перитрофобластической иммунной толерантности и может способствовать инвазии трофобласта, который известен своей способностью ускорять развитие плода в эндометрии. [Kayisli соавт., 2003]. Кроме того, было выдвинуто предположение, что уровни хГЧ связаны с тяжестью утренней тошноты у беременных женщин. Минимальная концентрация хГЧ в питательной среде, описываемой в изобретении, составляет не менее 5 МЕ/мл. В целях ясности с помощью этого исследования было обнаружено, что хГЧ в питательной среде, получаемый в соответствии с техникой изобретения, функционирует в качестве активирующего агента, улучшающего способность МКПК усиливать рост тканей, в частности, рост эндометрия в процессе метода ЭКО данного изобретения. Составы культивированных МКПК и/или сочетаний культивированных и свежих МКПК имеют возможность изменять размер и восприимчивость эндометриальной ткани пациентки при использовании составов МКПК, предусматриваемых изобретением. Это приводит к увеличению размера, в частности увеличению толщины, слизистой оболочки матки, а также повышенной способности эндометрия связываться с эмбрионом после имплантации.

Метод экстракорпорального оплодотворения, описываемый в изобретении, обеспечивает использование МКПК, полученных описанным способом культивирования, с целью улучшения процесса наступления беременности. После получения ооцитов у пациентки, часть МКПК извлекают из крови такой пациентки. Эту часть МКПК затем культивируют в подходящей питательной среде в соответствии с вышеописанным методом с целью получения желаемого количества и качества МКПК. По прошествии определенного периода ожидания или отсрочки, описываемых в данной заявке, у пациентки производится дополнительный забор порции крови, а также свежей порции МКПК из крови. Кроме того, порция крови первоначально полученная у пациентки, может быть разделена на различные части, содержащие МКПК, из которых одну или несколько культивируют, а одна или несколько порций остаются свежими. Свежую порцию предпочтительно получают в последний день заранее установленного периода ожидания. Несколько или все свежие МКПК затем объединяются с несколькими или всеми порциями культивированных порций МКПК для получения составов, содержащих как свежие, так и культивированные МКПК. В соответствии с изобретением предпочтительная концентрация МКПК в составе МКПК составляет от 4 до 5 миллионов клеток на миллилитр каждого состава; однако, для работы в пределах границ объема данного изобретения допустимы концентрации до 8 млн. клеток/мл состава. Состав могут дополнительно смешивать или перемешивать, а также обрабатывать любым другим желательным способом для объединения МКПК без их повреждения. Этот состав МКПК затем вводится, как правило, инъекционным путем с помощью катетера, в полость матки пациентки. В соответствии с изобретением, по прошествии 20-72 ч, наиболее предпочтительно 24 ч, один или более эмбрионов переносятся в матку для имплантации с це-

люю инициирования беременности. Исследователями данного изобретения было продемонстрировано, что этот метод позволяет организму использовать МКПК в качестве строительных блоков для увеличения толщины слоя эндометрия в матке и, таким образом, уменьшения риска неудачного зачатия.

Важным является то, чтобы МКПК отбирались непосредственно у пациентки в ходе реализации ЭКО, описываемой в данной заявке. Хотя, диапазон данного изобретения предусматривает культивацию части МКПК, взятых у другого индивидуума, а не у пациентки, подвергающейся процедуре переноса эмбрионов в процессе реализации экстракорпорального оплодотворения. В таком случае свежую порцию МКПК, предпочтительно, получают у пациентки, подвергающейся передаче эмбриона с целью воздействия на аутоиммунную реакцию такой пациентки.

Предимплантационная диагностика как эмбрионов, так и репродуктивной системы пациентки, представляют собой еще один аспект данного изобретения. После проведения диагностики пациентки толщина эндометрия, которая обычно может измеряться с помощью ультразвука, предпочтительно должна находиться в диапазоне от 9 до 11 мм в момент переноса эмбриона.

Обычно также проводится постимплантационная диагностика. Например, по прошествии двух недель после осуществления переноса, проводится тестирование с использованием анализа крови на ХГЧ (хорионический гонадотропин человека) с целью определения имплантации одного или более эмбрионов в эндометрий, т.е. проверка результативности процедуры на успешность зачатия, а также другие процедуры, известные в этой области техники. ХГЧ имеет важное значение при диагностике беременности и условий с ней связанных, таких как внематочная беременность, самопроизвольный аборт, трисомии 21, молярная беременность и хориокарцинома.

"Биохимическая беременность" происходит тогда, когда беременность диагностируется вследствие обнаружения ХГЧ в сыворотке или моче пациентки, но которая не развивается в клиническую беременность. Патент США № 4,315,908 [Zer et al.] описывает способ обнаружения ХГЧ в моче с помощью радиоиммунологического анализа. Патент США № 8,163,508 [O'Connor et al.] предоставляет способ и набор инструментов для прогнозирования беременности у пациенток с помощью метода ХГЧ через определение в образце количества изоформы ХГЧ, связанной с ранней беременностью. Такие и другие методы диагностики полезны в границах объема данного изобретения.

