



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 365 343**

② Número de solicitud: 200902193

⑤ Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **19.11.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**30.09.2011**

① Solicitante/s: **Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III Melchor Fernández Almagro, 3 28029 Madrid, ES Universidad Autónoma de Madrid y Fundación IVI**

② Inventor/es: **Sánchez Madrid, Francisco; Yáñez Mó, María; Domínguez Hernández, Francisco y Simón Vallés, Carlos**

④ Agente: **Arias Sanz, Juan**

⑤ Título: **Uso de CD98 como marcador de receptividad endometrial.**

⑦ Resumen:

Uso de CD98 como marcador de receptividad endometrial.

La invención se relaciona con el uso de CD98 como marcador de receptividad endometrial lo que permite el desarrollo de métodos para determinar el momento óptimo para que tenga lugar la implantación del blastocisto basados en la determinación del nivel de expresión de CD98 en el tejido endometrial a lo largo del ciclo. La invención se refiere también a métodos para aumentar la receptividad del endometrio basados en el aumento de los niveles de CD98 así como a composiciones anticonceptivas basadas en el uso de inhibidores de CD98.

ES 2 365 343 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de CD98 como marcador de receptividad endometrial.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con la identificación de marcadores adecuados para determinar el estado de receptividad del endometrio así el uso de dichos marcadores y de inhibidores de los mismos para modular la receptividad del endometrio a la implantación del blastocisto.

10

**Antecedentes de la invención**

La receptividad endometrial es un periodo autolimitado en el que el epitelio endometrial adquiere un estado oválico funcional y transitorio dependiente de esteroides que permite la adhesión del blastocisto. En seres humanos, el epitelio endometrial luminal adquiere este estado simultáneamente con el desarrollo de decidualización en el compartimento estromal (Popovici, R.M. *et al.* 2000. *Endocrinology* 141:3510-3513), que se debe principalmente a la presencia de progesterona después de la sensibilización apropiada con  $17\beta$ -estradiol. Este periodo, denominado “ventana de implantación”, dura desde los días 4-5 hasta los días 9-10 después de la producción o administración de progesterona. La ventana receptiva en seres humanos está limitada de esta manera a los días 19-24 del ciclo menstrual (Navot, D. *et al.* 1991. *J Clin Endocrinol Metab* 72:408-414).

Para volverse receptivo, el endometrio sufre modificaciones estructurales y bioquímicas inducidas mediante regulación génica específica. Los cambios morfológicos, incluyen modificaciones en la membrana plasmática y el citoesqueleto. Los cambios bioquímicos dependen de una comunicación cruzada entre el endometrio materno y el blastocisto que es esencial para el progreso a través de cada fase de la implantación (Dominguez, F. *et al.* 2005. *FASEB J* 19:1056-1060). El conocimiento de las bases moleculares de la receptividad endometrial es fundamental para el entendimiento de la reproducción humana.

La implantación embrionaria implica los pasos secuenciales de aposición, unión e invasión (Dominguez, F. *et al.* 2005. *FASEB J* 19:1056-1060). Similar a la situación con los leucocitos durante la extravasación, la primera interacción parece basarse en ligandos de hidrato de carbono de L-selectina expresada en el epitelio luminal en el periodo de implantación. Sin embargo, ratones deficientes en L-selectina no tienen problemas de fertilidad (Robinson, S .D. *et al.* 1999. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11452-11457). Además de L-selectina, las moléculas de adhesión celular mejor caracterizadas en la superficie luminal del endometrio son la integrina  $\alpha v\beta 3$  y su ligando osteopontina, que se ha encontrado repetidamente en estudios genómicos de endometrio receptivo humano. Los estudios con ratones deficientes revelan un papel crucial para la integrina  $\beta 1$  en la implantación, pero la deficiencia de varias subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ó  $\alpha v$ ) no produce fenotipo de implantación.

La receptividad endometrial probablemente no está determinada exclusivamente por la expresión de moléculas de adhesión selectivas, y también es probable que sean importantes una serie de reorganizaciones en el citoesqueleto. Los pinópodos endometriales son estructuras dependientes de hormonas que aparecen en el periodo de implantación en la membrana apical del endometrio epitelial y representan sitios de unión preferente de blastocistos. Las microvellosidades y estructuras adhesivas especializadas tales como estructuras endoteliales de acoplamiento están enriquecidas en microdominios de tetraspaninas.

A pesar de que se han descrito muchos marcadores bioquímicos para determinar la receptividad endometrial (Giudice, L. C. 1999. *Hum Reprod* 14 Suppl 2:3-16; Achache, H *et al.*; *Human Reproduction Update*, 2006; 12:731-46, Thomas, K *et al.*; *Fértil. Steril.* 2003; 80:502-507; WO03062832), existe la necesidad de encontrar un marcador efectivo que tenga aplicación en clínica y que se exprese exclusivamente durante la ventana de implantación.

55 **Compendio de la invención**

En un primer aspecto, la invención se relaciona con el uso de CD98 como marcador de receptividad del endometrio para la implantación del embrión.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar la ventana temporal para la implantación del embrión en un animal hembra que comprende determinar el nivel de CD98 en una muestra de endometrio de dicho animal, en donde dicha ventana se selecciona en el momento en que el nivel de CD98 en dicha muestra sea elevado en relación con una muestra de referencia.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agente activador de CD98 o de CD9 para la preparación de un medicamento para aumentar la receptividad del endometrio durante la implantación del embrión.

## ES 2 365 343 A1

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de compuestos capaces de aumentar la receptividad del endometrio que comprende

- 5 (i) poner en contacto una célula seleccionada del grupo de
- a. una célula que expresa CD98 o CD9 y
- 10 b. una célula que comprende una construcción génica que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98 o al promotor de CD9,

con un compuesto candidato y

- 15 (ii) determinar el nivel de CD98, de CD9 o del gen reportero en dicha célula.

en donde el compuesto se considera adecuado para aumentar la receptividad del endometrio si provoca un aumento en el nivel de expresión de CD98, de CD9 o del gen reportero.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para la identificación de compuestos anticonceptivos que comprende

- (i) poner en contacto una célula seleccionada del grupo de
- 25 a. una célula que expresa CD98 o CD9 y
- b. una célula que comprende una construcción génica que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98 o al promotor de CD9,

30 con un compuesto candidato y

- (ii) determinar los niveles de CD98, CD9 o del gen reportero en dicha célula

35 en donde el compuesto se considera adecuado como compuesto anticonceptivo si provoca una disminución en el nivel de CD98, de CD9 o del gen reportero.

En un último aspecto, la invención se relaciona con un método anticonceptivo que comprende la administración a un sujeto de un inhibidor de CD98.

### 40 Breve descripción de las figuras

45 La Figura 1 describe la localización de CD98 en microdominios enriquecidos en tetraspaninas en la superficie apical de células endometriales humanas. (A) Análisis confocal de la expresión de moléculas de adhesión en cultivos de células epiteliales endometriales primarias humanas polarizadas. Las secciones verticales se obtuvieron con software confocal de Leica (LASAF). (B) Monocapas confluentes de EEC se tiñeron doblemente para las moléculas indicadas y se analizaron mediante microscopía confocal. El análisis de la colocalización se muestra en el histograma de puntos de las intensidades de fluorescencia en ambos canales. (C) Se Usaron monocapas de EEC confluentes en tampón que contenía Brij 96 al 1% y los Usados se inmunoprecipitaron con los mAb anti-CD9 (VJ1/20), anti-ICAM-1 (HU5/3) o anti-CD147 (VJ1/9), o suero anti-CD98. Se incluyó Ig no inmune como control negativo. Las membranas se probaron para CD9 (VJ1/20) y CD98.

50 La Figura 2 describe el análisis por PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de CD147, CD98 e ICAM-1 a lo largo del ciclo menstrual. Se distribuyeron las biopsias endometriales en cinco grupos según la fase del ciclo: grupo 1, proliferativa temprana media (días 1-8); grupo 2, proliferativa tardía (días 9-14); grupo 3, secretora temprana (días 15-18); grupo 4, secretora media (días 19-22) y grupo 5, secretora tardía (días 23-28). Los datos se presentan como un valor medio relativo  $\pm$  EEM de tres experimentos normalizados al valor medio de los genes de la beta-actina y GAPDH en cada fase designada el ciclo menstrual.

55 La Figura 3 describe la inducción de CD98 en la ventana de implantación en el endometrio humano. (A) Inmunolocalización de CD9, ICAM-1 y CD147 en endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual. Las micrografías muestran tinciones inmunohistoquímicas representativas de muestras del grupo 4 (día 20), correspondientes a la ventana de implantación. Las gráficas representan la expresión basada en análisis semicuantitativos de tinción a lo largo del ciclo menstrual en tres muestras endometriales por grupo. Se observa tinción fuerte para ICAM-1 a lo largo del ciclo menstrual en glándulas epiteliales (■) y estroma (▲), mientras que la tinción de CD9 se observa sólo en epitelio glandular (■) y luminal (◆). CD147 mostró fuerte tinción estromal de endometrio secretor temprano y medio, y también tinción moderada de epitelio glandular y luminal en la fase secretora media. Se analizó la intensidad del la tinción semicuantitativamente (ver Métodos), y se designó como sigue: negativa = 0; débilmente positiva = 1; moderadamente positiva = 2 y fuertemente positiva = 3. Los puntos indican las intensidades relativas medias de señales

puntuadas independientemente por tres observadores a ciegas. (B) Inmunolocalización de CD98 en endometrio humano a lo largo del ciclo menstrual. Las micrografías muestran los cinco grupos del ciclo menstrual en secuencia: grupo 1 = día 5, grupo 2 = día 9, grupo 3 = día 15, grupo 4 = día 20 y grupo 5 = día 25. No se detectó virtualmente ninguna señal en endometrio proliferativo temprano-medio, y sólo una tinción ligera en glándulas endometriales en la fase secretora temprana. La gráfica representa la expresión basada en análisis semicuantitativos de las tinciones a lo largo del ciclo menstrual en tres muestras endometriales por grupo, puntuadas y designadas como en (A).

La Figura 4 describe la inducción de la expresión endometrial de CD98 mediante adhesión y hormonas *in vitro*. (A) Análisis de citometría de flujo de la expresión de membrana de CD98, ICAM-1, CD147 y CD9 en células HEC-1-A después de adhesión de esferoides JAR o tratamiento con medio condicionado de JAR durante 24 horas. Los datos son la media  $\pm$  DE de intensidad media de fluorescencia (MFI) normalizada a células sin tratar en dos experimentos independientes. (B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de membrana de CD98, ICAM-1, CD147 y CD9 en células EEC después del tratamiento durante 48 horas con hCG (100 U/ml),  $\beta$ -estradiol (30 nM), progesterona (1  $\mu$ M) o  $\beta$ -estradiol más progesterona. Los datos son la media  $\pm$  DE de MFI normalizada a células sin tratar en dos experimentos independientes. (C) Inmunotransferencia de la expresión de CD98 en lisados totales de células de HEC-1-A o EEC después de exposición a hCG (100 U/ml) durante 48 horas. Se muestra la expresión de  $\alpha$ -tubulina como control de carga. (D) Análisis por inmunotransferencia de la expresión de CD98 en lisados totales de EEC primarias después del tratamiento durante 48 horas con  $\beta$ -estradiol (30 nM), progesterona (1  $\mu$ M) o  $\beta$ -estradiol más progesterona. Se muestra la expresión de GADPH como control de carga. (E) Se dejaron adherir blastocistos de ratón a monocapas de HEC-1-A confluentes y las células se fijaron y tiñeron para CD98 (panel superior izquierdo), y se analizaron mediante microscopía confocal. Los núcleos se marcaron con Hoechst (panel superior derecho). Se muestran una imagen en pseudocolor de la intensidad de tinción de CD98 (panel inferior izquierdo) y una imagen de contraste de fase. Barra: 50  $\mu$ m.

La Figura 5 muestra que la sobreexpresión de CD9, CD147 o CD98 aumenta la receptividad de las células HEC-1-A mientras que el silenciamiento de CD98 resulta en una inhibición de la adhesión. (A) Las células HEC-1-A se transfectaron transitoriamente con versiones de CD4, CD147, ICAM-1 o CD9 con etiqueta GFP en experimentos independientes. Se analizó la adhesión de blastocistos de ratón a las células transfectadas después del co-cultivo durante 24 horas. Los datos son medias  $\pm$  DE de cuatro experimentos independientes, expresados relativos a la tasa de adhesión en células no transfectadas en cada experimento. El número total de blastocistos evaluado en cada condición fueron, CD4 n=91, CD147 n=149, CD9 n=169 e ICAM-1 n=106. \*  $p < 0,02$  (prueba t de Student) comparado con el correspondiente experimento control con células sin transfectar. (B) Se infectaron células HEC-1-A con lentivirus que codificaban GFP, CD98 más GFP. Tres días después de la infección las monocapas de HEC-1-A infectadas se co-cultivaron con blastocistos de ratón y se cuantificó la adhesión después de 24 horas. Los datos son medias  $\pm$  DE de dos experimentos independientes realizados en triplicado. El número total de blastocistos evaluados fue, sin infectar n=50, GFP n=61 y CD98 n=56. \*  $p < 0,02$  (prueba t de Student) frente a células no infectadas. (C) Se infectaron HEC-1-A con lentivirus que codificaban GFP, CD98 más GFP, o un shRNA específico frente a CD98 más GFP. Tres días tras la infección, las monocapas de células HEC-1-A infectadas se cultivaron con blastocistos de ratón y se determinó la adhesión tras 48 h. Se muestran los medias  $\pm$  DS de un experimento realizado por cuadruplicado. El número total de blastocistos que se cuantificaron fue de n=40 (no infectados), n= 39 (GFP), n=31 (CD98) y n=64 (shRNA específico frente a CD98). \*\*  $p < 0.005$  (test de la t de Student) frente GFP.

### Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han observado cómo la expresión de CD98 en el endometrio se encuentra restringida a la ventana de implantación. Así, tal y como se ilustra en el ejemplo 3, la expresión de CD98 está estrictamente restringida a la ventana de implantación. Por otro lado, en el ejemplo 4 de la presente invención, se describe cómo CD98 se localiza en la superficie apical de las células epiteliales, lo que es consistente con un papel de CD98 en la adhesión de blastocistos. De esta forma, es posible identificar la ventana de implantación en un animal hembra mediante la determinación de la expresión de CD98 en el endometrio a lo largo del ciclo menstrual.

#### *CD98 como marcador de receptividad endometrial*

Así, en un primer aspecto, la invención se relaciona con el uso de CD98 como marcador de receptividad del endometrio para la implantación del embrión.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante primer método de la invención) para seleccionar la ventana temporal para la implantación del embrión en un animal hembra que comprende determinar el nivel de expresión de CD98 en una muestra de endometrio de dicho animal, en donde dicha ventana corresponde al momento en que la expresión de CD98 en dicha muestra es elevado en relación con una muestra de referencia.

Por "método para seleccionar", según se usa aquí, se refiere a métodos de determinar la probabilidad de que un animal hembra se encuentre en periodo receptivo para la implantación del embrión. El experto en la materia apreciará que la predicción puede no ser correcta para el 100% de los pacientes en estudio. Sin embargo, la expresión requiere que el método de predicción proporcione resultados correctos para una porción estadísticamente significativa de pacientes. La determinación de si el método de la invención proporciona predicciones estadísticamente significativas puede ser llevado a cabo usando técnicas estadísticas estándar tales como la determinación de los intervalos de confianza,

determinación del valor p, test de la t de Student, test Mann-Whitney tal y como se explica en Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983. Intervalos de confianza adecuados son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%. Los valores p son, preferiblemente, 0.2, 0.1, 0.05.

5

La expresión “ventana temporal para la implantación del embrión”, según se usa en la presente invención, se refiere al momento o intervalo de tiempos a lo largo del ciclo menstrual en el que el endometrio es receptivo a la implantación del embrión. En humanos, la ventana de implantación tiene lugar durante la fase secretora del ciclo menstrual, en concreto, en los días 6-8 tras el aumento de secreción de la hormona luteinizante (LH) y corresponde, por tanto a los días 20 a 24 de un ciclo menstrual ideal de 28 días. Ciclos similares se han descrito en otros mamíferos de forma que el método de la presente invención puede ser adaptado a cualquier animal.

10

El término “animal hembra”, según se entiende en la presente invención, se refiere a cualquier animal mamífero incluyendo, sin limitación, animales pertenecientes al orden Rodentia, (ratones); al orden Logomorpha (conejos), al orden Carnívora, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros), al orden Artiodactyla, tales como bóvidos (vacas) y suidos (cerdos); al orden Perissodactyla, tales como équidos (caballos) y, en particular, al orden Primates, Ceboidea y Simioides (monos) y Antropoides (humanos y simios). Preferiblemente, los mamíferos de la presente invención son humanos.

15

La determinación de la receptividad a la implantación es de particular importancia en técnicas tales como fecundación *in vitro*, transferencia de embriones, transferencia de gametos intrafalopiana, transferencia de embriones tubal, inyección intracitoplásmica de esperma e inseminación intrauterina. La determinación de la receptividad intrauterina también es importante para determinar el momento óptimo para concebir tras las relaciones sexuales en parejas que están intentando concebir de forma natural.

