

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 387**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.08.2013 PCT/IB2013/056321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020564**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2013 E 13762279 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2879696**

54 Título: **ADN libre de células como diana terapéutica para esterilidad femenina y marcador de diagnóstico**

30 Prioridad:

03.08.2012 EP 12179265
25.02.2013 EP 13156626

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.11.2016

73 Titular/es:

FERRING BV (100.0%)
Polaris Avenue 144
2132 JX Hoofddorp, NL

72 Inventor/es:

HAZOUT, ANDRÉ

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 588 387 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

ADN libre de células como diana terapéutica para esterilidad femenina y marcador de diagnóstico.

- 5 La presente invención se refiere al campo de la esterilidad femenina. Más exactamente, se refiere a un marcador novedoso de esterilidad femenina, así como a un tratamiento novedoso para incrementar la fecundidad de pacientes femeninas que lo necesitan.

10 En los últimos años, los autores han descrito una prevalencia de esterilidad no explicada de hasta el 20% al 25%. La esterilidad es la incapacidad de una pareja para concebir un embarazo después de intentarlo durante al menos un año completo.

15 El diagnóstico de esterilidad comienza con la recepción de un historial médico y un examen físico. Si el examen está limitado a una evaluación de la función ovulatoria, un histerosalpingograma y una laparoscopia en cualquier pareja que no ha concebido en un año de intentos, un gran número de casos de esterilidad permanecen sin explicar. Expandir las pruebas diagnósticas añadiendo una serie de ensayos (medición de los niveles de una serie de hormonas y citoquinas, técnicas de análisis genético para detectar cualquier mutación en genes asociados con esterilidad femenina) solamente reduce ligeramente la esterilidad "no explicada".

20 Los efectos perjudiciales del tabaquismo, el exceso de la ingesta de cafeína o el consumo de alcohol son conocidos. Sin embargo, su impacto sobre la fecundidad difiere en gran medida de un individuo a otro, y hoy en día, ningún marcador biológico permite la cuantificación de este impacto. Por lo tanto, estos efectos no son evaluados de forma precisa por las pruebas disponibles actualmente.

25 Entre los tratamientos para la esterilidad clínica, las tecnologías de reproducción asistida (ART) tienen la tasa de nacidos vivos más elevada por tratamiento. La ART ha contribuido a la concepción de más de 1 millón de bebés en todo el mundo desde su comienzo. Sin embargo, la tasa de fracaso de estas tecnologías sigue siendo significativa y la decisión de las parejas de continuar con la ART o de repetir el tratamiento con ART después de un intento fallido es, a menudo, una decisión difícil debido a los costes físicos, emocionales y económicos del tratamiento.

30 Los datos de fecundación *in vitro* (IVF) e inyección de esperma intracitoplasmática (ICSI) indican claramente, incluso en los programas más exitosos, bajas tasas de implantación con respecto al número de embriones transferidos. Defectos que causan problemas con la implantación son probablemente mucho más habituales de lo que es evaluado actualmente y constituyen otra área de esterilidad no explicada.

35 Evaluar factores de implantación tales como integrinas, LIF, G-CSF u otros factores de crecimiento puede conducir a la comprensión de otros casos de esterilidad y, por lo tanto, reducir el porcentaje de pacientes clasificados como que presentan "esterilidad no explicada", pero en la mayoría de los casos esto no ayudará a las deliberaciones iniciales respecto a la terapia. En Francia, la tasa de éxito de ART varía entre el 25% y el 28% en términos de nacidos vivos por recuperación de ovocitos.

40 A partir de lo anterior, parece que una serie de parámetros implicados en esterilidad femenina son completamente ignorados por las actuales pruebas.