В целях осуществления успешного переноса клинические исследователи стремятся выделить те эмбрионы, перенос которых, вероятнее всего, приведет к жизнеспособной беременности. В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение предусматривает морфологическое, генетическое и кинетическое тестирование ооцитов, бластоцист или эмбрионов, полученных от пациентки и подготовленных экстракорпоральным способом. Методы диагностики включают микроскопический физический анализ эмбриона с целью выявления тех эмбрионов, которые развиваются нормальным способом через наблюдение морфологических особенностей эмбриона и его генетического тестирования. С помощью "Преимплантационной генетической диагностики" определяют наличие у эмбриона генетических, структурных и/или хромосомных изменений или отклонений путем проведения анализа полярных телец, бластомеров или трофэктодермы. "Предимплантационный генетический скрининг" включает анализ полярных телец, бластомеров или трофэктодермы эмбрионов в целях обнаружения анеуплоидии, мутации и/или реаранжировки ДНК. В данной области для целей диагностики эмбрионов известны, по крайней мере, три основных метода высвобождения эмбриона и биопсии. Эти методы включают механическое нанесение разреза в зоне пеллюцида эмбриона с помощью специализированного микрохирургического ножа или стеклянной иглы; химического воздействия на часть зоны пеллюцида кислотой, такой как раствор Тироде; а также удаление зоны пеллюцида с помощью лазера, с целью разделения бластоцисты.

В предпочтительном воплощении визуальное наблюдение за эмбрионом с помощью микроскопии (например, микроскоп Nikon Eclipse TE 2000-S) должно демонстрировать определенные физические или морфологические особенности эмбриона непосредственно перед его имплантацией в матку. В соответствии с классификацией [Gardner et al, 1994], включенной в данную заявку, степень зрелости бластоцисты устанавливается в диапазоне II AB-VI AA, на основании чего классифицируется внутриклеточная масса и толщина слоя трофэктодермы. Уровень VI AB представляет самую высокую степень созревания бластоцисты, что соответствует сформированной бластоцисте, которая вылулпается из зоны пеллюцида.

Генетическая диагностика эмбрионов может быть выполнена с помощью любых методов, известных в данной области, таких как традиционный метод бактериальных искусственных хромосом (БИХ) матричной сравнительной геномной гибридизации, и других подобных ему методов. Микроматричный анализ, известный также под названием микрочипный анализ, микроматрица или микрочип, стал широко использоваться для экспрессии генов и других геномных исследований, и предоставляет технические преимущества для БИХ. Микроматрица, как правило, изготавливается путем нанесения или синтеза нуклеиновой кислоты, комплементарной к известным последовательностям в геноме на поверхность. Гибридизация амплифицированной флуоресцентно меченной ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) на чипе позволяет провести оценку всего генома организма или его частей. Патент США № 12/587,406, полностью включенный сюда посредством ссылки, описывает способы экстракорпорального оплодотворения, при которых предимплантационная генетическая диагностика всех 24 хромосом эмбриона при ЭКО, выполняется путем амплификации всего генома и микрочипового анализа полиморфизмов. Такой

метод включает биопсию эмбриона при ЭКО, с целью удаления одной или нескольких клеток, а также извлечения нуклеиновой кислоты из клеток. Выполнение амплификации генома в последующем позволяет собирать генетическую информацию об эмбрионе с целью прогнозирования генетического здоровья эмбриона на основе полученной генетической информации. Этот метод также дает возможность определить кариотип эмбриона. После осуществления анализа эмбрионов, последние сортируются по принципу годности потенциальной имплантации в матку. В различных вариантах осуществления этого метода, при котором производится генетический анализ эмбрионов, на основе генетических предсказаний отбирается один или более пригодных эмбрионов для имплантации в матку.

Кинетическая диагностика эмбриона является еще одной важной процедурой доступной для отбора наиболее здоровых и пригодных для переноса эмбрионов. Одним из доступных инструментов является цифровая покадровая система мониторинга эмбрионов Primo Vision (Vitrolife AB, г. Гетеборг, Швеция). Primo Vision представляет собой систему, которая состоит из камеры и компьютера, предназначенных для записи изображений эмбрионов, используемых в процессе циклов экстракорпорального оплодотворения, по мере их роста в инкубаторе. Изображения, сделанные камерой, по мере развития эмбрионов в чашке для культивирования, отображаются на экране компьютера в лаборатории. Компьютерная система обеспечивает не только изображения эмбрионов, но и информацию о характере их роста. Эта информация позволяет эмбриологам и врачам наблюдать за здоровым развитием эмбрионов и обнаруживать любые проблемы со сроками деления клеток, которые могут возникнуть на ранних стадиях роста. Дополнительным преимуществом системы Primo Vision является то, что она позволяет производить такие наблюдения без извлечения эмбрионов из инкубатора. Это позволяет эмбрионам оставаться в контролируемой среде, где они имеют тенденцию к более быстрому росту. В соответствии с изобретением, наиболее пригодные эмбрионы, подлежащие отбору в целях переноса, должны отвечать следующим кинетическим критериям: коэффициент времени, равный 5-12 ч, для деления с 2-х клеточной до 3-х клеточной стадии; наличие 3 клеток по прошествии 35-40 ч после стадии зиготы; 5 клеток по прошествии 48-56 ч после стадии зиготы; 8 клеток к началу третьего дня развития. Все клетки должны быть предпочтительно одинакового или как можно более сходного размера, а уровень фрагментации не должен превышать 5-10%.