20

El término “CD98”, según se usa en la presente invención, se refiere a una glicoproteína que corresponde a la cadena pesada que forma los distintos heterodímeros responsables del transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática. Un heterodímero del que CD98 actúa como cadena pesada es el que forma parte del transportador de tipo L (LAT-1) y que se conoce también como cadena pesada 4F2 (4F2hc) o familia 3 de transportadores de soluto (*solute carrier family 3* o SLC3A2). El experto en la materia apreciará que es posible usar CD98 de distintas especies dependiendo de la especie en la que se quiera poner en práctica el método de la invención. Así, la invención contempla la determinación del nivel de expresión de CD98 de origen humano, tal y como se define en la base de datos NCBI con número de acceso P08195 (versión de 01 de septiembre de 2009), CD98 de rata (*Rattus norvegicus*) correspondiente a la proteína descrita en NCBI con número de acceso Q794F9 (versión de 1 de septiembre de 2009), CD98 de ratón (*Mus musculus*) correspondiente a la proteína descrita en la base de datos NCBI con número de acceso P10852 (versión de 1 de septiembre de 2009), CD98 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) correspondiente a la proteína descrita en la base de datos NCBI con número de acceso Q7YQK3 (versión de 1 de septiembre de 2009).

30

35

Asimismo, el término CD98 se refiere a variantes funcionalmente equivalentes de CD98. Por “variante funcionalmente equivalente” se entiende todos aquellos péptidos derivados de la secuencia de CD98 mediante modificación, inserción y/o delección de uno o más aminoácidos, siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de las proteínas CD98 mencionadas anteriormente. En concreto, la variante funcionalmente equivalente muestra al menos una función relacionada con la capacidad de promover la adhesión de blastocistos a células del endometrio. Métodos adecuados para determinar la capacidad de CD98 de promover la adhesión de blastocistos a células del endometrio incluye el método descrito en el ejemplo 5 de la presente invención basado en la capacidad de células endometriales transfectadas con CD98 o la variante del mismo de promover la adhesión de blastocistos.

40

45

Variantes adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos 40%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con respecto a las secuencias de CD98 arriba indicadas. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

50

55

Como entiende el experto en la materia, el nivel de expresión de CD98 puede ser determinado midiendo el nivel del ARNm que codifica CD98 o la variante funcionalmente equivalente de la misma o midiendo los niveles de proteína CD98 o de la variante funcionalmente equivalente de la misma.

60

Así, en una forma de realización particular de la invención, los niveles de expresión de CD98 se determinan midiendo los niveles de expresión del ARNm que codifican para la proteína CD98. Para este fin, la muestra biológica se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o célula, para liberar los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar los ácidos nucleicos para análisis adicionales. Los ácidos nucleicos se extraen de la muestra mediante procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente. El ARN se extrae después a partir de muestras congeladas o recientes mediante cualquiera de los métodos típicos en la técnica, por ejemplo Sambrook, J., *et al.*, 2001 Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3ª ed.,

65

## ES 2 365 343 A1

Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3. Preferiblemente, se tiene cuidado para evitar la degradación del ARN durante el proceso de extracción.

La cantidad de ARNm que codifica CD98 en la preparación de ARNm obtenida a partir de la muestra puede ser determinada mediante ensayos de hibridación o de amplificación que incluyen, sin limitación, ensayos de Northern y Southern Blot y reacción en cadena de polimerasa (PCR). Un método para la detección del ARNm específico para CD98 incluye el uso de sondas que son capaces de hibridar específicamente con el ARNm o ADNc de CD98. La sonda puede ser un ADNc de cadena completa o un fragmento del mismo como por ejemplo un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud capaz de hibridar con al ARNm o ADNc diana en condiciones de estrictas. Preferiblemente, la detección del ARNm se lleva tras la amplificación del ADNc obtenido a partir del ARNm usando técnicas de amplificación conocidas tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de polimerasa en tiempo real ("RT-PCR"), reacción en cadena de ligasa ("LCR"), replicación de secuencias auto-sostenida ("3SR") también conocida como amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos ("NASBA"), amplificación Q-B-Replicasa, amplificación por círculo rodante ("RCA"), amplificación mediada por transcripción ("TMA"), amplificación asistida por enlazadores ("LADA"), amplificación por desplazamiento múltiple ("MDA"), amplificación por desplazamiento de la cadena y del invasor ("SDA").

El nivel de expresión de la proteína CD98 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dicha proteína pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a CD98 (o a fragmentos de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dicha proteína CD98, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

La inmunotransferencia se basa en la detección de proteínas previamente separadas mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes e inmovilizadas en una membrana, generalmente nitrocelulosa mediante incubación con un anticuerpo específico y un sistema de revelado (por ejemplo, quimioluminiscencia). El análisis mediante inmunofluorescencia requiere el uso de un anticuerpo específico para la proteína diana para el análisis de la expresión. El ELISA está basado en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con enzimas de modo que los conjugados formados entre el antígeno diana y el anticuerpo marcado dan como resultado la formación de complejos enzimáticamente activos. Puesto que uno de los componentes (el antígeno o el anticuerpo marcado) están inmovilizados sobre un soporte, los complejos antígeno-anticuerpo están inmovilizados sobre el soporte y de esta manera, se pueden detectar mediante la adición de un sustrato que es convertido por la enzima en un producto que es detectable mediante, por ejemplo, espectrofotometría o fluorometría.

Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a CD98 con una afinidad suficientemente elevada como para detectar la cantidad de proteínas diana. Sin embargo se prefiere el uso de un anticuerpo, por ejemplo sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

Por otra parte, la determinación de los niveles de expresión de proteínas se puede llevar a cabo mediante técnicas de inmunohistoquímica bien conocidas en el estado de la técnica. Para llevar a cabo la determinación mediante inmunohistoquímica, la muestra puede ser una muestra fresca, congelada o embebida en parafina y fijada usando un agente protector del tipo de la formalina. Para la determinación inmunohistoquímica, la muestra se tiñe con un anticuerpo específico para CD98 y se determina la frecuencia de células que se han teñido y la intensidad de la tinción. Típicamente, se asigna a la muestra un valor indicativo de la expresión total y que se calcula en función de la frecuencia de células teñidas (valor que varía entre 0 y 4) y de la intensidad en cada una de las células teñidas (valor variable entre 0 y 4). Criterios típicos para asignar valores de expresión a las muestras se han descrito en detalle, por ejemplo, en Handbook of Immunohistochemistry and *In Situ* Hybridization in Human Carcinomas, M. Hayat Ed., 2004, Academic Press. Preferiblemente, la detección inmunohistoquímica se lleva a cabo en paralelo con muestras de células que sirven como marcador positivo y como marcador negativo. También es frecuente usar un control de fondo.

En aquellos casos en los que se desee analizar un elevado número de muestras (por ejemplo, cuando se desea analizar varias muestras de un mismo paciente o muestras de distintos pacientes), es posible la utilización de formatos matriciales y/o procedimientos automatizados. En una forma de realización, es posible el uso de micromatrices de tejidos (tissue microarrays or TMA) que pueden ser obtenidos usando distintas técnicas. Las muestras que forman parte de las micromatrices pueden ser analizadas de distinta manera incluyendo inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, PCR *in situ*, análisis de ARN o de ADN, inspección morfológica y combinaciones de cualquiera de las anteriores.

Métodos para el procesamiento de micromatrices de tejido han sido descritos, por ejemplo, en Kononen, J. *et al.*, (Nat. Med. 1987, 4:844-7). Las micromatrices de tejido se preparan a partir de núcleos cilíndricos de 0,6 a 2 mm de diámetro a partir de muestras de tejido embebidas en parafina y vueltas a embeber en un único bloque receptor. De esta forma, el tejido procedente de múltiples muestras puede ser insertado en un único bloque de parafina.

Por niveles elevados de ARNm o proteína en relación con los niveles de ARNm o proteína en una muestra de referencia se entiende, según la presente invención, un aumento en los niveles de ARNm o proteína de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra aislada del paciente.

Por “muestra de endometrio” se entiende, en el contexto de la presente invención, un conjunto de células obtenidas del endometrio en la que es posible llevar a cabo la detección de CD98. Por “endometrio” se entiende la mucosa que recubre el interior del útero y que está formada por varias capas entre las que se encuentra la capa más próxima al miometrio o lámina basal y la que se encuentra más próxima a la superficie que es la lámina funcional. El endometrio es un epitelio simple prismático con o sin cilios, glándulas y un estroma rico en tejido conjuntivo y altamente vascularizado y cuya función es alojar el blastocisto permitiendo su implantación, es el lugar donde se desarrolla la placenta y presenta alteraciones cíclicas en sus glándulas y vasos sanguíneos durante el ciclo menstrual en preparación para la implantación del embrión humano. El endometrio se caracteriza por presentar alteraciones cíclicas durante el ciclo menstrual (en primates) o durante el ciclo estral (en otros mamíferos) en las que modifica para dar lugar a un tejido altamente vascularizado y glandular. En el caso de que se produzca la implantación del blastocisto, el recubrimiento endometrial que se ha formado durante el ciclo menstrual permanece formando la decidua que es la porción maternal de la placenta. La muestra de tejido endometrial puede ser recogida usando métodos convencionales tales como biopsia, lavados uterinos, legrados uterinos o a partir de fluido menstrual. En el caso de que la muestra sea obtenida mediante biopsia, ésta puede ser de tipo incisional o excisional.

La determinación de los niveles de expresión de CD98 necesita ser correlacionada con el valor de expresión de CD98 en una muestra de referencia. Por “muestra de referencia”, según la presente invención, se entiende una muestra de endometrio obtenida a partir de un animal hembra en el periodo no fértil de dicho animal. Debido a la variabilidad que puede existir entre distintos sujetos en cuanto a la expresión de CD98 en periodo no fértil, la muestra de referencia se obtiene típicamente combinando cantidades iguales de muestras de una población de sujetos. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados. En tales muestras, las concentraciones normales (de referencia) del biomarcador se pueden determinar, por ejemplo proporcionando la concentración media sobre la población de referencia. Al determinar la concentración de referencia del marcador se toman en cuenta varias consideraciones. Entre tales consideraciones están el tipo de muestra implicada (por ejemplo tejido o LCR), la edad, peso, sexo, estado físico general del paciente y similares. Por ejemplo, se toman como grupo de referencia cantidades iguales de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 a preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados según las consideraciones anteriores, por ejemplo de varias categorías de edad.

En una forma preferida de realización, la muestra de referencia se obtiene a partir del endometrio de un animal hembra en el periodo no fértil de dicho animal.

Alternativamente, si se desea obtener una determinación más fiable de la ventana temporal adecuada para la implantación del blastocisto, es preferible efectuar determinaciones de los niveles de CD98 a lo largo de todo el ciclo menstrual. Así, el método de la invención puede ser llevado a cabo mediante la determinación de los niveles de CD98 con una frecuencia diaria, cada dos días, cada tres días, cada 4 días, cada 5 días, cada 6 días, cada 7 días, cada 8 días, cada 9 días etc. de forma que se obtenga el perfil de expresión de CD98 a lo largo de todo el ciclo menstrual. Típicamente, se pueden obtener muestras endometriales en cada uno de los estadios del ciclo menstrual, en concreto, es posible la obtención de muestras en la fase proliferativa (días 1-14 del ciclo o antes del pico de LH), en la fase secretora temprana del ciclo (días 15-19 o días 1 a 5 tras el pico de LH); en la fase secretora intermedia (días 20-24 del ciclo o días 6 a 10 tras el pico de LH) y en fase secretora tardía (días 25-28 o días 11 a 14 tras el pico de LH). De esta forma, la ventana óptima de implantación corresponderá, al intervalo de tiempo en el que los niveles de CD98 sean los más elevados a lo largo del ciclo menstrual.

#### *Métodos para aumentar la receptividad endometrial*

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que la expresión de CD98 o de CD9 en células endometriales se correlaciona positivamente con la receptividad de dichas células la implantación del blastocisto. Así, según se observa en el ejemplo 5 de la presente invención, la sobreexpresión de CD98 o CD9 en líneas celulares de origen endometrial resulta en una mayor adhesividad para células derivadas de trofoblastos y para blastocistos de ratón. De esta forma, es posible el uso de agentes capaces de aumentar la expresión de CD98 o CD9 en el endometrio permitirá aumentar la receptividad del mismo.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un agente activador de CD98 o de CD9 para la preparación de un medicamento para aumentar la receptividad del endometrio durante la implantación del embrión. Alternativamente, la invención se relaciona con un método para aumentar la receptividad del endometrio a la implantación del embrión que comprende la administración de un agente activador de CD98. Alternativamente, la invención se relaciona con un agente activador de CD98 o de CD9 para su uso en el aumento de la receptividad del endometrio durante la implantación del embrión.

## ES 2 365 343 A1

El término “agente activador de CD98”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto que es capaz de provocar un aumento en la actividad de CD98, independientemente de que dicho aumento sea debido a un aumento de la actividad específica del CD98 preexistente o a un aumento en la síntesis en las células endometriales de CD98 o de análogos de CD98 que compartan con éste sustancialmente su función. En una forma preferida de realización, el agente activador de CD98 es un polinucleótido que codifica CD98 o una variante funcionalmente equivalente del mismo.

El término “agente activador de CD9”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto que es capaz de provocar un aumento en la actividad de CD9, independientemente de que dicho aumento sea debido a un aumento de la actividad específica del CD9 preexistente o a un aumento en la síntesis en las células endometriales de CD9 o de análogos de CD9 que compartan con éste sustancialmente su función. En una forma preferida de realización, el agente activador de CD9 es un polinucleótido que codifica CD9 o una variante funcionalmente equivalente del mismo. Aunque se ha descrito que ratones deficientes en CD9 muestran una reducción intensa de la fertilidad debido a defectos en la fusión espermatozoide-óvulo (Le Naour, F. *et al.* 2000. *Science* 287:319-321) la función de CD9 en la implantación se mantiene poco clara. CD9 se expresa en células endometriales humanas, principalmente localizada en la superficie celular del epitelio glandular, pero sus niveles de expresión se mantienen sin cambiar a lo largo del ciclo menstrual (Park, K.R. *et al.* 2000. *Mol Hum Reprod* 6:252-257). CD9 también se expresa en la superficie de trofoblastos extravelllosos y se mostró que era importante para la invasión post-adhesión. En concreto, el tratamiento de blastocistos con anticuerpos anti-CD9 u oligonucleótidos antisentido no tuvo efecto en la adhesión del embrión pero aumentó mucho el número de embriones implantados, pero el papel de CD9 endometrial no se abordó directamente (Liu, W.M. *et al.* 2006. *J Mol Endocrinol* 36:121-130). Por otro lado, se ha descrito su implicación en la fusión del espermatozoide con el óvulo, adhesión celular, motilidad celular y metástasis de tumor (Wynne F. *Reproduction*. 2006, 131:721-32).

El término “polinucleótido”, según se usa en la presente invención, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos y/o deoxiribonucleótidos. El término incluye tanto polinucleótidos de cadena sencilla como de cadena doble, así como polinucleótidos modificados (metilados, protegidos y similares).

Polinucleótidos adecuados para su uso como agentes capaces de inducir la actividad CD98 en células endometriales incluyen, sin limitación, los polinucleótidos descritos en las bases de datos que codifican CD98 de origen humano, como el descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso J02939.1 (versión de 4 de marzo de 2000), CD98 de rata (*Rattus norvegicus*) correspondiente al polinucleótido descrito en GenBank/EMBL con número de acceso U59324 (versión de 4 de marzo de 2000), CD98 de ratón (*Mus musculus*) correspondiente al polinucleótido descrito en GenBank/EMBL con número de acceso X14309 (versión de 18 de abril de 2005), CD98 de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) correspondiente al polinucleótido descrito en GenBank/EMBL con número de acceso AF515773 (versión de 1 de julio de 2003).

Polinucleótidos adecuados para su uso como agentes capaces de inducir la actividad CD9 en células endometriales incluyen, sin limitación, los polinucleótidos descritos en las bases de datos que codifican CD9 de origen humano (número de acceso P21926 en la versión de 2 septiembre de 2009) y que está codificado por el polinucleótido descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso M38690; CD9 de origen bovino (número de acceso P30932 en la versión de 2 septiembre de 2009) y que está codificado por el polinucleótido descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso M81720; CD9 de ratón (*Mus musculus*) (número de acceso P40240 en la versión de 1 septiembre de 2009) y que está codificado por el polinucleótido descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso L08115; CD9 de rata (*Rattus norvegicus*) (número de acceso P40241 en la versión de 1 septiembre de 2009) y que está codificado por el polinucleótido descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso X76489; CD9 de cerdo (*Sus scrofa*) (número de acceso Q8WMQ3 en la versión de 1 septiembre de 2009) y que está codificado por el polinucleótido descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso AY072785 y CD9 de gato (*Felis catus*) (número de acceso P40239 en la versión de 1 septiembre de 2009) y que está codificado por el polinucleótido descrito en la base de datos GenBank/EMBL con número de acceso L35275.

Alternativamente, los agentes capaces de inducir la actividad CD98 y de CD9 incluyen variantes funcionalmente equivalentes de los polinucleótidos definidos anteriormente por medio de sus secuencias específicas. Por “polinucleótido funcionalmente equivalente” se entiende, en el contexto de la presente invención, todos aquellos polinucleótidos capaces de codificar un polipéptido con actividad CD98 o con CD9 y que resultan de los polinucleótidos definidos anteriormente por medio de la inserción, delección o sustitución de uno o varios nucleótidos con respecto a las secuencias definidas anteriormente.