45 La presencia de ADN libre de células circulante en plasma humano fue descrita en 1948 por Mendel y Metals [1]. El ADN circulante libre de células (ADNlc) se ha estudiado en una amplia gama de condiciones fisiológicas y patológicas, incluyendo trastornos inflamatorios, estrés oxidativo y neoplasia. Está presente en sujetos sanos a concentraciones en sangre que varían entre 0 y 100 ng/ml, con un promedio de 30 ng/ml [2]. Suponiendo que el contenido de ADN de una célula normal asciende a 6,6 pg, estos valores representan un promedio de 0-15.000 equivalentes genómicos por ml de sangre, con un promedio de 5000 genomas por ml. La mayor parte de este ADN es bicatenario y está aparentemente en forma de complejo de nucleoproteínas.

50 La electroforesis de ADNlc en geles de bajo porcentaje de agarosa ha mostrado una variación del tamaño de los fragmentos de ADN de entre 0,18 y 21 kilobases, con variaciones de muestra a muestra en la distribución de tamaño de fragmentos de ADN. Es habitual detectar fragmentos de ADN grandes, casi del tamaño del genoma.

Aunque el mecanismo preciso asociado con la liberación de ADN libre al torrente sanguíneo sigue siendo incierto, probablemente se deriva de una combinación de apoptosis, necrosis y liberación activa desde células.

El aclaramiento de ADNlc del torrente sanguíneo se produce rápidamente: el ADN fetal desaparece de la sangre de las madres después del parto con una semivida de 16,3 minutos [3]. Es conocido que el ADNlc es sensible a nucleasas plasmáticas (por ejemplo, ADNasa I), pero los mecanismos de aclaramiento renal [4] y hepático [5] también están implicados en la eliminación de ADNlc.

5

Hasta ahora, se desconoce si la liberación de ADNlc tiene efectos biológicos cualesquiera. Las células cultivadas han demostrado liberar ADN bicatenario a los medios [6], y el ADNlc podría incorporarse en células [7]. Estos descubrimientos conducen a la introducción del concepto de "genometástasis" [8]. Sin embargo, esta hipótesis aún está por demostrar.

10

El ADN circulante puede aislarse a partir tanto de plasma como de suero, pero el suero contiene una concentración aproximadamente 6 veces mayor de ADN circulante. Recientemente, Umetani y *col.*, demostraron que menos del 10% de los niveles de ADN en suero 6 veces mayores se debía a contaminación por otras fuentes (*es decir*, liberación a partir de leucocitos durante la separación de suero) [9]. La razón para niveles de suero más elevados sigue siendo desconocida, pero una pérdida de ADN en plasma durante procedimientos de purificación se excluyó [9].

15

El ADN circulante libre de células es un biomarcador potencialmente útil. Los niveles y los patrones de fragmentación de ADN ofrecen posibilidades interesantes para fines de diagnóstico y pronóstico. Recientemente, Bartoov y *col.*, describieron un procedimiento para valorar el estado de fecundidad de un sujeto masculino, basándose en la medición de ADNlc en una muestra de fluido de dicho sujeto (WO2008/047364). También propusieron un procedimiento para tratar subfecundidad masculina administrando ADNasa a varones subfecundos. El ADN libre de células también se propuso como un biomarcador para monitorización no invasiva de proliferaciones malignas y benignas y afecciones inflamatorias, tales como endometriosis [10].

20

Muy recientemente, Czamanski-Cohen y *col.*, describieron que en una cohorte de 37 mujeres que se estaban sometiendo a tratamiento IVF, las concentraciones de ADNlc en plasma fueron estadísticamente superiores el día de la prueba de β HCG en mujeres que no concibieron, en comparación con aquellas que concibieron. Sin embargo, tal como reconocieron los autores, este estudio no pudo establecer una correlación entre esterilidad femenina y concentración de ADNlc, dado que todas las mujeres incluidas en él estaban en el proceso de tratamiento IVF [11].