В соответствии с данным изобретением, ооциты, полученные от пациентки или оплодотворенные ооциты, развившиеся до стадии пригодности эмбриона для переноса, сохраняются в течение периода до момента, когда иммунная система пациентки становится достаточно готовой к принятию эмбриона в целях зачатия, на протяжении периода времени, необходимого для подавления аутоиммунной реакции пациентки. Большинство пациенток, по возможности, желают зачать свое собственное потомство, и, следовательно, хотят использовать свои собственные ооциты или эмбрионы. Поэтому в большинстве распространенных случаев, необходимо сохранять ооциты или эмбрионы конкретной пациентки.

В определенной группе женщин, страдающих бесплодием, пациентка не способная производить яйцеклетки или овулировать, или испытывающая ановуляцию или олигоовуляцию, получает донорскую яйцеклетку(ки) или эмбрион(ны) от другой пациентки в процессе осуществления процедуры экстракорпорального оплодотворения. Таким способом предполагается, что в рамках определенных вариантов осуществления метода изобретения, пациентке переносится эмбрион, который не был получен от нее самой, а был извлечен из другой пациентки, таким образом, что пациентке переносится донорский ооцит или эмбрион в целях инициирования беременности.

Также в пределах границ объема данного изобретения представлены варианты, где яйцеклетки или эмбрионы одного вида переносятся другим видам, которые отличаются от тех, от которых выводятся яйцеклетка или эмбрион. Например, эмбрион от осла может быть имплантирован в матку лошади.

Однако наиболее распространенным требуемым случаем будет оставаться консервация ооцитов или эмбрионов (обычно полученных от самой пациентки, но, возможно, и из другого источника). Консервация может обеспечиваться путем воздействия на яйцеклетки или эмбрионы низкотемпературных условий, например, охлаждения с помощью низких температур, быстрого замораживания и стеклования. В отличие от спермы, которая может замораживаться и успешно использоваться в течение многих лет, яйцеклетки содержат большое количество воды, что затрудняет процесс замораживания. В случае замораживания яйцеклеток у них внутри могут образовываться ледяные кристаллы, способные разрушить клеточную структуру. С целью уменьшения количества кристаллов льда, ученые удаляют некоторое количество воды в процессе медленного замораживания яйцеклетки. Патент США № 10/777,149 описывает способ центрифугирования ооцитов или эмбрионов (например, собак, кошек, свиней, рогатого скота, мышей, крыс и обезьян) с целью поляризации цитоплазматических липидов вне ооцита или эмбриональных клеток, подвергая ооциты или эмбрионы низким температурам в присутствии криопротекторов, что приводит к замораживанию ооцитов или эмбрионов до момента липидной депольаризации, а затем низкотемпературному хранению замороженных ооцитов или эмбрионов. Однако ранее было установлено, что осуществить удаление всей воды невозможно, и, таким образом, формирование внутри- и внеклеточного кристаллов льда не может быть предотвращено путем медленного замораживания. Таким образом, в случае замораживания возможность оплодотворения ооцитов, поддержание жизнеспособности эмбриона и вероятность зачатия с использованием таких медленно замороженных яйцеклеток, является низкой.

Была предпринята попытка быстрого замораживания с использованием криопротекторов. Криопротекторы

тектором является вещество, которое используется для защиты биологических тканей от ущерба, нанесенного в результате замораживания, возникающего вследствие образования льда. Криопротекторы действуют с помощью увеличения концентрации растворенного вещества в клетках. Для того чтобы сохранить биологическую жизнеспособность, криопротекторы должны легко проникать в клетки и не быть к ним токсичными. Обычные криопротекторы являются гликолями, такими как этиленгликоль, пропиленгликоль, глицерин; 2-Метил-2,4-пентандиол (МПД); диметилсульфоксид (ДМСО) и сахароза. Глицерин и ДМСО используются криобиологами на протяжении десятилетий для снижения образования льда в сперме и эмбрионах, которые сохраняются с помощью замораживания в жидком азоте. Было обнаружено, что составы криопротекторов имеют меньшую токсичность и более эффективны, чем однокомпонентные криопротекторы. На протяжении многих лет состав формамида с ДМСО, пропиленгликолем и коллоидом считался наиболее эффективным из всех искусственно созданных криопротекторов. Многие криопротекторы также действуют путем образования водородных связей с биологическими молекулами по мере вытеснения молекул воды. Образование водородных связей в водных растворах важно для правильного функционирования белка и ДНК. Таким образом, по мере того, как криопротекторы замещают молекулы воды, биологический материал сохраняет свою природную физиологическую структуру и функцию, несмотря на то, что они больше не погружаются в водную среду.