En concreto, la variante funcionalmente equivalente de CD98 muestra al menos una función relacionada con la capacidad de promover la adhesión de blastocistos a células del endometrio. Métodos adecuados para determinar la capacidad de CD98 de promover la adhesión de blastocistos a células del endometrio incluye el método descrito en el ejemplo 5 de la presente invención basado en la capacidad de células endometriales transfectadas con CD98 o la variante del mismo de promover la adhesión de blastocistos.

En concreto, la variante funcionalmente equivalente de CD9 muestra al menos una función relacionada con la capacidad de promover la adhesión de blastocistos a células del endometrio. Métodos adecuados para determinar la capacidad de CD9 de promover la adhesión de blastocistos a células del endometrio incluye el método descrito en el ejemplo 5 de la presente invención basado en la capacidad de células endometriales transfectadas con CD9 o la variante del mismo de promover la adhesión de blastocistos.



Preferiblemente, los polinucleótidos que codifican variantes funcionalmente equivalentes a CD98 o de CD9 de acuerdo con la presente invención son polinucleótidos cuya secuencia les permite hibridar en condiciones altamente restrictivas con los polinucleótidos definidos anteriormente. Condiciones típicas de hibridación altamente restrictivas incluyen la incubación en 6 X SSC (1 X SSC: NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M) y formamida al 40% a 42°C durante 14 horas, seguido de uno o varios ciclos de lavado usando 0,5 X SSC, SDS al 0,1% a 60°C. Alternativamente, condiciones altamente restrictivas incluyen aquellas que comprenden una hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°-55°C en 6XSSC y un lavado final a una temperatura de 68°C en 1-3 X SSC. Las condiciones restrictivas moderadas comprenden la hibridación a una temperatura de aproximadamente 50°C hasta unos 65°C en NaCl 0,2 o 0,3 M, seguida de lavado a aproximadamente 50°C hasta unos 55°C en 0,2X SSC, SDS 0,1% (sulfato de dodecilo y sodio).

Preferiblemente, cuando el agente que es capaz de inducir la actividad CD98 o de CD9 es un polinucleótido, éste se encuentra operativamente asociado a una región reguladora de la expresión. Las secuencias reguladoras de utilidad para la presente invención pueden ser secuencia promotores nucleares o, alternativamente, secuencias potenciadoras (“enhancer”) y/o otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea expresión constante de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos bien conocidos incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), promotor del virus del sarcoma de Rous, y similares. Numerosos otros ejemplos de promotores constitutivos son bien conocidos en la técnica y se pueden emplear en la práctica de la invención. Si desea la expresión controlada de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se debe utilizar un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible está “silencioso”. Mediante “silencioso” se quiere decir que en ausencia de un inductor se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico; en presencia de un inductor, sin embargo, se produce la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. Con frecuencia, se puede controlar el nivel de expresión variando la concentración del inductor. Controlando la expresión, por ejemplo variando la concentración del inductor de modo que un promotor inducible se estimula de forma más fuerte o más débil, se puede afectar la concentración del producto transcrito de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En el caso en el que la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un gen, se puede controlar la cantidad de proteína que se sintetiza. De esta manera, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son: un promotor de estrógeno o andrógeno, un promotor de metalotioneína, o un promotor que responde a ecdisona. Otros ejemplos numerosos son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en la práctica de la invención. Además de los promotores constitutivos e inducibles (que suelen funcionar en una gran variedad de tipos de células o tejidos), se pueden utilizar promotores específicos de tejido para alcanzar expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico específica en células o tejidos. Ejemplos bien conocidos de promotores específicos de tejido incluyen varios promotores específicos de útero y, más en concreto, promotores específicos de endometrio tales como el promotor de uteroglobina.

Los polinucleótidos que codifican CD98 o la variante funcionalmente equivalente del mismo o CD9 o la variante funcionalmente equivalente pueden ser administrados en forma desnuda mediante el uso de microinyección, métodos biobalísticos o electroporación. Alternativamente, la invención contempla la administración de los polinucleótidos formando parte de un vehículo que permita su inserción en las células endometriales. Así, es posible administrar los polinucleótidos de la invención formando parte de liposomas o de cápsulas formadas por polímeros. Alternativamente, es posible el uso de cualquier tipo de vector viral conocido en la técnica tales como vectores adenovirales, poxvirus, vectores lentivirales y vectores basados en virus adenoasociados. A modo ilustrativo, la invención contempla la administración de dichos polinucleótidos al útero mediante el empleo de liposomas que comprenden dichos polinucleótidos tal y como ha sido descrito en la solicitud de patente US2002177547.

#### *Métodos de identificación de compuestos capaces de aumentar o disminuir la receptividad endometrial*

Los autores de la presente invención han puesto de manifiesto que es posible reproducir el proceso de implantación del blastocisto empleando cultivos en monocapa de células de origen endometrial y que existe una relación entre los niveles de expresión de CD98 y de CD9 y la eficiencia de la implantación, lo que permite el desarrollo de métodos para la identificación de compuestos capaces de promover la receptividad del endometrio o de agentes capaces de reducir la receptividad del endometrio (y que serían de utilidad como anticonceptivos), estando dichos métodos basados en la determinación de los niveles de CD98 o CD9 en respuesta a la adición del compuesto que se quiere estudiar.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante, primer método de cribado de la invención) para la identificación de compuestos capaces de aumentar la receptividad del endometrio que comprende

- (i) poner en contacto una célula seleccionada del grupo de
  - a. una célula que expresa CD98 o CD9 y
  - b. una célula que comprenden una construcción génica que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98 o al promotor de CD9,
 con un compuesto candidato y

## ES 2 365 343 A1

(ii) determinar el nivel de CD98, de CD9 o del gen reportero en dicha célula

donde el compuesto se considera adecuado para aumentar la receptividad del endometrio si provoca un aumento en el nivel de expresión de CD98, de CD9 o del gen reportero.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método (en adelante, segundo método de cribado de la invención) para la identificación de compuestos anticonceptivos que comprende

(ii) poner en contacto una célula seleccionada del grupo de

a. una célula que expresa CD98 o CD9 y

b. una célula que comprende una construcción génica que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98 o al promotor de CD9,

con un compuesto candidato y

(iii) determinar los niveles de CD98, CD9 o del gen reportero en dicha célula

donde el compuesto se considera adecuado como compuesto anticonceptivo si provoca una disminución en el nivel de CD98, de CD9 o del gen reportero.

Ambos métodos de cribado de la invención comprenden un primer paso en el que una célula que expresa CD98, CD9 o que comprende una construcción génica que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98 o al promotor de CD9 es puesta en contacto con un compuesto candidato.

En el caso de que al gen marcador de la respuesta al agente candidato sea CD98 o CD9, es necesario usar una célula que exprese dichos genes de forma constitutiva. En una forma preferida de realización la célula usada en la etapa (a) de los métodos descritos anteriormente deriva de una línea celular de origen endometrial, tales como las líneas celulares ECC-1, Ishikawa, KLE, HIESC-2, HIEEC-22, RL95, HEC59, HEC-1-A, HEC-1B, HHUA, AN3CA, SKUT1 y SKUT1B. En una forma preferida de realización, la célula procede de la línea celular endometrial HEC-1-A.

Alternativamente, las células que se emplean en la etapa (i) de los métodos de cribado de la invención son células en las que se ha introducido una construcción que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98 o al promotor de CD9 es puesta en contacto con un compuesto candidato. En este caso, se emplea la expresión del gen reportero como marcador del aumento de la expresión de CD98 o de CD9.

El término "promotor", según se usa en la presente invención, se refiere a una secuencia de ADN que regula la transcripción de un gen particular. Por promotor de CD98 se entiende la región descrita por Yan *et al.* (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 2007, 292:G535-G545) o por Gottesdiener *et al.* (Mol. Cell Biol., 1988, 8:3809-3819), cuyos contenidos se incorporan en la presente invención en su totalidad. Por promotor de CD9 se entiende la región descrita por Le Naour *et al.* (Oncogene, 1996, 13:481-486).

Las construcciones génicas que se emplean en la etapa (i) de los métodos de cribado de la invención incluyen, adicionalmente, un gen reportero que se encuentra operativamente acoplado a las regiones promotoras descritas anteriormente. Genes reporteros que se pueden usar en el contexto de la presente invención incluyen luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP) y variantes de la misma que emiten fluorescencia a distintas longitudes de onda (por ejemplo, DS-Red o proteína fluorescente roja), cloranfenicol acetiltransferasa,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano.

Una vez obtenida la construcción génica que comprende el promotor de CD98 o de CD9 y el gen reportero, ésta debe introducirse en una célula hospedadora. La construcción de ADN se introduce en las células objeto de estudio usando cualquiera de los métodos de transfección conocidos para el experto en la materia (véase secciones 9.1 a 9.5 en Ausubel, F.M. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc; ringbou edition, 2003). En particular, las células se pueden transfectar mediante co-precipitación de ADN con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, polibreno, electroporación, microinyección, fusión mediada por liposomas, lipofección, infección por retrovirus y transfección biobalística.

Las células que comprenden la construcción génica pueden haber sido transfectadas de forma transitoria o de forma estable, para lo cual la transfección de la construcción génica se lleva a cabo simultáneamente con un gen que aporte resistencia a un determinado antibiótico, de forma que se puedan seleccionar aquellas líneas celulares que han incorporado el ADN en el genoma de aquellas líneas celulares en las que el ADN se encuentra en posición extracromosómica. El gen que permite seleccionar las células se puede aportar formando parte del mismo vector que contiene la construcción objeto de la invención o, alternativamente, se puede aportar separadamente mediante co-transfección con un segundo plásmido que contiene dicho gen de resistencia.

Una vez que se dispone de una línea celular adecuada para la realización del ensayo (bien una línea celular que exprese CD98 o CD9 de forma endógena o bien una célula en la que se ha introducido una construcción génica que comprende un gen reportero operativamente acoplado al promotor de CD98 o de CD9), la célula se pone en contacto con un compuesto o preparación cuyo efecto sobre la expresión de CD98, de CD9 o del gen reportero se desee estudiar.

5 Los compuestos que pueden ser ensayados pueden ser cualquier tipo de compuesto incluyendo compuestos de bajo peso molecular o macromoléculas del tipo de proteínas, glúcidos, ácidos nucleicos o lípidos. Por “poner en contacto” una célula con el compuesto candidato se incluye, según la presente invención, cualquier posible forma de llevar el compuesto candidato hasta el interior de la célula que expresa la construcción de ADN.

10 En el caso de que se desee ensayar una librería de compuestos, los métodos descritos anteriormente pueden adaptarse para su uso en placas multipocillo en donde una cantidad determinada de células puede ser sembrada en cada uno de los pocillos para después añadir a cada uno de los pocillos uno o varios miembros de la librería de compuestos. En el caso de que se deseen identificar compuestos a partir de una librería de compuestos combinatoria, la invención

15 permite el cribado de varios miles de compuestos candidatos por día. Así, cada pocillo de una placa multipocillo puede ser usada por cada compuesto candidato o, en el caso de que se deseen ensayar distintos tiempos y concentraciones, es posible usar 5-10 pocillos por cada compuesto candidato. Así, una placa multipocillo puede ser usada para ensayar 96 compuestos candidatos. En el caso de que se empleen placas de 1536 pocillos, es posible realizar un cribaje de 100 a 1500 compuestos en cada placa. Si se analizan varias placas cada día, es posible efectuar cribajes de 6.000, 20.000,

20 50.000 o 100.000 compuestos diarios.

Una librería combinatoria es una colección de compuestos químicos obtenidos mediante síntesis química o biológica mediante la combinación de distintos reactivos que actúan como bloques de construcción. Por ejemplo, en el caso de librerías combinatorias de péptidos, éstas se pueden obtener mediante la combinación de una serie de aminoácidos

25 en todas las posibles alternativas hasta obtener la longitud deseada. Librerías combinatorias que pueden ser usadas en el contexto de la presente invención son ampliamente conocidas e incluyen librerías peptídicas tales como las descritas en la patente en EEUU US5010175, por Furka *et al.* (Int. J. Pept. Prot. Res., 1991, 37:487-493) y por Houghton *et al.*, (Nature, 1991, 354:84-88). Métodos alternativos para generar diversidad química son ampliamente conocidos por el experto e incluyen peptoides (e.g., WO91/19735), péptidos codificados (WO93/20242), biooligómeros aleatorios (WO92/00091), benzodiazepinas (US5288514), diversómeros tales como hidantoinas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs *et al.*, PNAS USA, 90:6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con andamiaje de glucosa (Hirschmann *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánica análoga de librerías de pequeños compuestos (Chen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc., 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho *et al.*, Science, 261:1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell *et al.*, J. Org. Chem., 59:658 (1994)), librerías de ácidos nucleicos (Ausubel, Berger and Sambrook, all *supra*), librerías de péptidos ácidos nucleicos (US5539083), librerías de anticuerpos (see, e.g., Vaughn *et al.*, Nature Biotechnology, 14(3):309-314 (1996) and PCT/US96/10287), librerías de carbohidratos (e.g., Liang *et al.*, Science, 274:1520-1522 (1996) and U.S. Pat. No. 5,593,853) y similares.

30 Así, en caso de que el compuesto candidato sea una molécula de bajo peso molecular, es suficiente con añadir dicha molécula al medio de cultivo. En caso de que el compuesto candidato sea una molécula de alto peso molecular (por ejemplo, polímeros biológicos tales como un ácido nucleico o una proteína), es necesario aportar los medios para que esa molécula pueda acceder al interior celular. En caso de que la molécula candidata sea un ácido nucleico, pueden usarse métodos convencionales para transfección, según se ha descrito anteriormente para la introducción de

45 la construcción de ADN. En caso de que el compuesto candidato sea una proteína, la célula puede ponerse en contacto tanto con la proteína directamente como con el ácido nucleico que la codifica acoplado a elementos que permitan su transcripción/traducción una vez que se encuentren en el interior celular. Para ello, se pueden usar cualquiera de los métodos mencionados anteriormente para permitir su entrada al interior celular. Alternativamente, es posible poner en contacto la célula con una variante de la proteína que se desea estudiar que ha sido modificada con un péptido que sea

50 capaz de promover la translocación de la proteína al interior celular, tales como el péptido Tat derivado de la proteína TAT de HIV-1, la tercera hélice del homeodominio de la proteína Antennapedia de *D. melanogaster*, la proteína VP22 del virus del herpes simplex y oligómeros de arginina (Lindgren, A. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:99-103, Schwarze, S.R. *et al.*, 2000, *Trends Pharmacol. Sci.*, 21:45-48, Lundberg, M *et al.*, 2003, *Mol. Therapy* 8:143-150 y Snyder, E. L. y Dowdy, S. F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393).

55 La invención contempla la posibilidad de que el compuesto a ensayar no se encuentre aislado sino que se aparezca formando parte de una mezcla más o menos compleja bien derivada de una fuente natural o bien formando parte de una biblioteca de compuestos. Ejemplos de bibliotecas de compuestos que pueden ser ensayadas según el método de la presente invención incluyen, sin limitación, bibliotecas de péptidos incluyendo tanto péptidos como análogos peptídicos que comprenden D-amino ácidos o péptidos que comprenden enlaces no peptídicos, bibliotecas de ácidos nucleicos incluyendo ácidos nucleicos con enlaces no fosfodiéster del tipo de fosforotioato o ácidos nucleicos peptídicos, bibliotecas de anticuerpos, de carbohidratos, de compuestos de bajo peso molecular, preferiblemente moléculas orgánicas, de peptidomiméticos, y similares. En el caso de que se use una biblioteca de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, la biblioteca puede haber sido preseleccionada para que contengan

60 compuestos que puedan acceder al interior celular con mayor facilidad. Así, los compuestos de pueden seleccionar en base a determinados parámetros tales como tamaño, lipofilia, hidrofilia, capacidad de formar puentes de hidrógeno.

## ES 2 365 343 A1

En una segunda etapa, los métodos de cribado de la invención incluyen la determinación de los niveles de CD98, de CD9 o del gen reportero según el tipo de célula que haya sido empleada en la etapa (i).

5 En el caso de células que expresan CD98 o CD9, la etapa (ii) del método implica la determinación de los niveles de CD98 o de CD9. Esta determinación puede llevarse a cabo usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente para la determinación de los niveles de ARNm de CD98 o de CD9 o para la determinación de los niveles de proteína de CD98 o CD9. En una forma preferida de realización, la determinación del nivel de CD98 o de CD9 se lleva a cabo mediante citometría de flujo.

10 En caso de que la etapa (i) haya sido llevada a cabo usando células que comprenden una construcción génica que comprende el promotor de CD98 y CD9 acoplado operativamente a un gen reportero, la etapa (ii) implica la determinación de los niveles de dicho gen reportero. Típicamente, los genes reporteros codifican proteínas que presentan actividades enzimáticas que no aparecen de forma endógena en la célula en la que éstos se expresan, por lo que, de forma preferida, la determinación de los niveles del gen reportero se lleva a cabo mediante la determinación de la actividad de la proteína codificada por el gen reportero. Preferiblemente, a la vez que se lleva a cabo la determinación de la actividad del gen reportero en presencia de los compuestos a ensayar, es necesario efectuar determinaciones en paralelo de la actividad transcripcional basal en presencia de únicamente el medio de cultivo y/o del vehículo en el que se encuentra disuelto el compuesto a ensayar o en el que se han preparado los extractos a ensayar. Generalmente, aquellos compuestos o extractos con actividad promotora de la transcripción se manifestarán porque darán valores superiores a 1 de la relación entre actividad transcripcional en presencia del compuesto o del extracto candidato y en presencia de vehículo. Por el contrario, aquellos compuestos o extractos con actividad represora de la transcripción se manifestarán porque darán valores inferiores a 1 de la relación entre actividad transcripcional en presencia del compuesto o del extracto candidato y en presencia de vehículo. Preferiblemente, se considerarán compuestos o extractos activadores de la transcripción, y por tanto potencialmente útiles para promover la implantación de blastocistos en el endometrio, aquellos en los que la relación de actividad del gen reportero sea de al menos 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 o superior. Preferiblemente, se considerarán compuestos o extractos activadores de la transcripción, y por tanto potencialmente como agentes anticonceptivos aquellos en los que la relación de actividad del gen reportero sea de al menos 0.5, 0.4, 0.33, 0.25, 0.20, 0.1, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01 o inferior.