25

Tal como se describe en el presente documento, el inventor ha demostrado ahora que el nivel de ADNlc es estadísticamente mayor en mujeres estériles que en mujeres fecundas. Por lo tanto, el nivel de ADNlc puede ser útil para el diagnóstico y pronóstico de esterilidad. El nivel de ADNlc también puede ser útil para el diagnóstico y el pronóstico de esterilidad en mujeres que no padecen endometriosis. El hecho de que el ADNlc pueda obtenerse sin procedimientos invasivos o dolorosos le hace particularmente adecuado para uso en diagnóstico de esterilidad en mujeres. Además, tal como se demuestra en la parte experimental a continuación, un tratamiento que causa una disminución del nivel de ADN libre de células mejora significativamente la fecundidad de las pacientes femeninas tratadas.

35

Un primer aspecto de la presente invención es, por lo tanto, un procedimiento para diagnosticar *in vitro* esterilidad en una hembra de mamífero, que comprende las siguientes etapas:

40

- (i) determinar el nivel de ADN libre de células en una muestra de fluido corporal de dicha hembra, y
- (ii) comparar dicho nivel con un umbral predeterminado,

45

donde un nivel de ADN libre de células por encima de dicho umbral predeterminado es indicativo de esterilidad.

Este procedimiento puede usarse para diagnosticar esterilidad en una hembra humana o animal, preferentemente en una humana. Puede realizarse junto con las primeras pruebas que se realizan cuando se exploran las razones para esterilidad de una pareja, o después de estas pruebas, en pacientes para los cuales las pruebas no consiguieron identificar una causa de esterilidad. En particular, puede usarse para diagnosticar esterilidad *in vitro* en una mujer que no padece endometriosis.

50

Por supuesto, en lo anterior, una mujer que tiene un nivel de ADNlc "indicativo de esterilidad" significa que esta mujer tiene una probabilidad de ser estéril que es mayor que la de una mujer que tiene un ADNlc por debajo del umbral predeterminado.

55

En el procedimiento anterior, la muestra de fluido corporal puede ser una muestra de plasma, suero, sangre o líquido

folicular.

Tal como se muestra en la parte experimental a continuación, se midió la concentración de ADNlc en el plasma de 94 mujeres fecundas y 96 mujeres estériles. En esta cohorte, la concentración plasmática de ADNlc promedio era de aproximadamente 50 ng/μl en mujeres estériles y aproximadamente 109 ng/μl en las estériles. Por lo tanto, cuando el procedimiento anterior atañe a mujeres humanas y, cuando la muestra de fluido corporal es una muestra de plasma, el umbral se seleccionará entre estos dos valores, y preferentemente entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 ng/μl. Por supuesto, el experto en la materia será capaz de afinar y modificar estos valores investigando adicionalmente este parámetro en una cohorte de pacientes más grande. Midiendo el nivel de ADNlc en muestras de una mayor cantidad de pacientes, el experto en la materia establecerá también una escala de valores para el nivel de ADNlc, con probabilidades de esterilidad correspondientes. Las mediciones en cohortes más grandes, que comprenden subgrupos homogéneos de mujeres (dependiendo de su edad y/o parámetros de comportamiento tales como si fuman o no y/o parámetros fisiológicos tales como el peso, HbA1c y similares) también pueden conducir a la determinación de diferentes umbrales que reflejan las diferentes situaciones. En este caso, el experto en la materia determinará la probabilidad de esterilidad de una mujer interpretando su nivel de ADNlc en vista de los otros parámetros relevantes.

Tal como ya se ha mencionado, el procedimiento puede realizarse midiendo el nivel de ADNlc en una muestra de fluido corporal diferente de la muestra de plasma. Por supuesto, para cada fluido corporal, hay que realizar mediciones en una cohorte significativa de mujeres, incluyendo fecundas y estériles, para determinar un umbral relevante.

El umbral se seleccionará cercano al valor promedio de mujeres fecundas si el objetivo es identificar todas o casi todas las mujeres que pueden ser estériles. En este caso, las mujeres fecundas también pueden diagnosticarse como probablemente estériles (falso positivo). Por el contrario, si el objetivo es identificar solamente aquellas que tienen la probabilidad más elevada de ser estériles, el umbral se seleccionará cerca del valor promedio de mujeres estériles.