В последнее время, процесс стеклования - процесс замораживания и затвердевания без образования кристаллов льда, применяется для сохранения ооцитов и эмбрионов, биологических тканей и органов в целях трансплантации и криоконсервации. Некоторые криопротекторы функционируют путем понижения температуры стеклования раствора или материала. Таким образом, криопротекторы предотвращают фактическое замерзание и раствор сохраняет некоторую гибкость на этапе стеклования. Несмотря на то, что методы медленного и быстрого замораживания являются применимыми, стеклование является предпочтительным способом сохранения ооцитов или эмбрионов в соответствии со способом данного изобретения. В процессе стеклования яйцеклетка или эмбрион замораживается достаточно быстро так, что кристаллы льда не успевают сформироваться. Любой известный способ стеклования может быть использован в пределах способа данного изобретения в целях консервирования и хранения. Как правило, ооцит или эмбрион сначала помещают в резервуар с меньшей концентрацией антифриза наряду с сахарозой с целью извлечения воды из ооцита или эмбриона. Затем ооцит помещается в резервуар с высококонцентрированным антифризом на период, не превышающий одной минуты для немедленного замораживания. Одним из примеров процесса стеклования пригодным к использованию в пределах способа данного изобретения является помещение поддерживаемых эмбрионов в среду MEDICULT® при 37°C, а затем в среду при 22-24°C, с последующим помещением их в криотоп или криолиф контейнере в жидкий азот.

В соответствии с ЭКО методом данного изобретения пациентка считается готовой к переносу эмбриона, когда определяется, что аутоиммунная система пациентки восстановила гормональный баланс. В такой момент криоконсервация яйцеклеток или эмбрионов, полученных в результате ЭКО, прекращается. Происходит удаление ооцита(ов) или эмбриона(ов) из раствора антифриза и их оттаивание. После оттаивания неоплодотворенные яйцеклетки могут быть оплодотворены любым из вышеописанных способов с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, при которых сперма вводится непосредственно в яйцеклетку. Оттаивание эмбриона происходит путем вывода его из жидкого раствора азота, помещения в раствор, имеющей температуру примерно 37°C, промывки при комнатной температуре, обратного помещения его в раствор при 37°C, размещения в питательной среде с последующим помещением в инкубатор, поддерживаемый при температуре, аналогичной внутренней температуры женской полости матки, от 36,8 до 37,2°C на период времени от 5 до 24 ч, наиболее предпочтительно при температуре 37,1°C на срок от 5 до 7 ч.

Конечная стадия метода данного изобретения представляет собой процедуру, посредством которой один или более эмбрионов вводится в организм пациентки с целью инициирования беременности. Эта процедура носит название "переноса эмбрионов" и включает в себя перенос эмбриона в матку, в полость матки или фаллопиевы трубы. Перенос эмбрионов обычно заключается в введении отобранных эмбрионов через шейку матки в полость матки пациентки с использованием маленького мягкого катетера, направляемого с помощью ультразвукового зонда. Как указано выше, в соответствии с методом данного изобретения, эндометрий матки пациентки подготавливают путем введения композиции МКПК в полость матки с помощью соответствующего катетера, предпочтительно, по меньшей мере, за 24 ч до переноса эмбриона. Эмбрион обычно содержится в среде для переноса эмбриона, например среде MediCult®UTM, и может содержать HAS, рекомбинантный человеческий инсулин, гентамицин.

Дополнительным аспектом данного изобретения, является то, что зачатие дополнительно поддерживается путем введения антигенов гистосовместимости, таких как растворимый человеческий лейкоцитарный антиген класса G (pЧЛА-G) в систему, функционирующую по принципу коммуникаторов "свой-чужой", с целью допущения позитивного распознавания и принятия эмбриона иммунной системой женщины. ЧЛА-G, предшественник его растворимой формы, pЧЛА-G, был обнаружен исследователями на предимплантационных эмбрионах и окружающих питательных средах, полученных в ходе исследований ЭКО. Эти открытия предположили, что ЧЛА-G присутствует, начиная с ранних стадий беременности.

Также было выдвинуто предположение о наличии потенциала ЧЛА-G в качестве индикатора качества эмбрионов [Menicucci et al. 1999]. Одно из исследований предполагает, что уровни рЧЛА-G в предимплантационной надосадочной жидкости эмбрионов могут представлять и служить доказательством наличия положительных результатов вероятности инициирования беременности, действуя в качестве полезного индикатора качества эмбрионов, которые могут использоваться в сочетании с морфологическим тестированием критериев отбора эмбрионов для увеличения вероятности осуществления успешного инициирования беременности. В одном из способов осуществления процедуры, рЧЛА-G добавляется в среду переноса эмбриона, с предпочтительным измерением концентрации в среде переноса эмбриона в диапазоне от 0,175 до 0,350 оптической плотности (ОП), где ОП означает оптическую плотность, измеряемую при длине волны в диапазоне от 400 до 450 нм, в частности при длине волны 405 нм. Процедура определения концентрации рЧЛА путем измерения оптической плотности всесторонне описывается в ряде публикаций [см., например, S. Marti et al, 2007]. рЧЛА-G добавляется в среду передачи эмбриона после чего эмбрион культивируется в указанной среде на протяжении от 5 до 20 мин, более предпочтительно на протяжении приблизительно 10 мин, непосредственно перед переносом эмбриона в матку.