30 El método de detección de la expresión del gen reportero implica la puesta en contacto de las células con un compuesto que puede generar un producto coloreado o fluorescente en presencia del producto codificado por el gen reportero. Así, si la enzima es la fosfatasa alcalina, se pueden usar sustratos cromogénicos del tipo del p-nitrofenil fosfato (p-NPP), 5-bromo-4-cloro 3-indolil fosfato/tetrazolio nitroblue (BCIP/NPT), Fast-Red/naftol-AS-TS fosfato o sustratos fluorogénicos del tipo de 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), 3,6-fluoresceína difosfato (3,6-FDP), Fast Blue BB, Fast Red TR o sales de diazonio de Fast Red Violet LB.

40 Si el gen reportero codifica una peroxidasa, se pueden usar sustratos cromogénicos del tipo de 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilenediamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-amino salicílico, ácido 3-dimetilamino benzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB) o sustratos fluorogénicos del tipo del ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacetico, fenoxazines reducidas y benzotiazines reducidas, incluyendo los reactivos Amplex<sup>®</sup> Red y Amplex UltraRed y los dihidroxantenos reducidos.

45 Si el gen reportero codifica una glucosidasa, se pueden usar sustratos cromogénicos del tipo de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido (o-NPG), p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosido y 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosido (MUG) para la  $\beta$ -D-galactosidasa y sustratos fluorogénicos del tipo de la resorufina beta-D-galactopiranosido, digalactosido de fluoresceína (FDG), diglucurónido de fluoresceína, 4-metilumbeliferil beta-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil beta-D-galactopiranosido y beta-D-galactopiranosido de cumarina. En una forma preferida de realización, el gen reportero codifica para la luciferasa y la detección se efectúa midiendo la luminiscencia emitida por dicha enzima en presencia de ATP. La luminiscencia se determina usando kits comerciales, como por ejemplo, el kit de enhanced luciferase assay (Analytical Luminescence Laboratory, MI).

55 El experto en la materia apreciará que los métodos de cribado de la invención pueden llevarse a cabo en paralelo con un método en el que se usan compuestos como control positivo de activación, es decir, compuestos que se sabe que son capaces de provocar un aumento en la expresión de CD98 y de CD9. De esta manera, compuestos activadores serán aquellos cuyo efecto en la expresión de CD98 o CD9 sea similar o superior al observado en presencia del compuesto activador control. Según se demuestra en el ejemplo 4 de la presente invención, se ha observado que el tratamiento de células de origen endometrial con hCG o  $\beta$ -estradiol es capaz de inducir la expresión de CD98 tanto en líneas células de origen endometrial como en cultivos primarios. Por tanto, es posible el uso de hCG o  $\beta$ -estradiol como controles de activación de expresión de CD98.

65 En caso de que el compuesto candidato se encuentre formando parte de una mezcla de mayor o menor complejidad, el método de la invención comprende adicionalmente una o varias etapas (iii) de fraccionamiento de la mezcla ensayada y la repetición de los pasos (i), (ii) y (iii) con cada una de las fracciones obtenidas hasta que se aísla el compuesto en la mezcla que es adecuado para el tratamiento del problema implantacional. Métodos para el fraccionamiento de compuestos presentes en una mezcla incluyen cromatografía (en capa fina, de gases o de exclusión molecular en gel, de afinidad), cristalización, destilación, filtración, precipitación, sublimación, extracción, evaporación, centrifugación,

espectrometría de masas, adsorción y similares. Alternativamente, los compuestos a ensayar pueden estar formando parte de un extracto obtenido de una fuente natural. La fuente natural puede ser animal, vegetal obtenido de cualquier entorno, incluyendo, sin limitación, extractos de organismos terrestres, aéreos, marinos y similares.

##### 5 *Métodos y composiciones anticonceptivas de la invención*

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método anticonceptivo que comprende la administración a un sujeto de un inhibidor de CD98.

10 Por “anticonceptivo”, según se usa en la presente invención, se entiende un agente capaz de prevenir o reducir la posibilidad de que ocurra la fecundación o el embarazo.

El término “inhibidor de CD98”, según se usa en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto capaz de reducir la actividad de CD98. Inhibidores de CD98 pueden actuar bien bloqueando la interacción de éste con su receptor en la superficie del blastocisto o bien actuando en las células del endometrio provocando una disminución de los niveles de proteína CD98 o del ARNm que codifica CD98. Métodos adecuados para la determinación de aquellos compuestos que son inhibidores de CD98 han sido descritos anteriormente y comprenden tanto los métodos basados en la determinación de los niveles de CD98 o de ARNm que codifica CD98 en células endometriales como aquellos basados en la capacidad de células endometriales de unirse a blastocistos o a trofoblastos y que se describen en el ejemplo 5 de la presente invención. En principio, cualquiera de los modelos *in vitro* y *ex vivo* y sistemas de cultivo para mimetizar las características del endometrio durante la ventana de receptividad endometrial descritos en el estado de la técnica serían de utilidad para la identificación de inhibidores de CD98. A modo ilustrativo, la asignación de un compuestos como inhibidor de CD98 se puede usar usando el modelo descrito por Lindenberg, S. (*Dan Med Bull.* 1991, 38:371-380), el modelo de Simon, C. *et al.* (*J Clin Endocrinol Metab.*, 1999;84:2638-2646) así como los modelos basados en el uso de varias líneas celulares y cultivos, explantes de tejido endometrial u otras aproximaciones, incluyendo intentos para crear un útero *ex vivo* (Bulletti, C. *et al.* 1988. *Fertil Steril* 49:991-996).

A modo ilustrativo, agentes inhibidores de la expresión de CD98 adecuados para su uso en la presente invención son, por ejemplo, cinaropicrina (Cas number 35730-78-0), tal y como ha sido descrito por Cho *et al.* (Biophysical Research Communications, 2004; 313: 954-961), fragmentos solubles de CD98 con capacidad de unirse al receptor de CD98 presente en la superficie de los blastocistos e impedir así la interacción de estos con el CD98 expresado en la membrana del endometrio, anticuerpos anti-CD98 dirigidos específicamente contra epítomos de la proteína esenciales para desempeñar su función, o contra CD98, ácidos nucleicos capaces de provocar el silenciamiento del ARNm que codifica CD98 tales como oligonucleótidos antisentido, ARNs de interferencia (ARNi), ARNs catalíticos y ribozimas específicos, polinucleótidos con actividad “decoy”, es decir, con capacidad para unirse específicamente a un factor (proteico generalmente) importante para la expresión del gen, de manera que la expresión del gen de interés, en este caso CD98 sea inhibida, etc.

##### 40 *Fragmentos solubles de CD98*

Por “fragmento soluble de CD98” se entienden todos aquellos fragmentos procedentes del dominio extracelular de CD98 que, al carecer de región transmembrana, pueden solubilizarse en soluciones acuosas sin necesidad de detergentes. En el caso de CD98 de origen humano, la región extracelular está formada por los aminoácidos 206 a 630. En el caso de las proteínas CD98 de otros mamíferos, la extensión del dominio extracelular puede ser determinada por comparación con la proteína humana mediante alineamiento de secuencias empleando algoritmos ampliamente conocidos para el experto en la materia tales como BLASTP, FASTA o CLUSTALW. Así, fragmentos solubles de CD98 adecuados para su uso como composición anticonceptiva de la invención incluyen fragmentos de al menos 20, al menos 40, al menos 60, al menos 80, al menos 100, al menos 120, al menos 140, al menos 160, al menos 180, al menos 200, al menos 220, al menos 240, al menos 260, al menos 280, al menos 300, al menos 320, al menos 340, al menos 360, al menos 380, al menos 400 o al menos 420 aminoácidos derivados de la región formada por los aminoácidos 206 a 630 del polipéptido indicado en la base de datos NCBI con el número de acceso P08195 (versión de 01 de septiembre de 2009). La determinación de los fragmentos solubles de CD98 capaces de actuar como inhibidores de CD98 puede llevarse mediante el método descrito en el ejemplo 5 de la presente invención y que consiste en poner en contacto una monocapa de células endometriales HEC-1-A transfectadas con CD98 con blastocistos emergentes e identificar que fragmentos de CD98 son capaces de impedir la adhesión de dichos blastocistos a la monocapa.

Los fragmentos solubles de CD98 pueden ser usados tal cual o pueden ser conjugados a una segunda molécula heteróloga que facilita su solubilidad, estabilidad o su purificación. Las secuencias heterólogas pueden estar presentes en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal e incluyen, a modo ilustrativo, regiones constantes de inmunoglobulina (regiones Fc), dominios de multimerización, secuencias señales y etiquetas que permitan su purificación mediante el uso de moléculas con alta afinidad por dichas etiquetas. En el caso de que los fragmentos de CD98 sean conjugados a la región constante de una molécula de inmunoglobulina, esta puede estar formada por los dominios CH2 y CH3 de la IgG1 de origen humano o de otras isoformas de IgG tales IgG2 o IgG4 u otras clases de inmunoglobulina tales como IgM o IgA.

65 La invención también contempla el uso de fragmentos solubles de CD98 modificados por la incorporación de uno o más grupos funcionales tales como restos de polietilenglicol (PEG) para dar lugar a variantes de CD98 PEGiladas. La PEGilación puede llevarse a cabo usando métodos conocidos tales como el método descrito en WO99/55377.

## ES 2 365 343 A1

### *Anticuerpos inhibidores*

Por “anticuerpo inhibidor” se entiende en el contexto de la presente invención todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a CD98 de manera específica e inhibir una o más de las funciones de CD98, preferiblemente las relacionadas con la adhesión. “Anticuerpo inhibidor” es también todo aquel anticuerpo que es capaz de unirse a CD98 de manera específica y bloquear la oligomerización de CD98 o los sitios de unión de CD98 con otras proteínas. Los anticuerpos pueden ser preparados usando cualquiera de los métodos que son conocidos para el experto en la materia, algunos de los cuales han sido citados anteriormente. Una vez identificados anticuerpos con capacidad de unión a CD98, se seleccionarán aquellos capaces de inhibir la actividad de esta proteína usando un ensayo de identificación de agentes inhibidores (véase el ejemplo 5 de la presente invención).

Anticuerpos monoclonales con capacidad de inhibir la actividad de CD98 incluyen, sin limitación, el anticuerpo HBJ127 descrito por Itoh *et al.* (Jpn. J. Cancer Res., 2001, 92:1313-1321).

### 15 *ARNip*

Los ARN de interferencia pequeños o ARNip (siRNA en su denominación en inglés) son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o se puede sintetizar *in vivo* en la célula diana. Típicamente, los ARNip consisten en una cadena doble de ARN de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento post-transcripcional del mensajero diana.

25 Los ARNip pueden ser los llamados shRNA (short hairpin RNA), caracterizados por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región bucle u horquilla. Los shRNAs pueden estar codificados por plásmidos o virus, particularmente retro virus y estar bajo el control de promotores tales como el promotor U6 de la ARN polimerasa III.

30 Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que codifica CD98 o a la secuencia genómica que codifica dicha proteína. Por “sustancialmente homólogos” se entiende que tienen una secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de forma que el ARNip sea capaz de provocar la degradación de éste por interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para provocar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, así como ARNip que contienen distintas modificaciones químicas tales como:

- 35 - ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son distintos a los que aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosfortioato.
- conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo.
- 40 - Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular el extremo 3' mediante la modificación con distintos grupos funcionales del hidroxilo en posición 2'.
- Nucleótidos con azúcares modificados tales como restos O-alkilados en posición 2' tales como 2'-O-metilribose p 2'-O-fluorosibosa.
- 45 - Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alquiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

50 Los ARNip y ARNsh de la invención se pueden obtener usando una serie de técnicas conocidas para el experto en la materia. La región de la secuencia de nucleótidos que se toma como base para diseñar los ARNip no es limitante y puede contener una región de la secuencia codificante (entre el codón de iniciación y el codón de terminación) o, alternativamente, puede contener secuencias de la región no traducida 5' o 3', preferentemente de entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en posición sentido 3' con respecto al codón de iniciación. Una forma de diseñar un ARNip implica la identificación de los motivos AA(N19)TT, en donde N puede ser cualquier nucleótido en la secuencia que codifica CD98, y la selección de aquellos que presenten un alto contenido en G/C. Si no se encuentra dicho motivo, es posible identificar el motivo NA (N21), en donde N puede ser cualquier nucleótido.

60 En una forma preferida de realización, el shRNA está dirigido contra una región de CD98 que comprende la secuencia SEQ ID NO:1. en una forma de realización aún más preferida, el shRNA comprende la secuencia SEQ ID NO:2.

### *Oligonucleótidos antisentido*

65 Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de ácidos nucleicos “antisentido” aislados para inhibir la expresión, por ejemplo inhibiendo la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico que codifica CD98 cuya actividad se desea inhibir. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial de la droga mediante complementariedad de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de inte-

racciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren al rango de técnicas generalmente empleadas en la técnica e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

5 Una construcción antisentido de la presente invención se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en la célula, produce ARN que es complementario a al menos una parte única del ARNm celular que codifica CD98. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda de oligonucleótidos que se genera *ex vivo* y que, cuando se introduce en la célula, produce inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias genómicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas de oligonucleótidos son preferi-  
10 blemente oligonucleótidos modificados, que son resistentes a las nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas, y que son por lo tanto estables *in vivo*. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato (ver también las patentes de EE.UU. Nos. 5176996; 5264564; y 5256775). Adicionalmente, se han revisado las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6:  
15 958-976, 1988; y Stein *et al.*, *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

Respecto al oligonucleótido antisentido, son preferidas las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivadas del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN bien ARN) que son complementarios al ARNm que codifica el polipéptido  
20 diana. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos de ARNm y prevendrán la traducción.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia 5' no traducida hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deberían funcionar de la forma más eficaz para inhibir la traducción. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas de  
25 los ARNm también son eficaces para inhibir la traducción de los ARNMs (Wagner, *Nature* 372: 333, 1994). Por lo tanto, se podrían usar oligonucleótidos complementarios bien a las regiones 5' ó 3' no traducidas, no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de ese ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deberían incluir el complemento del codón de iniciación AUG. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficaces  
30 pero también se podrían usar según la invención. Si están diseñados para hibridar con la región 5', 3' o codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deberían tener al menos seis nucleótidos de longitud y tener preferiblemente menos de alrededor de 100 y más preferiblemente menos de alrededor de 50, 25, 17 ó 10 nucleótidos de longitud.

35 Se prefiere que se realicen primero estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido de inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distinguen entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que esos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con el de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere  
40 que el oligonucleótido control sea aproximadamente de la misma longitud que el oligonucleótido a ensayar y que la secuencia del oligonucleótido difiera de la secuencia antisentido no más de lo que sea necesario para prevenir la hibridación específica al secuencia diana.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de ADN o ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos, de cadena sencilla o de cadena doble. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo  
45 de la base, el grupo del azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a receptores de células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (ver, por ejemplo, Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652, 1987; Publicación de PCT No. WO88/09810), agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido puede estar conjugado a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido  
55 antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye pero no está limitado a arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto semejante a péptido neutro. Tales moléculas se denominan oligómeros ácido nucleico peptídico (ANP) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996, y en Eglom *et al.*, *Nature* 365: 566, 1993.

60 En aún otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto de fosfato modificado. En todavía una forma de realización más, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico.

Mientras que se pueden usar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante del la secuencia  
65 diana de ARNm, también se pueden usar aquellos complementarios a la región transcrita no traducida.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNMs endógenos. Por lo tanto, una aproximación preferida usa una construcción de

## ES 2 365 343 A1

ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II.

De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el cuerpo (ver en general, Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991). En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfólinos antisentido.

### 10 *Enzimas de ADN*

Un aspecto más de la invención se refiere a uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen que codifica la CD98 de la invención. Las enzimas de ADN incorporan algunas de las características mecánicas tanto de las tecnologías de antisentido como de las de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de modo que reconozcan una secuencia diana de ácido nucleico particular, parecido al oligonucleótido antisentido, sin embargo parecido a la ribozima son catalíticas y cortan específicamente el ácido nucleico diana.

### *Ribozimas*

También se pueden usar moléculas de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de un ARNm diana para prevenir la traducción de los ARNms que codifican CD98 cuya actividad se desea inhibir. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar el corte específico de ARN. (Para una revisión, ver, Rossi, *Current Biology* 4: 469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a un ARN diana complementario, seguido por un suceso de corte endonucleolítico. La composición de las moléculas de ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias al ARNm diana, y la bien conocida secuencia responsable del corte del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5093246).