En una realización específica, el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza para diagnosticar *in vitro* esterilidad en una mujer midiendo el nivel de ADNlc en una muestra de plasma de dicha mujer, y un nivel en plasma de ADNlc por encima de 60 ng/μl es indicativo de esterilidad.

En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza para diagnosticar *in vitro* esterilidad en una mujer midiendo el nivel de ADNlc en una muestra de plasma de dicha mujer, y un nivel en plasma de ADNlc por encima de 70 ng/μl es indicativo de esterilidad.

En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza para diagnosticar *in vitro* esterilidad en una mujer midiendo el nivel de ADNlc en una muestra de plasma de dicha mujer, y un nivel en plasma de ADNlc por encima de 80 ng/μl es indicativo de esterilidad, donde un nivel de ADN libre de células por encima de dicho umbral predeterminado es indicativo de esterilidad.

En otra realización, el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza para diagnosticar *in vitro* esterilidad en una mujer midiendo el nivel de ADNlc en una muestra de plasma de dicha mujer, y un nivel en plasma de ADNlc por encima de 90 ng/μl es indicativo de esterilidad, donde un nivel de ADN libre de células por encima de dicho umbral predeterminado es indicativo de esterilidad.

En otra realización más, el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza para diagnosticar *in vitro* esterilidad en una mujer midiendo el nivel de ADNlc en una muestra de plasma de dicha mujer, y un nivel en plasma de ADNlc por encima de 100 ng/μl es indicativo de esterilidad.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para realizar los procedimientos anteriores. En particular, la invención se refiere a un kit que comprende reactivos para medir el nivel de ADNlc en una muestra biológica, y reactivos específicos para medir al menos un parámetro fisiológico en una muestra biológica, donde dicho parámetro fisiológico se selecciona entre el grupo que consiste en el nivel de hormona antimulleriana (AMH), actividad telomerasa y concentración de homocisteína.

El nivel de ADNlc en una muestra biológica puede medirse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como, aunque sin limitarse a cualquier tinción de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, intercaladores. Los ejemplos no limitantes de intercaladores de ADN que pueden usarse para medir niveles de ADNlc e incluidos en los kits de

acuerdo con la presente invención incluyen berberina, bromuro de etidio, proflavina, daunomicina, doxorubicina, talidomida, Sybr® Green, Sybr® Gold y PicoGreen®.

La hormona antimulleriana (AMH) también se denomina MIS (sustancia inhibidora mulleriana). Dado que la AMH es producida directamente por los folículos ováricos, los niveles de AMH se correlacionan con el número de folículos antrales en los ovarios. Se ha documentado que mujeres con menos AMH tienen recuentos de folículos antrales más bajos y producen un número inferior de ovocitos en comparación con mujeres con niveles más elevados. Se cree que los niveles en sangre de AMH reflejan el tamaño del suministro de óvulos restante - o "reserva ovárica". La AMH puede medirse mediante un inmunoensayo, tal como ELISA. Un kit de acuerdo con la invención puede comprender, por lo tanto, un anticuerpo anti-AMH.

La telomerasa es una enzima que repara la degradación del ADN. Sin embargo, puede ser ineficaz si está presente en concentración insuficiente. Además, cuando está presente en una concentración demasiado alta, la telomerasa genera factores apoptóticos. Como consecuencia, la telomerasa también está implicada en la fecundidad y afecta al desarrollo embrionario temprano. Su nivel puede medirse mediante un inmunoensayo, y por lo tanto, un kit de acuerdo con la presente invención puede comprender un anticuerpo que reconoce específicamente la telomerasa.