Связанным аспектом изобретения является способ выращивания, восстановления, регенерации или любой другой обработки ткани-мишени пациента путем выращивания ткани-мишени в присутствии состава МКПК в соответствии с процедурой, изложенной в данной заявке. Ткань выращивают путем введения в ткань в присутствии культивируемых МКПК или путем культивирования с использованием комбинированного состава свежих и культивированных МКПК. Рассматриваются процессы, выполняемые как в естественных, так экстракорпоральных условиях. Одним из вариантов осуществления такого способа является использование эндометрия матки пациентки в качестве ткани-мишени. Однако в патентах США № 7,795,018 и 8,216,838 [Kuwana et al.], раскрывается, что МКПК признаются мультипотентные клетки, которые значительным способом подходят для трансплантации клеток в целях регенерации органов, в том числе костей, хрящей, скелетных мышц, жира, сердечной мышцы, сосудов, эндотелиаля и нейронов. Таким образом, применение процедуры, питательной среды и состава в соответствии с данным изобретением, включающие совокупность как культивируемых, так и свежих МКПК по данному изобретению, может быть значительно расширено за рамки границ осуществления ЭКО и процедур с эндометрием в заявках, касающихся выращивания, восстановления и регенерации других тканей, подверженных воздействию методов с использованием МКПК.

Здесь следует отметить, что концепция и осуществление данного изобретения являются наиболее значимыми по отношению к пациентам человеческого рода, однако, применимы и к имплантации эмбрионов у самых разнообразных видов животных. Это изобретение не ограничивается экстракорпоральным оплодотворением пациенток-женщин или имплантацией эмбрионов с использованием отсрочки аутоиммунной системы в совокупности с МКПК составами. Например, метод может быть использован в отношении животных, таких как представители семейства мышиных, включая рыжих крыс и домашних мышей; домашних животных, включая собак и кошек; а также домашнего сельскохозяйственного скота, такого как свиньи, лошади, ослы, козы, овцы, ламы и альпаки, в целях повышения живорожденности таких животных. Такое увеличение будет иметь значительные финансовые последствия в животноводческой отрасли, а также социальные последствия в области научных и медицинских исследований и развития.

В то время как изобретение представлено выше во всей полноте, специалисты в данной области техники оценивают, что оно не ограничивается вышеуказанным и включает в себя варианты осуществления, при которых следующие примеры предоставляют дальнейшее описание. Следует понимать, что в пределах границ объема техники изобретения могут вноситься другие специфические функциональные модификации без отхода от объема данного изобретения. Следующие примеры демонстрируют преимущества изобретения с помощью иллюстрации методов и состава изобретения, предназначенных исключительно для демонстрации принципов и способов применения данного изобретения и не рассматриваемых в качестве примеров, ограничивающих его объем.

Примеры

Нижеприведенные примеры иллюстрируют настоящее изобретение. С целью изучения и сопоставления двух процедур ЭКО было проведено исследование. Первая процедура была названа методом "ЭКО с использованием свежих клеток", а вторая процедура получила название метод "ЭКО с использованием замороженных клеток". С целью изучения эффекта частоты наступления беременности у женщин с бесплодием или отсрочкой имплантации эмбриона или бластоцисты в полость матки, после извлечения ооцитов, было проведено статистическое сравнение клинических результатов. Термины "частота наступления беременности", "клиническая частота наступления беременности" и "частота имплантации" используются здесь взаимозаменяемо и относятся к числу клинических беременностей, выраженных по отношению к 100 циклам переноса эмбрионов. Дополнительно проводилось исследование влияния введения внутриматочных моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) на частоту наступления беременности как для процедуры "ЭКО с использованием свежих образцов", так и для процедуры "ЭКО с использованием замороженных образцов".

Участники: Было проведено исследование в общей сложности ста восьмидесяти (180) женщин,

страдающих бесплодием. До момента участия в данном исследовании каждая из пациенток ранее подвергалась двум или более неудачным процедурам "ЭКО с использованием свежих образцов", и, по крайней мере, одной неудачной процедуре "ЭКО с использованием замороженных образцов". Пациентки были разделены на 2 группы по 90 женщин в каждой. Средний возраст женщин в первой группе был $35,5 \pm 3,4$ лет. Средний возраст пациентов во второй группе составил $36,5 \pm 5,5$ лет. В отношении пациенток были проведены следующие подготовительные процедуры.

Процедура ЭКО: к пациентам в обеих группах был применен стандартный протокол ЭКО с использованием ГнВГ (гонадотропин-высвобождающего гормона) с целью контролируемой стимуляции яичников. Период яичниковой стимуляции для каждой пациентки равнялся 10-12 дням. В момент осуществления трансвагинальной пункции средний размер фолликулов при измерении равнялся примерно 18 мм. Для поддержания лютеиновой фазы к пациенткам обеих групп применялись Гонал, Менопур и Хорагон. У каждой пациентки было в среднем отобрано от 10 до 12 яйцеклеток. Не менее 80% полученных ооцитов были достаточно зрелыми для осуществления оплодотворения (этап созревания МП в соответствии с классификацией Гарднера).

После осуществления забора, ооциты культивируются в ЭКО среде Universal (MEDICULT®, которую можно приобрести у ORIGIO A/S Corporation, Дания), обладающей концентрацией CO_2 в диапазоне 5,5-5,7% при температуре $36,8-37,1^\circ\text{C}$. Ооциты затем оплодотворяются как с помощью процедуры ИКСИ, так и традиционной процедуры ЭКО. Метод был выбран с учетом индекса концентрации фертильной спермы, возраста пациентки, опыта предыдущей неудачной попытки применения ЭКО. В случаях применения традиционной процедуры ЭКО, сперматозоиды вводились в ооциты в среде UniIVF. Зиготы, образовавшиеся на следующий день, помещались в среду ISM-1. В тех случаях, когда ооциты получались путем трансвагинальной пункции, они помещались в среду UniIVF. После оплодотворения с помощью процедуры ИКСИ, яйцеклетки немедленно переносились в среду ISM-1. Эмбрионы культивировались в ЭКО среде MEDICULT®Universal в течение первых трех дней с целью дробления эмбриона, а также в среде MEDICULT®BlastAssist во время четвертого и пятого дня культивирования до момента образования бластоцисты. Перенос эмбрионов проводился с использованием среды MEDICULT® UTM.