Las ribozimas usadas en las composiciones de la presente invención incluyen las ribozimas de cabeza de martillo, las ARN endorribonucleasa (de aquí en adelante “ribozimas de tipo Cech”) (Zaug *et al.*, *Science* 224:574-578, 1984). Las ribozimas pueden estar compuestas de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y se deberían distribuir a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método preferido de distribución implica usar una construcción de ADN que “codifica” la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte de pol III ó pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros diana endógenos e inhibir la traducción. Puesto que las ribozimas, contrariamente a otras moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular menor para su eficacia.

### *Péptidos inhibidores*

El término “péptido inhibidor”, tal como aquí se utiliza, hace referencia a aquellos péptidos capaces de unirse a CD98 e inhibir su actividad según se ha explicado anteriormente, es decir, impedir que CD98 actúe como receptor de adhesión.

### *Otros compuestos inhibidores de la actividad de CD98*

Otros compuestos con capacidad de inhibición de la expresión de una CD98 incluyen aptámeros y espiegelmeros, que son ácidos nucleicos D o L de cadena sencilla o doble que se unen específicamente a la proteína, lo que resulta en una modificación de la actividad biológica de ésta. Los aptámeros y espiegelmeros tienen una longitud de entre 15 y 80 nucleótidos y, preferiblemente, de entre 20 y 50 nucleótidos.

Los antagonistas de CD98 se pueden usar de forma local o sistémica para su uso como anticonceptivos en la dosis adecuada para permitir el bloqueo de la actividad de CD98. Los compuestos se pueden administrar de forma diaria, semanal durante la totalidad o durante parte del ciclo menstrual, Los compuestos inhibidores de CD98 pueden ser formulados como composiciones de liberación sostenida como, por ejemplo, implantes mensuales, semi-anales y similares.

Preferiblemente, las composiciones anticonceptivas de la invención se formulan de forma adecuada para su aplicación tópica. Formulaciones adecuadas para la administración tópica incluyen supositorios vaginales, dispositivos intrauterinos (DIU), y geles de liberación sostenida. Alternativamente, las composiciones tópicas pueden aplicarse con un aplicador o pueden formularse como recubrimientos de preservativos, diafragmas u otros dispositivos anticonceptivos.

En este caso, las composiciones de la invención pueden formularse conjuntamente o aplicarse conjuntamente con otro tipo de agentes anticonceptivos, lubricantes, espermicidas. Agentes anticonceptivos adecuados para su administración conjunta con las composiciones anticonceptivas de la invención incluyen uno o más de los agentes seleccionados de bloqueantes de la lipoxigenasa, progestinas sintéticas, quinacrina A, levonorgestrel, acetato de medroxiprogesterona, enantato de noretisterona, combinaciones de etinilestradiol y progesteogen, levonorgestrel, etinilestradiol, norgestrel o levonorgestrel, combinaciones de etinilestradiol con enantato de noretisterone o norgestrel.



Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

## Ejemplos

5

### *Materiales y métodos*

#### *Cultivo de células y reactivos*

10 Las células de carcinoma endometrial humano HEC-1-A (HTB-112), las células RL95-2 (CRL-1671) y las células derivadas de trofoblastos JAR (HTB-144) se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; Rockville, MD). Las células HEC-1-A se hicieron crecer en medio McCoy 5A suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%. Las células RL95-2 se hicieron crecer en una mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y medio nutriente F-12K, suplementado con SBF al 10%. Las células JAR se cultivaron en medio RPMI-15 1640 suplementado con SBF al 10%, piruvato de sodio y glucosa. Para obtener esferoides JAR, se tripsinizaron cultivos confluentes, se marcaron con la sonda fluorescente CMAC (derivado clorometilo de aminocumarina) (Invitrogen), y se colocaron  $1-3 \times 10^5$  células en suspensión en una botella cónica de 25 ml rotando a 110 rpm en CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C durante 24-48 horas.

20 Los cultivos de células primarias de células epiteliales endometriales (EEC) humanas se derivaron de biopsias de endometrios humanos como se ha descrito (Bentin-Ley, U. *et al.* 1994. *J Reprod Fertil* 101:327-332). Las muestras se obtuvieron en la fase lútea de pacientes fértiles sometidas a biopsia de endometrio (edades 23-39 años). El  $\beta$ -estradiol, la progesterona y la hCG se adquirieron de Sigma-Aldrich.

#### *Biopsias endometriales*

Las muestras endometriales humanas se obtuvieron para investigación tras el consentimiento escrito de pacientes, y la investigación fue aprobada por el comité de ética médica sobre el uso de sujetos humanos en investigación en el Instituto Valenciano de Infertilidad, y se ajusta a la ley española de Tecnologías de Reproducción Asistida (35/1988). Para investigar la expresión de proteínas *in vivo* de moléculas de adhesión, se obtuvieron muestras endometriales de diferentes fases del ciclo menstrual (ver más adelante) de 15 pacientes (edades 23-39 años). También se obtuvieron biopsias endometriales de 15 pacientes adicionales para el análisis de la expresión génica mediante PCR en tiempo real. Las biopsias endometriales se distribuyeron en cinco grupos según la fase en ciclo: grupo 1, proliferativa temprana-media (días 1-8); grupo 2, proliferativa tardía (días 9-14); grupo 3, secretora temprana (días 15-18); grupo 4, secretora media (días 19-22) y grupo 5, secretora tardía (días 23-28). Se examinaron tres muestras por grupo.

#### *Anticuerpos*

40 Los anticuerpos monoclonales (mAb) usados fueron como sigue: anti-integrina  $\beta 1$  (TS2/16), anti-integrina  $\alpha 1$  (TS2/7), anti-integrina  $\alpha 2$  (TEA1/41), anti-integrina  $\alpha 3$  (VJ1/6), anti-integrina  $\alpha 4$  (HP1/7), anti-integrina  $\alpha 5$  (SAM-1), anti-integrina  $\alpha 6$  (GOH3), anti-integrina  $\alpha v\beta 3$  (8D6), anti-integrina  $\beta 2$  (TS1/18), anti-ICAM-1 (HU5/3), anti-ICAM-2 (CBR-IC2/2), anti-ICAM-3 (HP2/19), anti-VCAM-1 (4B9), anti-CD31 (TP1/15), anti-CD43 (TP1/36), anti-CD44 (HP2/9), anti-CD59 (VJ1/12), anti-MHC-1 (W6.32), anti-E-selectina (TEA2/1), anti-P-selectina (G1), anti-L-selectina (Dreg55), anti-CD15 (MY1), anti-PSGL1(PL1), anti-CD147 (VJ1/9), anti-CD98 (FG1/10), anti-CD9 (VJ1/20), anti-CD81 (1.33.2.2), y anti-CD151 (LIA1/1).

El policlonal de conejo dirigido frente a la cadena pesada anti-CD98 era de Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA).

50

#### *Construcciones de ADN y lentivirus*

Las construcciones CD9 e ICAM-1-GFP se han descrito previamente (Barreiro, O. *et al.* 2005. *Blood* 105:2852-2861). Las construcciones CD4 y CD147-GFP eran del Dr. M. Davis (Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, CA) y el Dr. J. Cao (Departamento de Medicina, Stony Brook, NY), respectivamente. Todas las construcciones lentivirales derivadas del VIH-1 (vector de transferencia pWPXK, construcción auxiliar de empaquetamiento pCMV $\Delta$ 8,74 y vector pMD2G que codifica la proteína de la envoltura) fueron suministradas por el Dr. D. Trono (Escuela Politécnica de Lausana, Suiza). La construcción pWPXL-CD98 dirige la expresión de CD98 humana del promotor EF1 alfa y también contiene un cásete de expresión de GFP. El lentivirus que expresa EGFP es un lentivirus derivado de VIH-1 de tercera generación de pseudotipo VSV en el que la expresión de EGFP está dirigida por el promotor/potenciador temprano del citomegalovirus. Los vectores se produjeron mediante transfección transitoria en células 293T por el método del fosfato de calcio, usando un total de 45  $\mu$ g de ADN de plásmido en una placa de 150 mm. El medio (20 ml) se cambió después de 14 a 16 horas. Después de 24 horas más, se recogió el medio condicionado, se clarificó mediante centrifugación de baja velocidad y se filtró a través de filtros de PVDF de tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m. Se calcularon los títulos virales midiendo las unidades de transducción (UT/ml) y mediante qPCR de los sobrenadantes (partículas/ml), y fueron alrededor de  $10^7$  a  $10^8$  UT/ml y a una relación de 1:100 UT/partícula.

65

## ES 2 365 343 A1

La construcción que comprende el ARNsh específico para CD98 está dirigida contra la secuencia TCGGGA CAGAGAATCTGAA (SEQ ID NO:1) que aparece en el ARNm de CD98. El lentivirus comprende la secuencia TGCTGTTTCAGATTCTCTATGTCCCGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCGGGACAGAGAATCTGAA (SEQ ID NO:2), en donde la región subrayada corresponde a la secuencia diana en el ARNm de CD98.

5

### *Aislamiento de ARN y digestión con DNasa I*

Se extrajo el ARN total de biopsias de endometriales enteras y cultivos de células. Las muestras se recogieron y procesaron en Trizol (Gibco BRL, Madrid, España) según las instrucciones del fabricante. Se trató el ARN total (20  $\mu$ g) durante 30 minutos con 5  $\mu$ l de DNasa I (Clontech, Palo Alto, CA, EE.UU.) a 37°C, seguido por una ronda de extracción con fenol/cloroformo, y otra solamente con cloroformo. El ARN se precipitó después durante la noche a -20°C en 0,1 volúmenes de acetato de sodio 2 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol al 100%. Después de lavar con etanol al 80% el precipitado se disolvió en 20  $\mu$ l de agua sin RNasa. La integridad del ARN se evaluó en un gel de agarosa al 1% (peso/volumen) con isotiocianato de guanidinio. Las concentraciones de ARN se determinaron mediante densidad óptica en un espectrofotómetro GeneQuant II (Pharmacia). La relación de absorbancia 260/280 nm para cada muestra fue entre 1,6 y 1,9.

### *RT-PCR y PCR en tiempo real*

20 El ARN total (1  $\mu$ g) se sometió a transcripción inversa y se amplificó por PCR por medio de un sistema de un solo tampón (Access RT-PCR, Promega). Se separaron alícuotas equivalentes de cada reacción de amplificación en un gel de agarosa al 1,8% (peso/volumen) en tampón TAE 1X y se tiñeron con bromuro de etidio.

25 Para la PCR en tiempo real, el ARN tratado con DNasa I (50 ng) se sometió a transcripción inversa y se amplificó por PCR usando el kit de amplificación en un paso LightCycler-RNA SYBR Green I con un aparato LightCycler (Roche). Se amplificaron beta-actina y GAPDH mediante RT-PCR en todas las muestras de ARN como controles internos de mantenimiento. La cuantificación relativa fue mediante el método de la curva patrón para el colorante SYBR® Green I.

### *Análisis de citometría de flujo*

Se tripsinizaron las líneas celulares endometriales humanas RL95-2 y HEC-1-A, y EEC primarias, se lavaron y se incubaron secuencialmente con los mAb primarios indicados y las IgG de conejo anti-ratón conjugadas con FITC. Las células marcadas se analizaron mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson).

35

### *Inmunofluorescencia y análisis confocal*

Se fijaron EEC confluentes o monocapas de HEC-1-A con paraformaldehído al 2% y se tiñeron con la combinación apropiada de mAb y mAb biotinilados después de bloquear con suero de ratón. Se obtuvieron imágenes confocales con un microscopio confocal de barrido láser Leica TCS-SP5 y se analizaron con el software confocal de procesamiento de imágenes de Leica y Photoshop 7.0 (Adobe Systems).

### *Inmunoprecipitación*

45 Se lisaron monocapas de EEC confluentes en solución salina tamponada con Tris que contenía Brij 96 al 1%, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e inhibidores de proteasas (Complete; Roche Applied Science). Los Usados celulares se inmunoprecipitaron con el anticuerpo indicado acoplado a proteína G-sepharosa. Después de lavar seis veces con tampón de lisis, las proteínas unidas a las bolas de sepharosa se eluyeron hirviendo en tampón de carga, se separaron mediante SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (medio de transferencia Trans-Blot; Bio-Rad).

### *Inmunohistoquímica*

55 La inmunohistoquímica se realizó en secciones endometriales de 3-5  $\mu$ m usando un kit de peroxidasa DAKO LSAB. Brevemente, las secciones se bloquearon con BSA al 4% durante 30 minutos a 37°C y se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos a temperatura ambiente, antes de la incubación (60 minutos, temperatura ambiente) con los anticuerpos primarios. Después de 25 minutos de incubación con el espaciador, se añadió estreptavidina-peroxidasa durante 15 minutos y se añadió la solución de sustrato cromógeno (DAB) durante 5 minutos para teñir los portaobjetos. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. Los portaobjetos se montaron con Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania). Se evaluó la intensidad de la inmunotinción en al menos tres muestras diferentes y se puntuó la expresión como ausente (0), débil (1), moderada (2), o fuerte (3) mediante tres observadores independientes usando el sistema de doble ciego.

### *Transfección e infección de células*

65

El día anterior a la transfección, se tripsinizaron células HEC-1-A, se diluyeron con medio sin antibióticos y se sembraron en placas de 24 pocillos a 5x10<sup>5</sup> células/pocillo. Las células, al 80-90% de confluencia, se transfectaron con ADN de plásmido (0,8  $\mu$ g por pocillo) mezclado en un relación 1:5 con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carls-

bad, CA). Para la infección con lentivirus, los cultivos de HEC-1-A se expandieron el día antes de la infección. Las células se tripsinizaron entonces y se expusieron en suspensión al lentivirus en un relación de 100 MOI antes de plaquear. La adhesión de blastocistos se realizó 24 horas después de la transfección ó 3 días después de la infección.

5

#### *Ensayos de adhesión de blastocistos de ratón*

Se adquirieron ratones hembra de la cepa B6C3F1 (6-8 semanas de edad) de Elevage Janvier (Le Genest, St. Isle, Francia). Se desencadenó el desarrollo sincrónico de folículos mediante administración intraperitoneal de 10 UI de eCG (Sigma-Aldrich) en 100  $\mu$ l de PBS de Dulbecco sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  (pH 7,4), y fue seguido 48 horas después por la administración intraperitoneal de 10 UI de hCG (Sigma-Aldrich) en 100  $\mu$ l de PBS para iniciar la ovulación. Se recogieron los embriones en el día 2 de gestación y se cultivaron durante 3 días en medio S2 (Scandinavia IVF Science, Gotemburgo, Suecia). De forma alternativa, se hicieron superovular ratones hembra híbridos (DBA x C57BL) de 10 semanas mediante inyecciones intraperitoneales de 7,5 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Intervet, 15 Boxmeer, Holanda) seguido 48 horas después por 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Lepori, Farma-Lepori, Barcelona, España).

El mismo día de la inyección de hCG, los ratones hembra se aparearon con ratones macho de la misma cepa. Los blastocistos se recogieron 3,5 días después del coito (dpc) y se cultivaron durante 24 horas en grupos de 20-25 en una gota de 40  $\mu$ l de medio de optimización simple de potasio (KSOM), suplementado con aminoácidos y recubierto con aceite mineral, en una atmósfera humidificada con  $\text{CO}_2$  al 5% a 37°C. Se desecharon los embriones degenerados, y solo se usaron los blastocistos expandidos con una morfología normal. La zona pelúcida no se eliminó artificialmente. Se midió la adhesión de blastocistos de ratón a monocapas de HEC-1-A confluentes mediante un ensayo mecánico: los blastocistos se incubaron durante 24-48 horas sobre monocapas confluentes ( $\text{CO}_2$  al 5% a 37°C). Las placas de 25 incubación se movieron después a lo largo de un camino circular de 3 cm de diámetro a 60 rpm durante alrededor de 10 segundos. Se contaron los embriones que flotaban y los unidos con un microscopio invertido (Nikon Diaphot 300, Nikon Corporation, Tokio, Japón).

#### Ejemplo 1

30

#### *Determinación del perfil de receptores de adhesión de líneas celulares epiteliales endometriales RL95-2 y HEC-1-A y células epiteliales endometriales primarias*

Los experimentos de adhesión con blastocistos de ratón mostraron un fenotipo receptivo pronunciado para las células RL95-2 (81% de adhesión de blastocistos) y un fenotipo no receptivo para las células HEC-1-A (46%); las EEC primarias cultivadas sobre matriz extracelular muestran una receptividad intermedia del 67%. Para validar estas líneas celulares como un modelo adecuado de receptividad endometrial, se analizó la expresión de receptores hormonales mediante RT-PCR en ambas líneas celulares así como en cultivos de células epiteliales endometriales humanas primarias y en endometrio total de biopsias endometriales. De forma similar a las EEC humanas y al endometrio, 40 ambas líneas celulares expresan el receptor de prolactina (PRL-R), receptores de estradiol  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\text{ER}\alpha$  y  $\text{ER}\beta$ ), y ciclooxigenasa-2 (Cox-2). La expresión del receptor de progesterona (PR) faltaba en ambas líneas celulares endometriales, mientras que RL95-2 retenía la expresión del receptor de la hormona lútea (LHR) y el receptor de relaxina (LGR7).