La homocisteína es un homólogo no proteína del aminoácido cisteína, que difiere en un grupo metileno (-CH₂-) adicional. Es un marcador de estrés oxidativo, y como tal, puede ser informativo sobre el estado de fecundidad de un individuo. Los niveles de homocisteína pueden medirse mediante ensayos enzimáticos: la homocisteína unida o dimerizada (forma oxidada) se reduce a homocisteína libre, que reacciona a continuación con serina catalizada por cistationina beta-sintasa (CBS) para formar L-cistationina. La cistationina, a su vez, es descompuesta por cistationina beta-liasa (CBL) para formar homocisteína, piruvato y amoniaco. El piruvato se convierte a continuación mediante lactato deshidrogenasa (LDH) en lactato con NADH como coenzima. La tasa de conversión de NADH en NAD es directamente proporcional a la concentración de homocisteína (ΔA_{340} nm).

De acuerdo con una realización particular, el kit de acuerdo con la presente invención comprende al menos un agente intercalante de ADN y un anticuerpo que reconoce específicamente AMH.

Tal como se describe en los experimentos a continuación, mujeres estériles que ya se habían sometido a varios tratamientos incluyendo varias IVF sin éxito, fueron tratadas con una desoxirribonucleasa. Después de solamente una ronda de tratamiento con la desoxirribonucleasa, seguida por ART, más del 50% de estas pacientes se quedaron embarazadas. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una desoxirribonucleasa, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina, especialmente cuando esta esterilidad está asociada con un nivel de ADN libre de células mayor que el nivel de ADN libre de células que se observa estadísticamente en mujeres fecundas.

La desoxirribonucleasa (ADNasa) es una enzima que cataliza la escisión hidrolítica de enlaces fosfodiéster en una cadena principal de ADN. Las desoxirribonucleasas son, por lo tanto, un tipo de nucleasa. Se conocen una amplia variedad de desoxirribonucleasas, que difieren en sus especificidades por sustrato, mecanismos químicos y funciones biológicas.

Algunas ADNasas escinden solamente residuos en los extremos de moléculas de ADN (exodesoxirribonucleasas, un tipo de exonucleasa). Otras escinden en cualquier lugar a lo largo de la cadena (endodesoxirribonucleasas, un subconjunto de ribonucleasas). Algunas son muy específicas de secuencia acerca de la secuencia de ADN en la que cortan, como enzimas de restricción, mientras que otras son bastante indiscriminadas. Algunas escinden solamente ADN bicatenario, otras son específicas para moléculas monocatenarias, y otras actúan sobre ambas.

La desoxirribonucleasa I escinde ADN preferentemente en enlaces fosfodiéster adyacentes a un nucleótido de pirimidina, produciendo polinucleótidos terminados en fosfato 5'5' con un grupo hidroxilo libre en la posición 3', produciendo de promedio tetranucleótidos. Actúa sobre ADN monocatenario, ADN bicatenario y cromatina.

La desoxirribonucleasa II (ADNasa ácida) hidroliza enlaces desoxirribonucleotídicos en ADN nativo y desnaturalizado produciendo productos con 3'-fosfatos. Como sugiere su nombre, es más eficiente a pH ácido. Existen varias ADNasas II conocidas, incluyendo la ADNasa II alfa (habitualmente llamada simplemente ADNasa II) y ADNasa II beta (también llamada DLAD o ADNasa II-similar a ADNasa ácida).

Aunque cualquier tipo de ADNasa puede usarse en la presente invención, se prefiere la ADNasa I. La ADNasa I humana recombinante ya se usa clínicamente. Las enzimas ADNasa pueden ser inhaladas usando un nebulizador por enfermos de fibrosis quística. Las enzimas ADNasa ayudan dado que los leucocitos que se acumulan en el moco

se descomponen y liberan ADN, que se añade a la "pegajosidad" del moco. La ADNasa descompone en ADN y el moco es más fácil de eliminar de los pulmones.