Витрификация: витрификация применялась к бластоцистам или эмбрионам на 5-й день развития с использованием стандартного метода MEDICULT®. Эмбрионы помещались в указанные растворы с целью удаления как можно большего количества воды. Эмбрионы, содержащиеся в криотоп контейнере, помещались в жидкий азот. В один контейнер помещали не более двух эмбрионов. Замороженные эмбрионы хранились в течение периода от 3 (трех) месяцев до одного года.

Подготовка МКПК: моноклеарные клетки периферической крови (МКПК) были отобраны у каждой пациентки. Первая часть МКПК была отобрана от пациентки в день получения ооцитов в соответствии с протоколами метода "ЭКО с использованием свежих образцов" или тремя днями ранее, чем в срок переноса эмбрионов в матку в соответствии с протоколами "ЭКО с использованием замороженных образцов". Первоначально у каждой пациентки было взято 10 мл периферической крови. Все количество (10 мл) периферической крови смешивалось с 10 мл среды MEDICULT® RPMI 1640 с L-глутамином и бикарбонатом натрия, образуя суммарный объем разбавленной крови, равный 20 мл. С целью выделения МКПК из крови использовалась среда для фракционирования лимфоцитов (градиент плотности среды). Объем разбавленной крови, равный 7 мл, наносился на 3 мл среды градиента плотности. После осуществления такого наложения осуществлялось центрифугирование наложенной крови со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 30-35 мин с целью получения указанных МКПК. Полученные таким образом МКПК промывались дважды в среде RPMI путем центрифугирования в течение 10 мин со скоростью 1600 оборотов в минуту при температуре 4°C . Промытые МКПК переносились в питательную среду. Питательная среда представляла собой состав из среды RPMI 1640 с L-глутамином и бикарбонатом натрия с добавлением хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) и человеческого рекомбинантного альбумина (от Sigma-Aldrich Co, LLC). Условия культивирования поддерживались на уровне 5,0% CO_2 при температуре 37°C . Период культивирования МКПК составлял 48-52 ч. По прошествии 48-52 ч, у той же пациентки отбиралась дополнительная порция цельной крови. С помощью того же метода отбирались дополнительные МКПК. Вторая партия МКПК смешивалась с культивируемыми МКПК и состав переносился в полость матки пациентки с помощью катетера. Процедура проводится на протяжении короткого периода времени, в общей сложности не превышающего 10-15 мин. Объем общего состава МКПК для внутриматочного применения для каждой пациентки находился в диапазоне 0,2-0,3 мл.

Размораживание и перенос эмбрионов: у каждой пациентки отбиралось две бластоцисты с целью осуществления переноса эмбрионов. Размораживание проводилось с использованием стандартного протокола MEDICULT®. Эмбрионы удалялись из жидкого азота и помещались в раствор при температуре 37°C , промывались несколькими растворами при комнатной температуре, заново помещались в раствор при температуре 37°C , а затем помещались в питательную среду в инкубатор при температуре $37,1^\circ\text{C}$ на 6 ч. Эмбрионы культивировались в среде BlastAssist MEDICULT® или на протяжении 3-4 ч после оттаивания. Затем эмбрионы помещались в среду MEDICULT®UTM примерно на 15 мин. Перенос эмбрионов проводился с использованием среды MEDICULT®UTM с помощью медицинских катетеров УЗИ кон-

троля компании Cook®.

Процедура ЭКО: в обеих группах женщин использовался метод ЭКО. Процедура ЭКО, проводимая в отношении 1-й группы женщин, не включала использование МКПК; тогда как процедура ЭКО для 2-й группы проводилась с использованием МКПК. Курс процедур для каждой из групп женщин состоял из двух этапов - цикла "ЭКО с использованием свежих образцов" и цикла "ЭКО с использованием замороженных образцов", как описывается в данной заявке. В день переноса эмбрионов, измеряемая толщина эндометрия находилась в пределах 9-11 мм у обеих групп пациенток. После переноса эмбрионов, всем пациенткам вводился прогестерон, что является стандартным в процессе ЭКО в целях подготовки эндометрия к имплантации эмбриона. Имплантация эмбриона была подтверждена проведенными анализами крови на ХГЧ, проводимыми через две недели после переноса эмбрионов. Клиническая беременность была подтверждена УЗИ через три недели после переноса эмбрионов.