A continuación se analizó la expresión de un conjunto de moléculas de adhesión de la superficie celular mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Tabla 1, todos los cultivos epiteliales endometriales expresaron niveles altos de integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$  que se unen a laminina, niveles intermedios de integrinas  $\alpha 2$  y  $\alpha v\beta 3$ , niveles muy bajos o indetectables de integrinas  $\alpha 1$  y  $\alpha 5$ , y niveles indetectables de integrinas  $\beta 2$  ó  $\alpha 4$ . Las dos líneas celulares mostraron una expresión mayor de integrina  $\alpha 6$  comparadas con células primarias. Además, todos los cultivos endometriales expresaron ICAM-1, CD44, CD59 y las tetraspaninas CD9, CD81 y CD151. Las células fueron negativas para la expresión de los marcadores de leucocitos ICAM-3, CD43 y PSGL-1, y para las moléculas endoteliales VCAM-1 y CD-31. Las células endometriales también fueron negativas para la expresión de selectinas P, E y L. Por el contrario, consistente con su relevancia en receptividad endometrial, se detectaron ligandos de selectina CD15 en la superficie celular tanto de las EEC como de las células receptivas RL95-2, pero no en células HEC-1-A. De todas las moléculas ensayadas, los únicos otros receptores de adhesión que se expresaban más abundantemente en las células RL95-2 fueron CD98 (alrededor de 6 veces más que en HEC-1-A y células EEC) y CD147 (2,8 veces más que en células HEC-1-A y 1,4 veces más que en las EEC).

60

65

## ES 2 365 343 A1

TABLA 1

*Análisis por citometría de flujo de la expresión de moléculas de adhesión celular en células epiteliales endometriales y líneas celulares. Los datos mostrados son medias  $\pm$  D.E. de intensidad media de fluorescencia (MFI) de n=2 para integrinas  $\alpha 4$  y  $\beta 1$ , ICAM-2 y 3; VCAM-1, CD43, selectinas, PSGL-1; n=5 para integrinas  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , ICAM-1, CD15, CD147 y CD98. n=4 para las moléculas restantes. \*  $p < 0,005$  \*\* $p < 0,001$ , ANOVA prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls*

Antígeno	EEC	HEC-1-A	RL95-2
Control negativo	3,2 $\pm$ 0,9	3,6 $\pm$ 1,9	2,2 $\pm$ 0,8
Integrina $\beta 1$	184 $\pm$ 33	170 $\pm$ 44	79 $\pm$ 23* vs EEC y HEC-1-A
Integrina $\alpha 1$	7,8 $\pm$ 3,2	6,3 $\pm$ 2,4	3,7 $\pm$ 0,37
Integrina $\alpha 2$	49 $\pm$ 9	32 $\pm$ 8	21 $\pm$ 6
Integrina $\alpha 3$	46 $\pm$ 15	52 $\pm$ 13	22 $\pm$ 6
Integrina $\alpha 4$	3,8 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,8	5 $\pm$ 1,2
Integrina $\alpha 5$	6,3 $\pm$ 1,2	11 $\pm$ 4	2,3 $\pm$ 0,3
Integrina $\alpha 6$	42 $\pm$ 7	133 $\pm$ 36* vs EEC	100 $\pm$ 29
Integrina $\alpha V\beta 3$	17 $\pm$ 2,4	21 $\pm$ 1,2	11 $\pm$ 3
Integrina $\beta 2$	3,2 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,5
ICAM-1	36 $\pm$ 12	33 $\pm$ 5	11 $\pm$ 0,5
ICAM-2	3,3 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,3
ICAM-3	3 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 1,3	2 $\pm$ 0,5
VCAM-1	3,9 $\pm$ 0,4	5 $\pm$ 0,75	2,7 $\pm$ 0,7
CD31	3,8 $\pm$ 0,3	6 $\pm$ 2,4	2,5 $\pm$ 0,2
CD43	3 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 0,7
CD44	38 $\pm$ 15	19 $\pm$ 8	18 $\pm$ 3
CD59	148 $\pm$ 10	57 $\pm$ 10	41 $\pm$ 5
MHC-I	394 $\pm$ 76	45 $\pm$ 9* vs EEC	59 $\pm$ 4* vs EEC
E-selectina	2,2 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 1,4	1,8 $\pm$ 0,3
P-selectina	2,7 $\pm$ 0,3	4,3 $\pm$ 1,1	1,3 $\pm$ 0,1
L-selectina	2,9 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 1,2	1,8 $\pm$ 0,3
CD15	91 $\pm$ 47	4,5 $\pm$ 0,7	15 $\pm$ 2,3
PSGL-1	3 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 1,2	2 $\pm$ 0,2
CD147	68 $\pm$ 27	36 $\pm$ 8	100 $\pm$ 12* vs EEC y HEC-1-A
CD98	50 $\pm$ 10	54 $\pm$ 11	307 $\pm$ 37** vs EEC y HEC-1-A
CD9	201 $\pm$ 50	157 $\pm$ 44	148 $\pm$ 32
CD81	19 $\pm$ 2,6	109 $\pm$ 13	20,5 $\pm$ 0,5
CD151	32 $\pm$ 3,8	33 $\pm$ 8,6	10,6 $\pm$ 0,9

## Ejemplo 2

*CD98 está polarizada a la superficie apical de células epiteliales endometriales y se asocia con microdominios enriquecidos en tetraspaninas*

5 Con el fin de comprender mejor la función de CD147 y CD98 en adhesión embrionaria, se evaluó primero su localización subcelular en monocapas de EEC primarias polarizadas (confirmado mediante tinción intracelular de E-caderina; Fig. 1A). Al contrario que en células epiteliales intestinales, CD98 está polarizada en la superficie apical del epitelio endometrial, colocalizando en las microvellosidades apicales con tetraspanina CD9 (Fig. 1A, B). ICAM-1 y  
10 CD147 se encontraron tanto en el compartimento apical como el basolateral, y se observó sólo colocalización parcial de CD147 con CD9 (Fig. 1B).

La colocalización de CD98 con CD9 indujo a explorar la posible inserción de CD98 en microdominios enriquecidos en tetraspaninas. El análisis de inmunoprecipitación en condiciones moderadamente restrictivas (Brij 96 al 1%)  
15 mostró una fuerte asociación de ICAM-1 con CD9 en monocapas de células epiteliales endometriales primarias, como se ha descrito previamente para células endoteliales humanas (Barreiro, O *et al.* 2005 *Blood* 105:2852-2861). También se pudo observar una señal más débil para CD98, mientras que no se encontró asociación con CD9 para CD147. El anticuerpo monoclonal anti-CD147 fue capaz de coimmunoprecipitar débilmente CD98, como se había descrito previamente (Xu, D. *et al.* 2005. *Mol Cell Proteomics* 4:1061-1071). Estos resultados sugieren que CD98 forma dos complejos independientes, con CD147 y con tetraspaninas y que la inserción en microdominios enriquecidos  
20 en tetraspaninas podría regular la polaridad de CD98 en tipos de células epiteliales.

## Ejemplo 3

25 *La expresión de CD98 está restringida a la ventana de implantación en endometrio humano*

La localización subcelular en cultivos de EEC *in vitro* sugería una función para CD98 en la adhesión embrionaria. Para examinar esta posibilidad, se analizó la expresión *in vivo* de moléculas de adhesión a lo largo del ciclo menstrual. Se analizó la expresión de ARN mensajero mediante PCR en tiempo real en muestras endometriales humanas (n=15)  
30 divididas en cinco grupos según las fases del ciclo menstrual. La expresión del ARNm de CD147 estaba en su mínimo durante la ventana de implantación (grupo 4 en la Fig. 2). Comparado con esto, la expresión era 4 veces mayor en las fases proliferativas y 7 veces mayor en la fase secretora temprana. Después de la ventana de implantación, la expresión aumentó de nuevo en la fase secretora tardía (grupo 5) más de 10 veces (Fig. 2). La expresión de ICAM-1 mostró poca variación entre los grupos 1, 2 y 4, pero fue 20 veces mayor en el grupo 3 y hasta 55 veces mayor en el grupo 5 (Fig.  
35 2). Los niveles del ARNm de CD98 permanecieron bajos en todas las fases del ciclo menstrual.

En experimentos paralelos, se analizó la expresión de proteínas en tejido endometrial humano mediante inmunohistoquímica. Como se ha descrito previamente, se detectaron ICAM-1, CD9 y CD147 en el endometrio humano (Figura 3A). La tinción de CD9 estaba restringida al epitelio glandular y luminal, sin expresión en el compartimento  
40 estromal. No se observaron diferencias significativas en los diferentes grupos del ciclo menstrual, mostrando CD9 una expresión débil-media que disminuía sólo ligeramente al final de la fase lútea. La tinción de ICAM-1 mostró una expresión muy alta que era máxima en la fase secretora tardía tanto en estroma como en epitelio. CD147 también tiñó tanto células estromales como epiteliales. En células del estroma, la expresión de CD147 aumentó con la progresión del ciclo menstrual, con un máximo en la fase secretora media (grupo 4) (Fig. 3 A), cuando tiene lugar la implantación, y descendiendo ligeramente en la fase secretora tardía (grupo 5). La intensidad de la tinción de CD147 en el epitelio  
45 luminal y glandular varió desde débil a moderadamente positiva a lo largo del ciclo menstrual, con expresión máxima en la ventana de implantación. De forma interesante, el estroma y el epitelio fueron negativos para la expresión de CD98 en las fases tempranas del ciclo menstrual pero, al contrario que la expresión del ARNm, aumentó a moderadamente positivo en la fase secretora media (grupo 4), que corresponde a la ventana de implantación (Fig. 3B). De esta  
50 manera, CD9 y CD147 se dan en el epitelio luminal y su expresión es mayor en el tiempo de máxima receptividad, pero sólo CD98 podría funcionar como señal de receptividad, ya que su expresión es indetectable fuera de la ventana de implantación.

## Ejemplo 4

55 *CD98 se induce in vivo en células epiteliales endometriales cultivadas*

Para mimetizar el proceso de adhesión durante la implantación, se realizaron ensayos de adhesión con cultivos de HEC-1-A y esferoides de trofoblastos JAR fluorescentemente marcados; se analizaron los niveles de expresión de  
60 CD147, CD98, ICAM-1 y CD9 en células HEC-1-A mediante citometría de flujo después de 24 horas de adhesión. La adhesión de esferoides JAR indujo expresión de ICAM-1 y CD98 en la membrana plasmática de células endometriales (Fig. 4A), y se observó la misma inducción usando medio condicionado de JAR. Los niveles de CD9 no cambiaron, mientras que la expresión en membrana de CD147 disminuyó ligeramente.

Se ha mostrado que el medio condicionado de JAR contiene gonadotropina coriónica humana (hCG) (Hussa, R. O *et al.* *J Clin Endocrinol Metab* 40:401-405), y se encontró que el tratamiento con hCG era capaz de inducir la expresión de ICAM-1 y CD98 tanto en células HEC-1-A (Figura 4B) como en EEC primarias (Figura 4B y C). CD98 también se indujo en células endometriales primarias mediante exposición a  $\beta$ -estradiol (Figura 4C y D). El tratamiento con

progesterona no alteró significativamente la expresión en la membrana plasmática de CD98 pero aumentó el efecto del tratamiento con estrógeno (Figura 4C y D). Los niveles de superficie de ICAM-1, CD147 y CD9 no cambiaron significativamente por estas hormonas *in vitro*.

5 A continuación se examinó la localización de CD98 en células endometriales mediante microscopía confocal. Puesto que los esferoides JAR se tiñeron fuertemente para la expresión de CD98, se realizaron estas tinciones con un sistema de adhesión de blastocistos murinos, en el que se deja que blastocistos de ratón se adhieran a células HEC-1-A confluente. Las muestras se tiñeron con anti-CD98 humana para visualizar sólo la CD98 endometrial. La expresión de CD98 aumentó claramente en las células endometriales que estaban en contacto directo con el blastocisto de ratón (Figura 4E). En conjunto, estos datos demuestran la expresión de CD98 paracrino dependiente en células endometriales y la inducción de la molécula por adhesión de blastocistos.

#### Ejemplo 5

15 *La sobreexpresión endometrial de CD98, CD147 o CD9 confiere mayor receptividad a la adhesión de blastocisto de ratón*

Para valorar directamente la función de las diferentes moléculas de adhesión en la adhesión de blastocistos durante la implantación, células de la línea celular endometrial poco adhesiva HEC-1-A se transfectaron transitoriamente con construcciones de CD147, ICAM-1 ó CD9 con GFP como etiqueta; se confirmó la expresión de la proteína exógena mediante citometría de flujo, PCR e inmunotransferencia. Se dejaron adherir blastocistos emergentes de ratón a monocapas endometriales transfectadas y se analizó el número de blastocistos adheridos después de 24 horas. La sobreexpresión de ICAM-1 o el control negativo CD4 no tuvieron efecto significativo en la adhesión de blastocistos. Por el contrario, la sobreexpresión de CD147 o CD9 produjo un aumento significativo en la adhesión de blastocistos (Fig. 5A).

La transfección de HEC-1-A con plásmidos que codifican CD98 con etiqueta myc, si bien aumentaban la expresión del ARNm de CD98, no cambiaban significativamente la expresión de proteína en la membrana plasmática analizada mediante citometría de flujo (no mostrado). Para salvar este problema, se infectaron células con un lentivirus que codifica CD98 humana junto con un indicador de infección GFP; este sistema alcanzó sobreexpresión de CD98 de 2-10 veces en la membrana plasmática de células HEC-1-A. La sobreexpresión lentiviral de CD98 produjo adhesión casi completa de blastocistos de ratón a las 24 horas (Figura 5B).

#### Ejemplo 6

35 *El silenciamiento endometrial de CD98 provoca una disminución en la receptividad a la adhesión de blastocisto de ratón*

Con el fin de determinar si el silenciamiento de CD98 en las células endometriales tiene algún efecto sobre la implantación de los embriones, se infectaron en paralelo células HEC-1-A con lentivirus que codifica CD98 humana junto con un indicador de infección GFP y células HEC-1-A con un lentivirus que codifica para un ARNsh específico para CD98 junto con un indicador de infección GFP. La sobreexpresión lentiviral de CD98 resultó en un aumento de la adhesión de blastocistos tal y como se había demostrado en el ejemplo anterior (Fig. 5B). Sin embargo, la expresión del ARNsh resultó en una inhibición significativa de la adhesión del blastocistos de ratón a las 24 horas (Figura 5C).

Todos estos resultados sugieren que CD98, localizada en los microdominios enriquecidos de tetraspaninas, podría ser un determinante crucial de la receptividad endometrial humana durante la ventana de implantación.

REIVINDICACIONES

1. Uso de CD98 como marcador de receptividad del endometrio para la implantación del embrión.

2. Método para seleccionar la ventana temporal para la implantación del embrión en un animal hembra que comprende determinar el nivel de CD98 en una muestra de endometrio de dicho animal, en donde dicha ventana se selecciona en el momento en que el nivel de CD98 en dicha muestra sea elevado en relación con una muestra de referencia.

3. Método según la reivindicación 2 en donde la muestra de referencia es una muestra de endometrio de un animal hembra obtenida en el periodo no fértil de dicho animal.

4. Método según las reivindicaciones 2 ó 3 en donde la determinación del nivel de CD98 se determina mediante la cuantificación del ARNm que codifica CD98 o mediante la cuantificación de la proteína CD98.

5. Método según la reivindicación 4 en donde la cuantificación del ARNm que codifica CD98 se lleva a cabo mediante RT-PCR.

6. Método según la reivindicación 4 en donde la cuantificación de la proteína CD98 se lleva a cabo mediante inmunohistoquímica.

7. Uso de un agente activador de CD98 para la preparación de un medicamento para aumentar la receptividad del endometrio durante la implantación del embrión, en donde el agente activador de CD98 es un polinucleótido que codifica CD98.

8. Un método para la identificación de compuestos capaces de aumentar la receptividad del endometrio que comprende

(i) poner en contacto una célula seleccionada del grupo de

a. una célula que expresa CD98 y

b. una célula que comprende una construcción génica que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98,

con un compuesto candidato y

(ii) determinar el nivel de CD98 o del gen reportero en dicha célula

en donde el compuesto se considera adecuado para aumentar la receptividad del endometrio si provoca un aumento en el nivel de expresión de CD98 o del gen reportero.

9. Un método para la identificación de compuestos anticonceptivos que comprende

(i) poner en contacto una célula seleccionada del grupo de

a. una célula que expresa CD98 y

b. una célula que comprende una construcción génica que comprende un polinucleótido que codifica un gen reportero en donde dicho polinucleótido se encuentra operativamente acoplado al promotor de CD98,

con un compuesto candidato y

(ii) determinar los niveles de CD98 o del gen reportero en dicha célula

en donde el compuesto se considera adecuado como compuesto anticonceptivo si provoca una disminución en el nivel de CD98 o del gen reportero.

10. Método según las reivindicaciones 8 ó 9 en donde la célula que expresa CD98 es una célula de endometrio o una línea celular de origen endometrial.

11. Método según la reivindicación 10 en donde la célula de endometrio es una célula HEC-1-A.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en donde la determinación del nivel de CD98 se lleva a cabo mediante citometría de flujo.

## ES 2 365 343 A1

13. Uso como anticonceptivo de un inhibidor de CD98 en donde el inhibidor de CD98 se selecciona del grupo de:

(i) un anticuerpo dirigido frente a CD98,

5 (ii) un ácido nucleico capaz de provocar el silenciamiento del ARNm que codifica CD98 y,

(iii) un fragmento soluble de CD98.

10 14. Uso según la reivindicación 13 en donde el ácido nucleico capaz de provocar el silenciamiento del ARNm que codifica CD98 es un shRNA.

15 15. Uso según la reivindicación 14 en donde dicho shRNA está dirigido contra una región de CD98 que comprende la secuencia SEQ ID NO:1.