La presente invención también se refiere al tratamiento de la esterilidad femenina. En una realización específica, la presente invención se refiere al tratamiento de esterilidad femenina en una mujer que no padece endometriosis. En otra realización específica, la presente invención se refiere al tratamiento de esterilidad femenina en una mujer que muestra un nivel de ADN libre de células mayor que el observado estadísticamente en una mujer fecunda. En cualquiera de sus realizaciones, el uso de acuerdo con la invención comprende administrar una desoxirribonucleasa a una mujer en una cantidad que es suficiente para reducir su nivel de ADN libre de células a un nivel similar al observado en mujeres fecundas. En lo anterior, el "nivel de ADN libre de células" debe entenderse como la concentración de ADN libre de células en cualquier fluido corporal relevante, tal como plasma, suero, sangre o líquido folicular. En lo sucesivo, mujeres estériles que tienen un nivel alto de ADNlc (en comparación con mujeres fecundas) se designarán como "que necesitan un tratamiento tal como se divulga en el presente documento". La presente invención es particularmente ventajosa para tratar esterilidad en mujeres.

En la presente invención, una ADNasa humana recombinante puede usarse ventajosamente, especialmente para tratar mujeres. Por supuesto, cuando se trata una hembra de otra especie, se prefiere una ADNasa recombinante de esta especie. Tal como ya se ha mencionado, puede usarse cualquier ADNasa para llevar a cabo esta invención, pero se prefiere la ADNasa I.

Cuando se lleva a cabo la presente invención, puede usarse cualquier vía de administración, siempre que cause la administración de una cantidad suficiente de ADNasa para obtener una disminución de ADN libre de células circulante. Por ejemplo, la ADNasa puede administrarse mediante la vía intravenosa o intramuscular.

Para el tratamiento de esterilidad, la ADNasa se administrará en una cantidad suficiente para obtener una disminución del nivel de ADN libre de células en sangre y/o en el líquido folicular. Por ejemplo, un mínimo de 2500 UI de ADNasa I puede administrarse cada día a una mujer estéril, durante al menos 2 días, preferentemente al menos 3 o 4 días o más. Por supuesto, debido a la diversidad interindividual, pueden observarse diferentes respuestas, y el régimen posológico puede adaptarse en consecuencia, de modo que la dosis que se administra sea suficiente para obtener una disminución del nivel de ADN libre de células, que debe volverse similar a los niveles observados en pacientes fecundas. El nivel de ADNlc puede ser objeto de seguimiento para verificar su disminución y evitar un tratamiento innecesario.

Se ha observado que, después de la disminución del nivel de ADNlc y después de que el tratamiento se ha interrumpido, el nivel de ADNlc no aumenta rápidamente hasta alcanzar sus valores anteriores. Durante al menos unos pocos días, el nivel de ADNlc permanece aproximadamente estable. Como consecuencia, la ADNasa puede administrarse ventajosamente a una mujer estéril que lo necesita durante la fase lútea tardía.

De acuerdo con una realización particular de la invención, ilustrada en la parte experimental a continuación, 2500 UI de ADNasa I se administran dos veces al día a una mujer estéril que lo necesita, durante 7 días de la fase lútea tardía.

Por supuesto, el tratamiento de esterilidad descrito anteriormente puede combinarse con ART, tal como se describe en los experimentos en lo sucesivo.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: concentraciones de ADNlc medias en plasma sanguíneo de 73 hombres fecundos y 88 estériles y en 94 mujeres fecundas y 96 estériles.

Figura 2: concentraciones de ADNlc en plasma sanguíneo (cuadros negros) y el líquido folicular (cuadros grises) de 37 mujeres. Aquellas mujeres de este grupo que se quedaron embarazadas tenían un nivel de ADNlc medio en plasma y/o en líquido folicular que era menor que el valor medio para todas las mujeres del grupo (incluyendo aquellas que se quedaron embarazadas y aquellas que no).

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Pacientes, materiales y procedimientos

Muestras de semen.

5 Se recogieron muestras de semen de hombres fecundos y estériles de < 50 años mediante masturbación después de 3-6 días de abstinencia sexual. Se realizaron recuentos y análisis de motilidad, vitalidad y morfología del espermatozoide de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud. Un total de 161 hombres se incluyeron en este estudio: 73 hombres fecundos y 88 estériles.