Обе группы женщин проходили один цикл "ЭКО с использованием свежих образцов" с переносом двух бластоцист. Каждая пациентка была исследована на факт беременности. Отсутствие зачатия подтверждалось, когда исследования демонстрировали отсутствие клинической или биохимической беременности. В тех случаях, когда цикл "ЭКО с использованием свежих образцов" не смог привести к успешной имплантации эмбриона, осуществлялся цикл "ЭКО с использованием замороженных образцов", при котором замороженные эмбрионы вводились в полость матки пациентки после периода отсрочки в пределах 2-3 менструальных циклов после осуществления отрицательного цикла "ЭКО с использованием свежих образцов", что примерно равнялось трем (3) месяцам после даты извлечения ооцитов из яичников пациенток.

Женщины в 1-й группе не были подвержены процедурам с использованием МКПК; женщины во 2-й группе подвергались процедурам с использованием МКПК сразу после окончания периода ожидания. В процессе осуществления циклов "ЭКО с использованием свежих образцов", МКПК вводились в матку каждой пациентки на второй день культивирования эмбрионов на 48-52 ч после забора яйцеклеток. В процессе осуществления циклов "ЭКО с использованием замороженных образцов", МКПК вводились в матку примерно за 24 ч до переноса эмбрионов.

Результаты: применение методики без использования МКПК в группе пациенток, прошедших "ЭКО с использованием свежих образцов", привело к уровню имплантации, составляющему 22,2% (20 клинических беременностей после 90 ПЭ). Использование МКПК во время выполнения метода "ЭКО с использованием свежих образцов" привело к увеличению уровня имплантации, составляющему 31,1% (28 клинических беременностей после 90 ПЭ). Применение методики без внутриматочного переноса МКПК в группе пациенток, прошедших "ЭКО с использованием замороженных образцов" (срок отсрочки, по крайней мере, 3 месяца для обеих групп), привело к уровню имплантации равному 21,4% (15 клинических беременностей после 70 ПЭ), в то время как после применения МКПК, уровень имплантации был почти в два раза выше и равнялся 41,9% (26 клинических беременностей после 62 ПЭ). Общий показатель эффективности для группы 1 (90 пациентов без применения МКПК) составил 38,9% (35 клинических беременностей). Общий показатель эффективности для группы 2 (90 пациентов с применением МКПК) составил 60,0% (54 клинические беременности). Клинические результаты данного исследования представлены в нижеприведенной таблице. Сокращение "ПБ" означает "Перенос Эмбрионов".

Уровень имплантации при осуществлении циклов "ЭКО с использованием свежих образцов" и "ЭКО с использованием замороженных образцов", с и без использованием МКПК в отношении пациенток.

	Уровень Клинической Беременности	
	Группа 1 (без применения МКПК)	Группа 2 (с применением МКПК)
«ЭКО с использованием свежих образцов»	22,2% (20 беременностей после 90 ПЭ)	31,1% (28 беременностей после 90 ПЭ)
«ЭКО с использованием замороженных образцов»	21,4% (15 беременностей после 70 ПЭ)	41,9% (26 беременностей после 62 ПЭ)
Всего	38,9% (35 беременностей для 90 пациенток)	60,0% (54 беременности для 90 пациенток)

Таблица демонстрирует повышенную частоту наступления беременности, которая была достигнута

по сравнению с использованием традиционного метода ЭКО путем использования собственных ПКМК пациенток при подготовке матки к переносу эмбрионов. Кроме того доказано, что сочетание отсрочки или методики "ЭКО с использованием замороженных образцов" вместе с подготовкой матки пациентки к зачатию путем введения собственных МКПК пациентки во время процесса экстракорпорального оплодотворения приводит к значительному увеличению частоты наступления беременности у женщин, страдающих от бесплодия по сравнению с ранее известными методами ЭКО, возможно, в результате комбинации процедуры, которая позволяет аутоиммунной системе пациенток восстановить гормональный баланс, а также осуществлять процесс в полости матки, обладающий повышенной способностью к имплантации эмбриона.

Любая ссылка, используемая в данном описании, на "один из вариантов реализации", "вариант реализации", "образцовый вариант реализации" и т.д. означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом реализации, включены в, по крайней мере, один из вариантов реализации изобретения. Использование таких фраз в различных местах описания не обязательно относится к одному и тому же варианту реализации. Кроме того, в случае когда конкретный признак, структура или характеристика описываются в связи с любым из вариантов реализации, утверждается, что они подпадают под компетенцию специалиста в данной области техники с целью реализации такого признака, структуры или характеристики в связи с другими признаками, структурами или характеристиками вариантов реализации.