16. Uso según la reivindicación 15 en donde el shRNA comprende la secuencia SEQ ID NO:2.

20

25

30

35

40

45

50

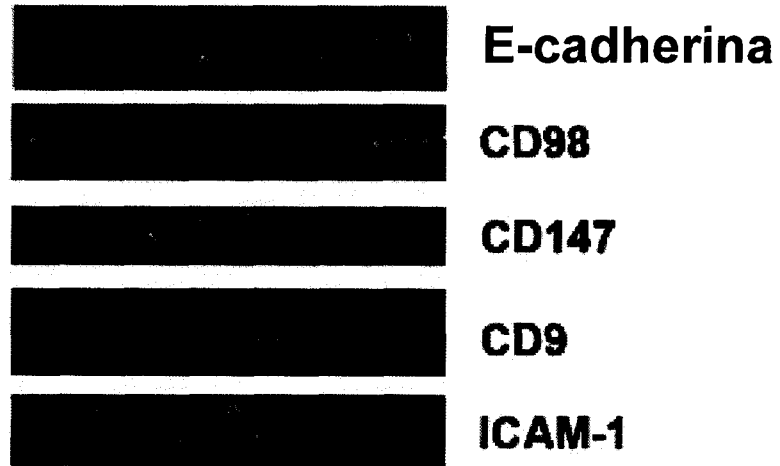
55

60

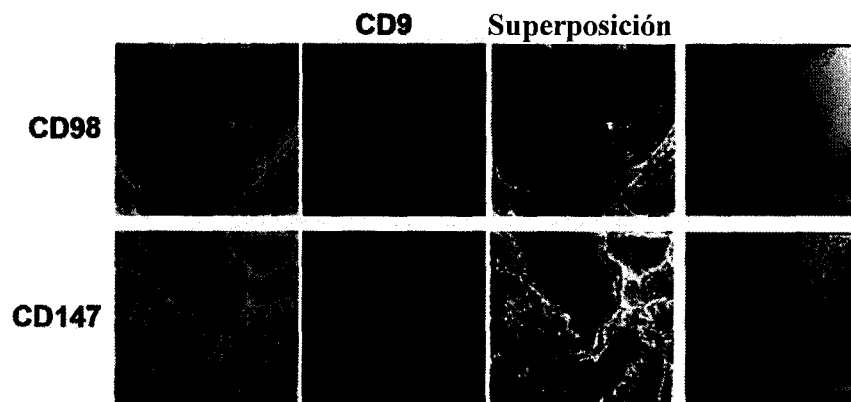
65



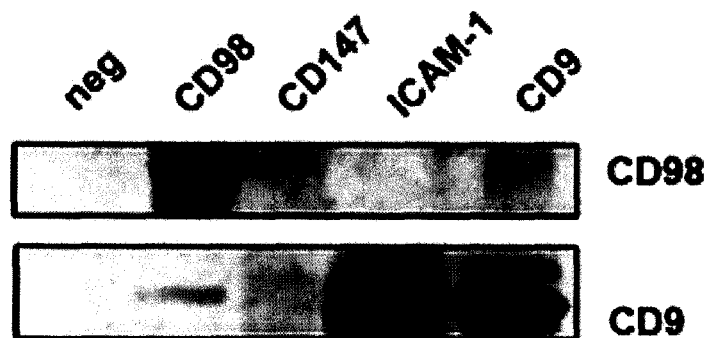
**A**



**B**

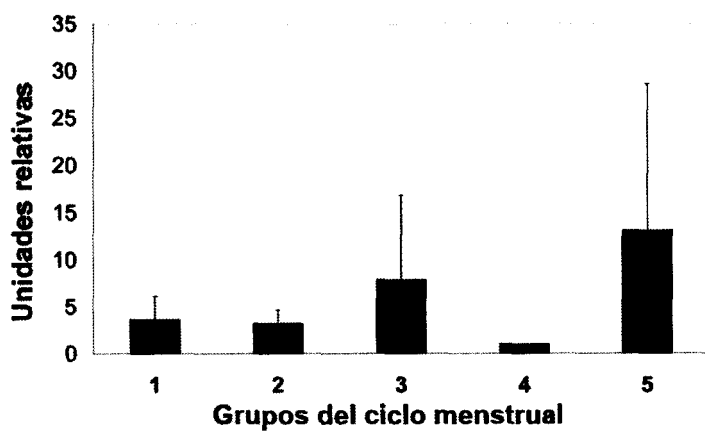


**C**

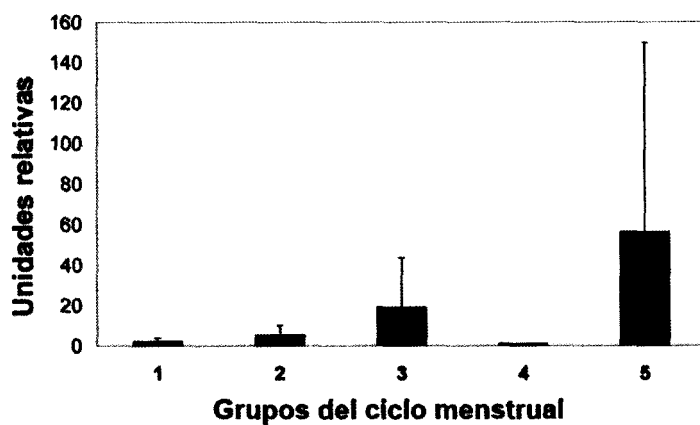


**FIG. 1**

### CD147



### ICAM-1



### CD98

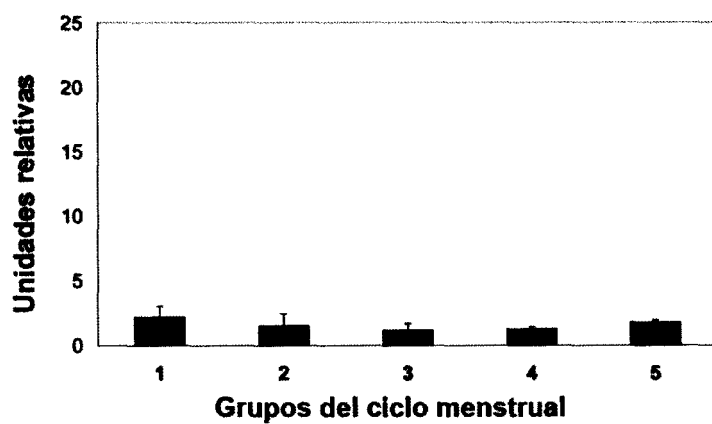


FIG. 2

# ICAM-1

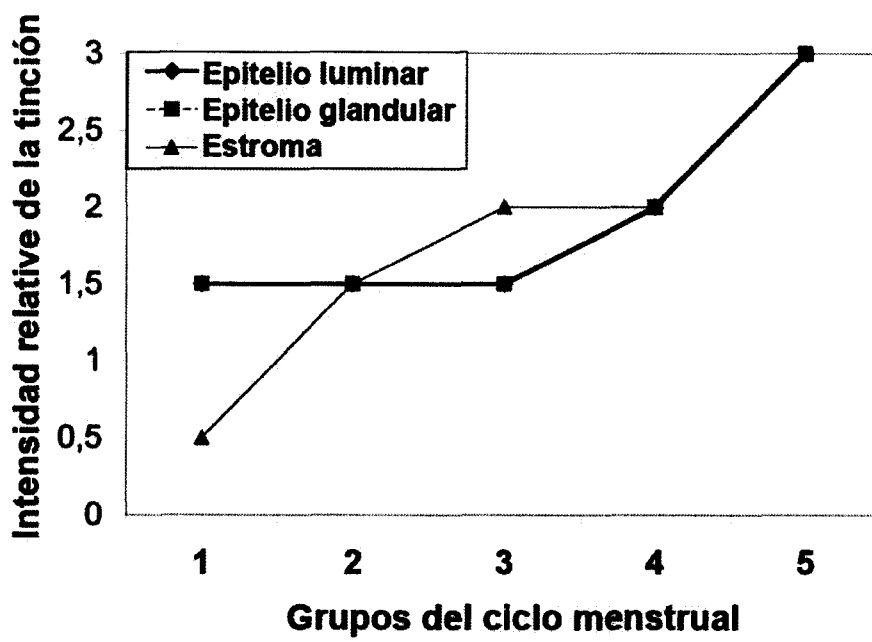
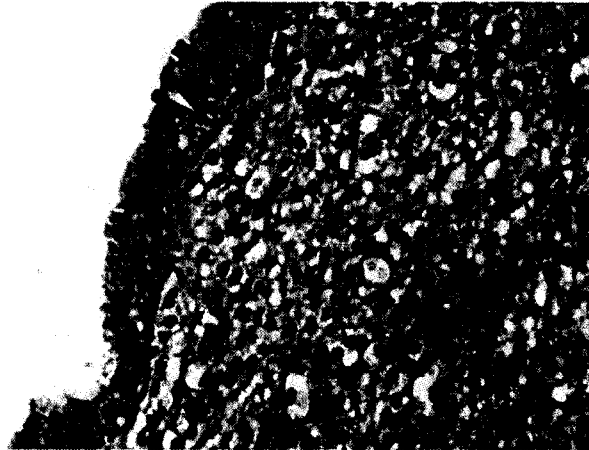


FIG. 3A

# CD9

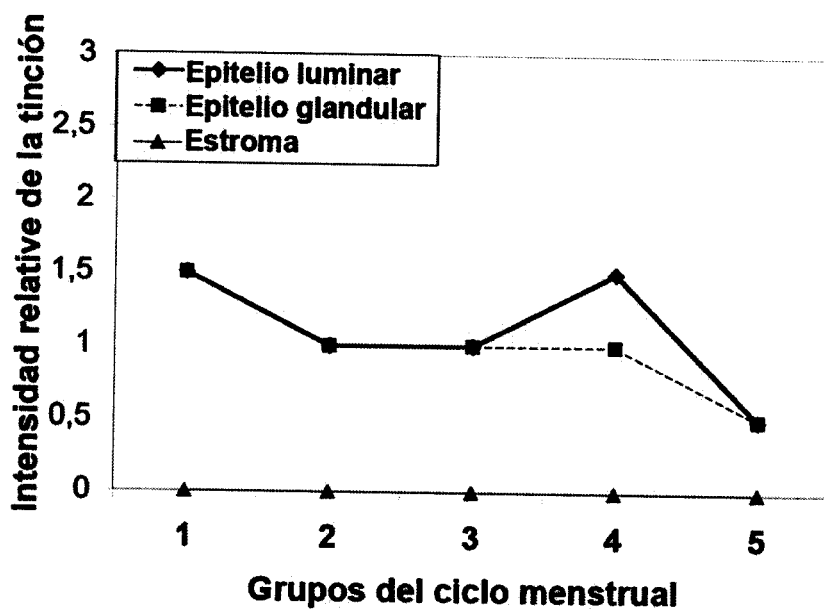


FIG. 3A (cont.)

# CD147

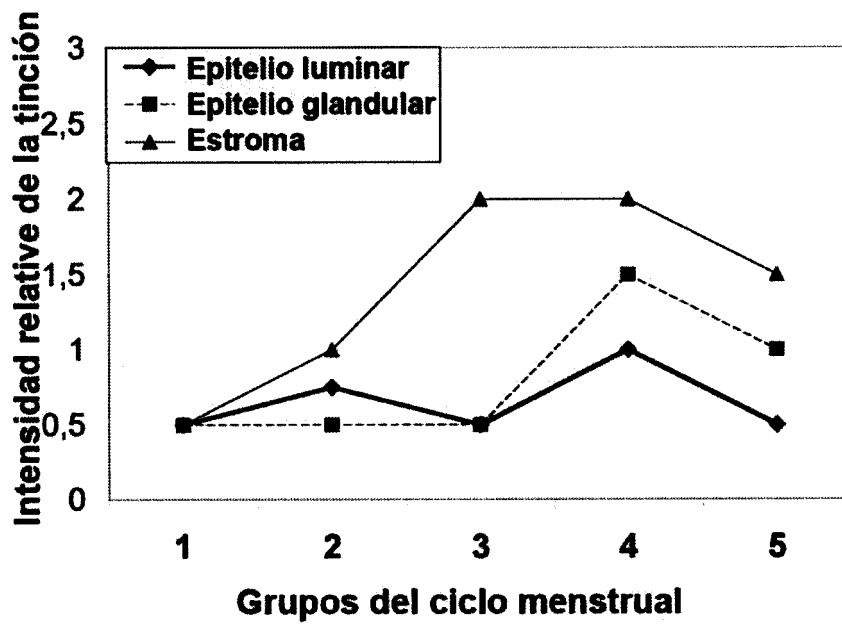
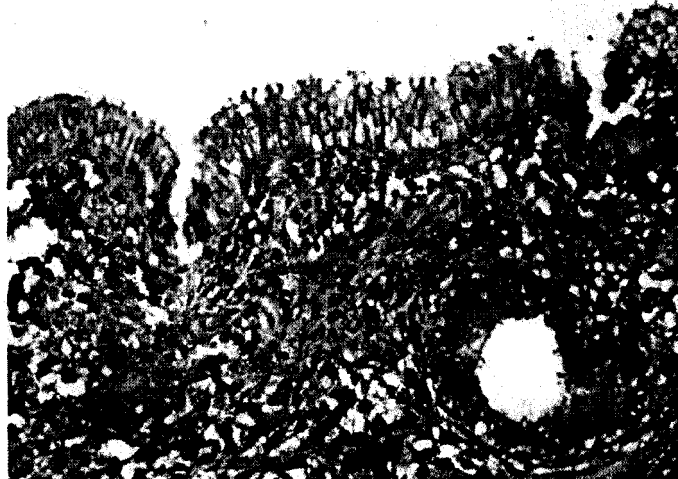


FIG. 3A (cont.)