10 *Muestras de plasma y líquido folicular de mujeres*

La cantidad de ADN libre de células (ADNlc) en plasma se ha medido en 94 mujeres fecundas (AMH>2 ng/ml) y en 96 mujeres estériles de menos de 37 años de edad. Se llevó a cabo un estudio genómico para verificar el origen de este ADNlc, particularmente en mujeres estériles.

15

Cuando estaban disponibles muestras, también se realizó cuantificación del ADNlc en muestras de líquido folicular en mujeres estériles correspondientes. Un total de 37 muestras de líquido folicular se incluyeron en este estudio.

Estimulación ovárica y recuperación de líquido folicular

20

La mayoría de las pacientes fueron estimuladas para ART usando un protocolo agonista o protocolos antagonistas largos con FSH recombinante (Gonal F® (Merck laboratory) o Puregon® (Schering Plough laboratory)) o HMG (Menopur®: Ferring laboratory). Después de controles hormonales y sonográficos, la ovulación se desencadenó con HCG recombinante o urinaria, 36 horas antes de la recuperación de ovocitos de acuerdo con una técnica bien conocida. Dos o tres líquidos foliculares dominantes se aislaron y se centrifugaron antes de almacenamiento. A continuación, el contenido de ADNlc se evaluó usando el mismo procedimiento que en plasma/suero.

25

Aislamiento de ADNlc y amplificación por PCR

30 El ADNlc en plasma se aisló usando un kit de preparación de plantillas de PCR para High Pure (Roche) siguiendo la recomendación del fabricante. El tampón de elución se diluyó a una solución al 20% usando ddH₂O y se precalentó a 70°C. Las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 5 min, 400 µl de plasma se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 ml evitando restos celulares. 400 µl de tampón de unión y 40 µl de proteinasa K reconstituida se mezclaron con las muestras. Después de un breve vórtice, los tubos se incubaron 10 min a 70°C. Después de la incubación, 200 µl de isopropanol al 100% se mezclaron con las muestras que se transfirieron entonces al depósito superior de un tubo de recogida de filtro High Pure proporcionado en el kit de preparación de plantillas de PCR para High Pure. La columna se centrifugó a 8.000 g durante 1 min a temperatura ambiente. Los tubos paso del flujo y de recogida se desecharon y el filtro se combinó con un nuevo tubo de recogida. Esta etapa de carga se repitió hasta que toda la muestra se había cargado en el filtro. 500 µl de tampón de eliminación de inhibidor se añadieron al depósito superior y se centrifugaron 1 min a 8.000 g a temperatura ambiente. Los tubos de paso de flujo y de recogida se desecharon y el filtro se combinó con un nuevo tubo de recogida. Los tubos se lavaron dos veces añadiendo 500 µl de tampón de lavado al depósito superior y se centrifugaron 1 min a temperatura ambiente. Las columnas se secaron centrifugando a velocidad máxima (aproximadamente 13.000 g) durante 10 s, se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml y se calentaron 5 min a 70°C en una incubadora. 100 µl de tampón de elución al 20% precalentado se añadieron cuidadosamente al filtro. El tubo y el filtro se colocaron en la incubadora a 70°C y se agitaron a baja velocidad (aproximadamente 400 rpm) durante 5 min. Se eluyeron muestras de ADN a partir de las columnas centrifugando a 8.000 g durante 5 min y posteriormente se almacenaron a 4°C antes del uso o se congelaron a -70°C para almacenamiento a largo plazo.

50 *Amplificación por PCR*

La mezcla maestra usada para amplificar los loci JmJC2 y DXS1285 contenía 200 mM de cada dNTP, 1x tampón de Taq polimerasa, 2 µM de cada conjunto de cebadores, MgCl₂ 1,5 mM, y 0,5 U de ADN polimerasa Biotaq™ (Bioline) en un volumen de reacción de 15 µl. Las secuencias de cebadores usadas para amplificar JmJC2 (marcados del cromosoma Y) y DXS1285 (marcador del cromosoma X) son 5'-GAGTATGCGACCAGT-3' (SEQ ID No: 1), 5'-TGGCACACCATGGA-3' (SEQ ID No: 2) y 5'-CGTGCTTAGGCTTAATCCC-3' (SEQ ID No: 3), 5'-GAACTGACTGTAGAGAAGG-3' (SEQ ID No: 4), respectivamente, con una hibridación a 60°C.