Несмотря на то, что варианты реализации были описаны со ссылкой на ряд их иллюстративных вариантов реализации, следует понимать, что многочисленные другие модификации и варианты реализации могут быть разработаны специалистами в данной области техники, которые относятся к сути и диапазону принципов данного описания. В частности, возможно внесение различных изменений и модификаций в составные части и/или формы комбинации признаков в пределах диапазона изобретения, чертежи и прилагаемые формулы изобретения. В дополнение к вариантам и модификациям в составных частях и/или формах, альтернативные варианты использования также являются понятными специалистам в данной области техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ экстракорпорального оплодотворения пациентки, включающий следующие этапы:
 - (a) инициирование овуляции у пациентки с целью получения по меньшей мере одного ооцита;
 - (b) забор мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК),
 - (c) введение МКПК в матку пациентки после этапа (a) с отсрочкой, равной по меньшей мере двум менструальным циклам, или двум циклам овуляции указанной пациентки, и
 - (d) введение по меньшей мере одного эмбриона в матку пациентки после этапа (c) для инициирования имплантации эмбриона в матке, причем указанный эмбрион получен путем оплодотворения ооцита, полученного от указанной пациентки на этапе (a).
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение эмбриона в матку происходит в среде для переноса эмбрионов, содержащей вещество, стимулирующее зачатие.
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что пациенткой является женщина, а вещество, стимулирующее зачатие, представляет собой растворимый человеческий лейкоцитарный антиген класса G (pCLA-G) с концентрацией pCLA-G в среде для переноса эмбрионов в пределах 0,175-0,350 ОП, где ОП означает оптическую плотность, измеряемую при длине волны в диапазоне от 400 до 450 нм.
4. Способ по п.3, дополнительно включающий культивирование эмбриона в указанной среде для переноса эмбрионов в пределах от 5 до 20 мин непосредственно перед введением эмбриона в матку.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что пациенткой является женщина, и на этапе (d) эмбрион вводят в матку указанной пациентки через 20-24 ч после этапа (c).
6. Способ экстракорпорального оплодотворения пациентки, включающий следующие этапы:
 - (a) инициирование овуляции у пациентки с целью получения по меньшей мере одного ооцита,
 - (b) извлечение первой порции мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из крови пациентки,
 - (c) культивирование указанной порции МКПК в питательной среде RPMI 1640, содержащей L-глутамин, бикарбонат натрия и рекомбинантный человеческий альбумин,
 - (d) извлечение второй порции МКПК из крови пациентки;
 - (e) объединение первой порции МКПК после культивирования согласно этапу (c) со второй свежей порцией МКПК,
 - (f) введение объединенных порций МКПК в матку пациентки после этапа (a) с отсрочкой, равной по меньшей мере двум менструальным циклам, или двум циклам овуляции указанной пациентки, и
 - (g) введение по меньшей мере одного эмбриона в матку пациентки с целью инициирования имплантации эмбриона в матке, причем указанный эмбрион получен путем оплодотворения ооцита, полученного от указанной пациентки на этапе (a).
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что подходящая питательная среда на этапе (c) дополнительно

содержит хорионический гонадотропин человека (ХГЧ); причем концентрация ХГЧ составляет не менее чем 5 МЕ/мл питательной среды.

8. Способ экстракорпорального оплодотворения пациентки, включающий следующие этапы:

- (а) забор по меньшей мере одного ооцита у пациентки;
- (b) оплодотворение по меньшей мере одного ооцита сперматозоидами с целью формирования зиготы и ее развития экстракорпоральным способом до эмбриональной стадии,
- (с) криогенное замораживание по меньшей мере одного полученного эмбриона,
- (d) ожидание в течение заранее установленной отсрочки, достаточной для уменьшения риска аутоиммунной реакции пациентки, причем заранее установленная отсрочка равна по меньшей мере двум менструальным циклам или двум циклам овуляции указанной пациентки;
- (е) выделение первой порции мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) из крови пациентки за два дня до окончания периода заранее установленной отсрочки на этапе (d),
- (f) культивирование указанной порции МКПК в подходящей питательной среде,
- (g) извлечение второй порции МКПК из крови пациентки в последний день периода ожидания на этапе (d),
- (h) объединение первой порции МКПК после культивирования согласно этапу (f) со второй порцией МКПК,
- (i) введение объединенных порций МКПК в матку пациентки в композиции, содержащей фармацевтически приемлемый наполнитель,
- (j) выведение по меньшей мере одного эмбриона из состояния криогенной заморозки, и
- (k) введение по меньшей мере одного размороженного эмбриона в матку пациентки с целью иницирования беременности.

9. Способ по п.8, отличающийся тем, что криогенное замораживание по меньшей мере одного эмбриона производят методом витрификации.

10. Способ по п.8, дополнительно включающий этап осуществления генетического тестирования по меньшей мере одного эмбриона до момента его введения в матку.

11. Способ по п.8, дополнительно включающий этап диагностирования морфологических свойств эмбриона до момента его введения в матку после этапа (j).

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что введение эмбриона в матку осуществляют на этапе бластоцистной зрелости в пределах II АВ-V АА в соответствии с классификацией по Гарднеру.

13. Способ по п.8, дополнительно включающий этап измерения толщины эндометрия матки пациентки при том, что толщина эндометрия в момент введения эмбриона находится в пределах 9-11 мм.

14. Способ по п.8, отличающийся тем, что порцию МКПК на этапе (f) культивируют в 4,8-6,0% растворе двуокси углерода (CO₂) при температуре 36,7-37,3°C, в питательной среде RPMI 1640, содержащей L-глутамин, бикарбонат натрия, рекомбинантный человеческий альбумин и хорионический гонадотропин человека (ХГЧ); причем минимальная концентрация ХГЧ в питательной среде составляет не менее чем 5 МЕ/мл.

15. Способ по п.8, отличающийся тем, что первую порцию МКПК культивируют на этапе (f) в течение 48-72 ч.

16. Способ по п.8, отличающийся тем, что концентрация МКПК в композиции этапа (i) находится в пределах 4-8 миллионов клеток на миллилитр указанной композиции.

17. Способ по п.8, отличающийся тем, что объем композиции, вводимой в матку на этапе (i) находится в пределах от 0,1 до 0,3 мл.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