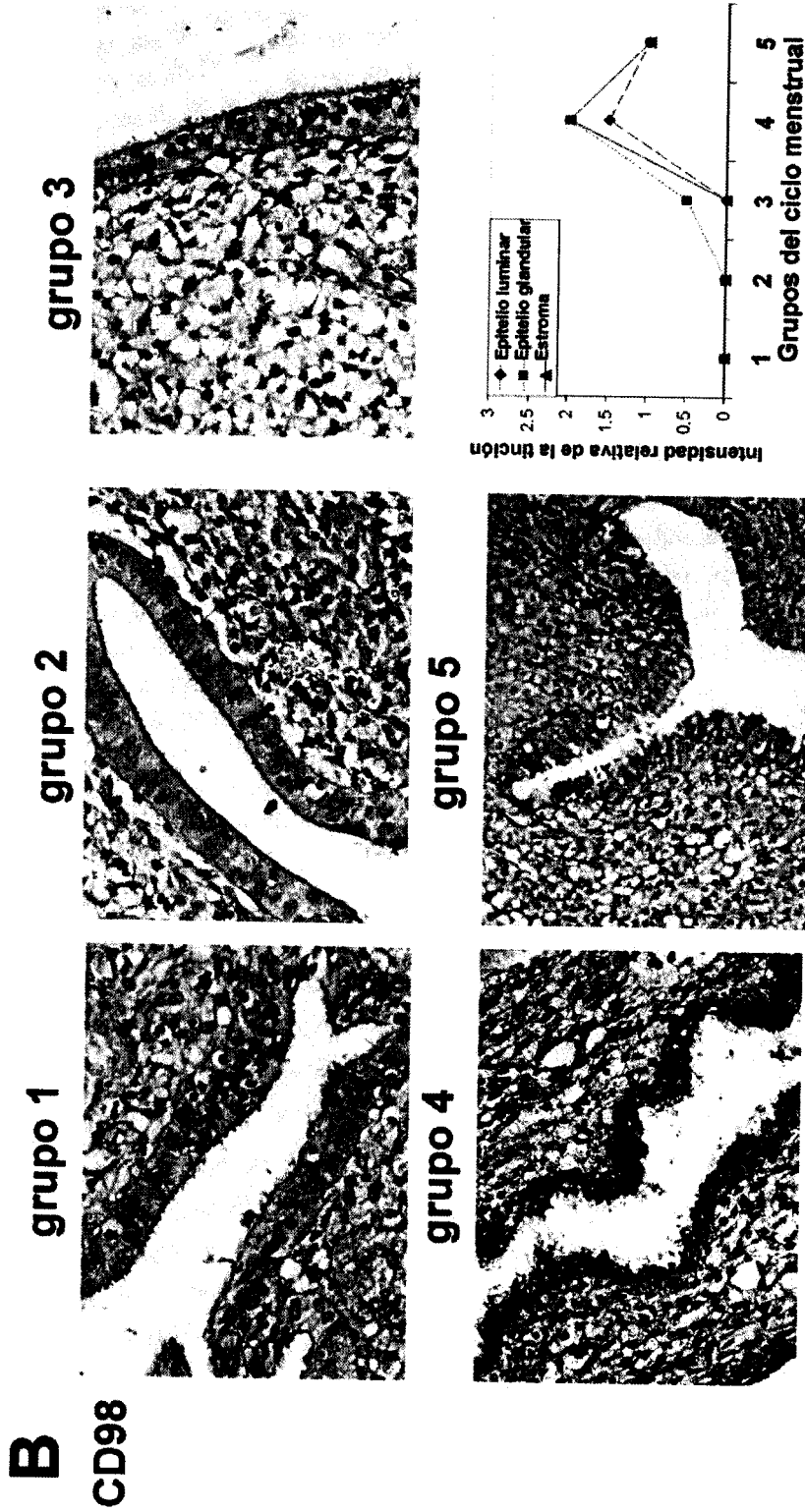


FIG. 3B

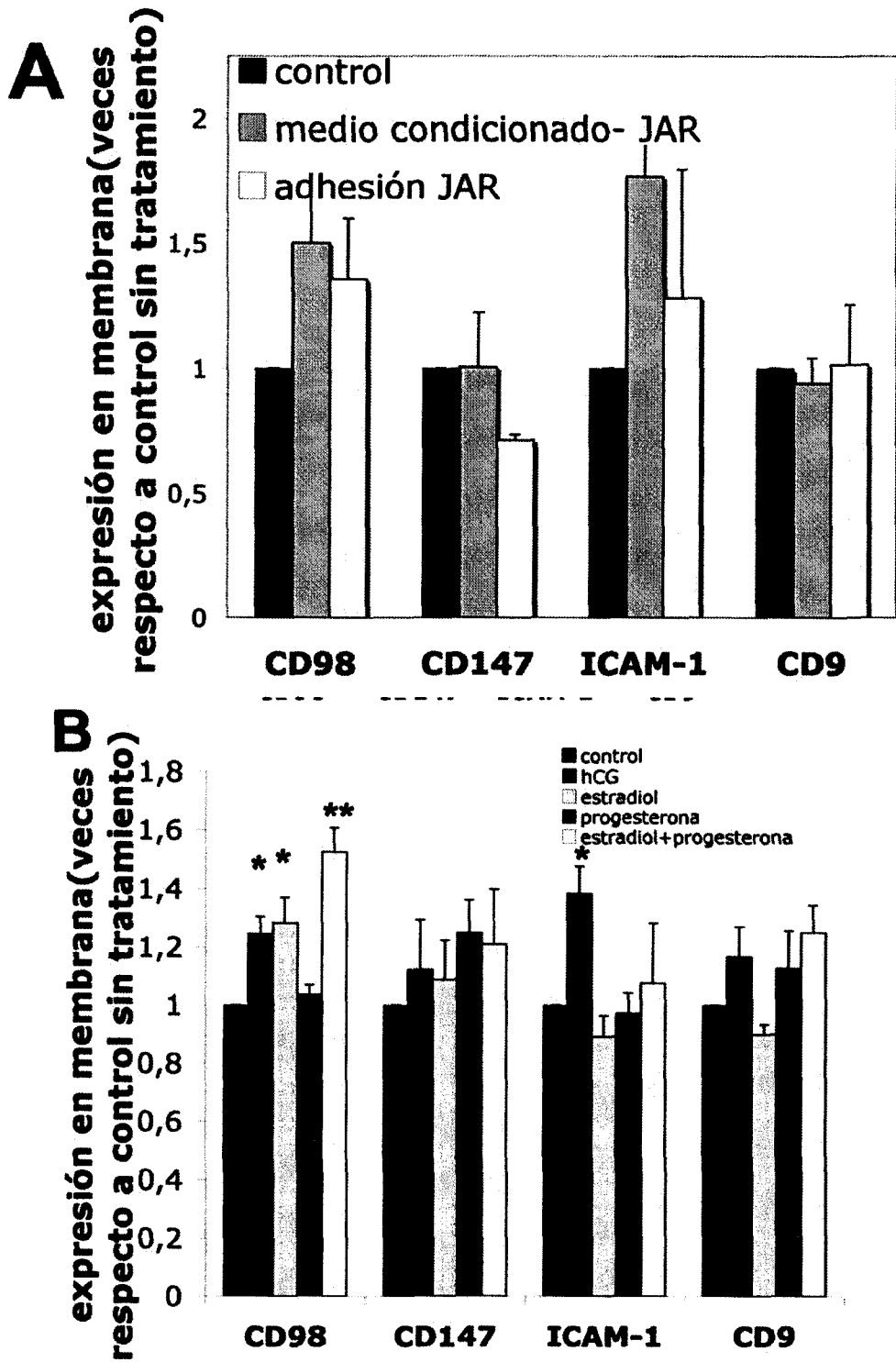
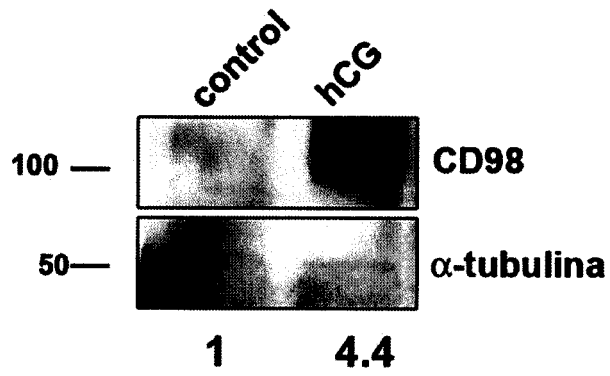
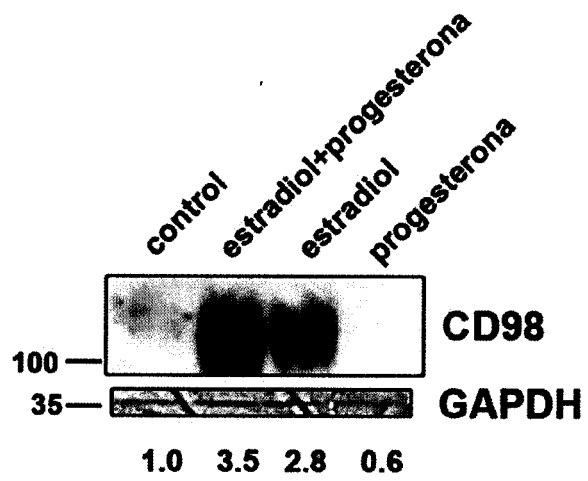


FIG. 4

**C**



**D**



**E**

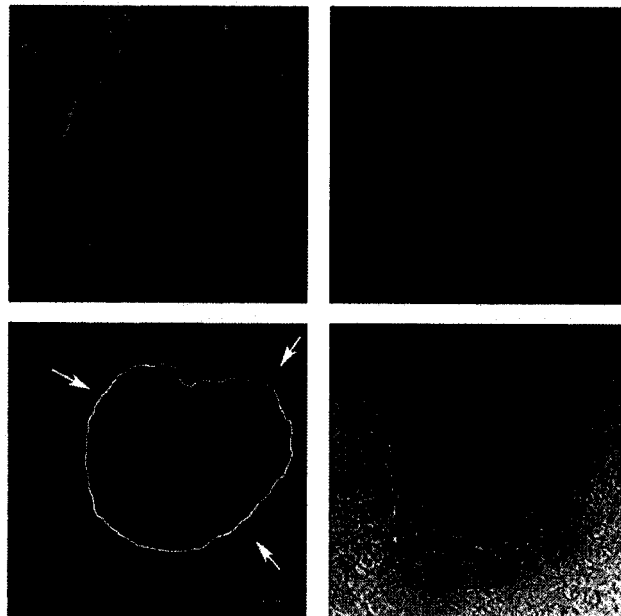


FIG. 4 (cont.)



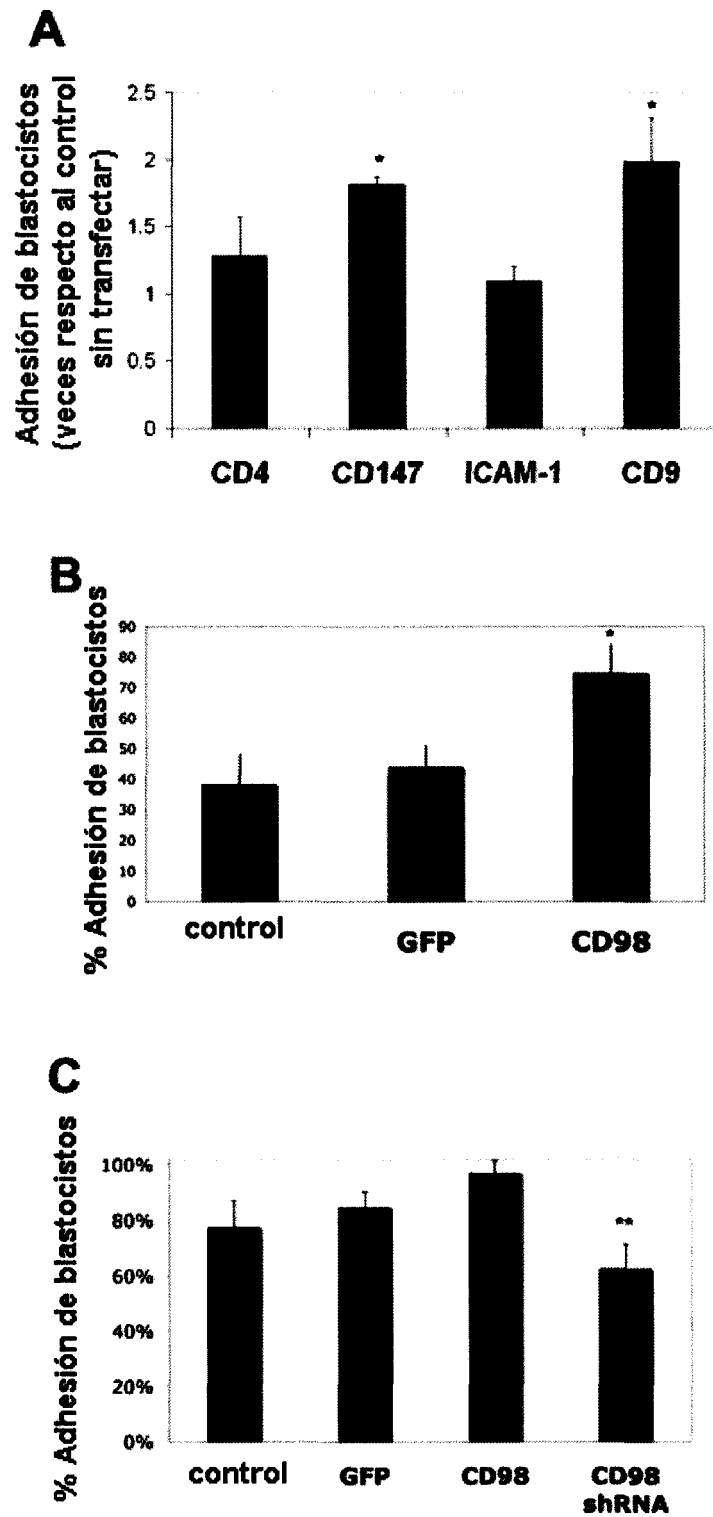


FIG. 5

# ES 2 365 343 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III Universidad Autónoma de Madrid Fundación IVI	
	<120> USO DE CD98 COMO MARCADOR DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL	
10	<130> P5123ES00	
	<160> 2	
15	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 19	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<223> Secuencia de CD98 reconocida por el shRNA.	
	<400> 1	
30	tcgggacaga gaatctgaa	19
	<210> 2	
	<211> 64	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia codificante para un shRNA específico frente a CD98	
	<400> 2	
45	tgctgttcag attctctatg tcccagatgtt tggccactga ctgactcggg acagagaatc	60
	tgaa	64
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200902193

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.11.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	UGUR, Y., <i>et al.</i> Activation antigens during the proliferative and secretory phases of endometrium and early-pregnancy decidua. Gynecologic and obstetric investigation. 2006. Vol. 62, nº 2, páginas 66-74. ISSN 0378-7346 (Impreso). doi:10.1159/00009237. Ver todo el documento.	1-16
A	CHROSTOWSKI, M.K., <i>et al.</i> LAT-1 Expression in Pre- and Post-implantation Embryos and Placenta. Placenta. Marzo 2009. Vol. 30, nº 3, páginas 270-276. ISSN 0143-4004. doi:10.1016/j.placenta.2008.12.015. Ver todo el documento.	1-16
A	KABIR-SALMANI, M., <i>et al.</i> (a) The membrane-spanning domain of CD98 heavy chain promotes alpha(v)beta3 integrin signals in human extravillous trophoblasts. Molecular endocrinology. Marzo 2008. Vol. 22, nº 3, páginas 707-715. ISSN 0888-8809 (Impreso). Ver todo el documento.	1-16
A	KABIR-SALMANI, M., <i>et al.</i> (b) Endometrial receptivity to implantation in humans: Biochemical and molecular aspects. Yakhteh Medical Journal. Marzo 2008. Vol. 10, nº 1, páginas 1-24. ISSN 1561-4921 (Impreso). Ver todo el documento.	1-16
A	ACHACHE, H. & REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. Human reproduction update. Nov-Dic 2006. Vol. 12, nº 6, páginas 731-746. ISSN 1355-4786 (Impreso). Ver todo el documento.	1-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
15.09.2011

Examinador  
B. Pérez Esteban

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N33/68** (2006.01)

**C12Q1/68** (2006.01)

**A61K38/17** (2006.01)

**C07K14/47** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12Q, A61K, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.09.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	UGUR, Y., <i>et al.</i> Gynecologic and obstetric investigation. 2006. Vol. 62, nº 2, páginas 66-74. ISSN 0378-7346 (Impreso). doi:10.1159/00009237.	2006
D02	CHROSTOWSKI, M.K., <i>et al.</i> Placenta. Marzo 2009. Vol. 30, nº 3, páginas 270-276. ISSN 0143-4004. doi:10.1016/j.placenta.2008.12.015.	Marzo 2009
D03	KABIR-SALMANI, M., <i>et al.</i> (a). Molecular endocrinology. Marzo 2008. Vol. 22, nº 3, páginas 707-715. ISSN 0888-8809 (Impreso).	Marzo 2008
D04	KABIR-SALMANI, M., <i>et al.</i> (b). Yakhteh Medical Journal. Marzo 2008. Vol. 10, nº 1, páginas 1-24. ISSN 1561-4921 (Impreso).	Marzo 2008
D05	ACHACHE, H. & REVEL, A. Human reproduction update. Nov-Dic 2006. Vol. 12, nº 6, páginas 731-746. ISSN 1355-4786 (Impreso).	Nov-Dic 2006

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente describe y reivindica el uso de CD98 como marcador de receptividad del endometrio para la implantación del embrión. Reivindica también métodos para aumentar la receptividad del embrión basados en el aumento de los niveles de CD98, y composiciones anticonceptivas basadas en el uso de inhibidores de CD98.

No se han encontrado en el estado de la técnica documentos que divulguen el uso de CD98 como marcador de receptividad endometrial, ni documentos que contengan información que permita al experto en la materia deducir este uso de forma evidente, por lo que la solicitud se considera nueva y con actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986 de Patentes.

Se citan en este informe documentos del estado de la técnica que divulgan la sobreexpresión de CD98 en placenta y trofoblastos, y documentos que estudian la receptividad endometrial en humanos, y posibles marcadores de esta receptividad (que no incluyen en ningún caso CD98).

En el documento D01 se describe el aumento en la expresión de varios antígenos, entre ellos CD98, en endometrio, placenta y sinciotrofoblastos. El empleo de anticuerpos monoclonales frente a los antígenos estudiados permite a los autores determinar cuáles se activan en las fases proliferativa y secretora del endometrio y en decidua. Para el caso de CD98, encuentran aumento de la expresión tanto en fase proliferativa como en fase secretora del endometrio. A diferencia de lo descrito en la solicitud, en D01 no se establece una clara diferencia en la expresión de CD98 en la fase secretora (ventana de implantación) frente a las demás etapas. Aunque se sugiere que este antígeno podría tener un importante papel en procesos de infertilidad y en abortos espontáneos, no se propone CD98 como marcador de receptividad endometrial. Por tanto, no se considera evidente la deducción de los usos de CD98 reivindicados en la solicitud, por lo que D01 no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la misma.

En el documento D02 se demuestra el aumento de los niveles de la expresión de LAT-1 (una proteína transportadora de membrana de la que forma parte la cadena pesada de CD98) en los primeros estados de desarrollo del embrión y en decidua materna. Los resultados mostrados en este documento indican que CD98 está implicado en el proceso de implantación embrionaria y desarrollo de la placenta. A diferencia de lo descrito en la solicitud de patente, en D02 no se incluye en el análisis muestras de endometrio en distintas fases del ciclo menstrual, que permitan comparar la expresión en los diferentes estadios endometriales, por lo que los datos divulgados en D02 no conducen a proponer CD98 como marcador de receptividad endometrial, y este documento no afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la presente solicitud.

Del mismo modo, en el documento D03 se describe el aumento en la expresión de la cadena pesada de CD98 en trofoblastos placentarios humanos en desarrollo, y se sugiere que esta proteína estaría implicada en la invasión de los trofoblastos extravelosos en la placenta. Igual que en el documento anterior, tampoco en D03 se muestran datos que permitan establecer la expresión diferencial de CD98 en endometrio durante la ventana de implantación, ni se sugiere que esta proteína podría ser utilizada como marcador de receptividad endometrial. Por tanto, a la luz de lo divulgado en el documento D03, la presente solicitud de patente tendría novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

Por último, los documentos D04 y D05 son sendas revisiones de marcadores de receptividad endometrial. En ellos se describen las condiciones morfológicas del endometrio y las diferentes moléculas que afectan de alguna manera el proceso de implantación del embrión, y que podrían, por tanto, ser empleadas como biomarcadores de receptividad uterina, o para diseñar estrategias terapéuticas que optimicen el proceso de implantación embrionaria o mejoren los métodos anticonceptivos. Dado que en ninguno de estos dos documentos se menciona CD98 como posible marcador, ninguno de ellos afectaría la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud de patente objeto de este informe.