55

Cuantificación de ADNlc

Se recogieron muestras de sangre en tubos vacutainer que contenían EDTA. Estos se centrifugaron (3.400 rpm durante 15 minutos) para aislamiento del plasma. Antes de la cuantificación de ADNlc, el plasma y la muestra de líquido folicular se centrifugaron a 3.400 g durante 20 min. Las muestras tienen que ser transparentes sin glóbulos rojos. De hecho, la cuantificación del ADNlc puede estar alterada en muestras teñidas. La solución de ADN estándar se diluyó a 20, 50, 100 y 500 ng/ml en 166 µl para trazar la curva patrón. Se añadieron 166 µl de HClO₄ (ácido perclórico) 1 N y 664 µl de difenilamina a cada 166 µl de muestras de sobrenadante de plasma o líquido folicular. Las muestras se incubaron a 37°C durante 20 h, posteriormente se centrifugaron a 15.000 g durante 10 minutos. 300 µl del sobrenadante se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midieron en un espectrofotómetro (Tecan, Genios) a 600nm.

Tratamiento con ADNasa

15 Las pacientes se inscribieron después de obtener el consentimiento informado por escrito.

En la fase lútea tardía de un ciclo precedente, 10 mujeres seleccionadas con niveles muy altos de ADNlc (> 100 ng/microlitro) fueron tratadas con una ampolla de Dornasa alfa (Pulmozyme®) 2,5 mg (2500 IU), dos veces al día, por vía intramuscular, durante varios días.

20 La solución de inhalación de Pulmozyme® (dornasa alfa) es una solución altamente purificada, incolora, transparente y estéril de desoxirribonucleasa I humana recombinante (rhADNasa) que escinde selectivamente ADN.

Pulmozyme® se administra normalmente por inhalación de una bruma de aerosol producida por un sistema nebulizador accionado por aire comprimido. Pero los niveles sistémicos de rhADNasa eran muy bajos (máximo 15%) después de la inhalación, de modo que se decidió pedir este mismo producto para inyección 1 M para incrementar la concentración de ADNasa, asumiendo el hecho de que no había efectos secundarios en el estudio toxicológico de Pulmozyme, ni siquiera por vía intravenosa.

30 *Estadística*

Se usó un test t bilateral para evaluar diferencias en los niveles de ADNlc entre individuos fecundos y estériles. Se calcularon coeficientes de correlación usando el test de correlación bilateral de Spearman. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas cuando P < 0,05.

35 **Ejemplo 2: ADNlc y esterilidad masculina**

El objetivo de este primer estudio preliminar era verificar el concepto de una asociación entre esterilidad masculina y niveles elevados de ADNlc, asumiendo el hecho de que la fragmentación del ADN puede participar en un ADNlc incrementado.

Con el fin de evaluar la integridad de ADNlc, se realizaron PCR en muestras de ADNlc aisladas. Un marcador del cromosoma X se amplificó con ADNlc aislado de plasma tanto de hombres como de mujeres. Un marcador del cromosoma Y se amplificó con ADNlc aislado de plasma masculino pero no de plasma femenino.

45 Se detectaron niveles más elevados de ADNlc en muestras de plasma sanguíneo de individuos estériles en comparación con controles fecundos respectivos, la cantidad de ADNlc en plasma se ha medido en 73 hombres fecundos (60,7 ng/µl ± 46,9) y 88 estériles (83,3 ng/µl ± 64,8), p = 8,7e-3 (figura 1).

50 **Ejemplo 3: ADNlc en plasma sanguíneo de mujeres**

Como en hombres, se detectaron niveles más elevados de ADNlc en muestras de plasma sanguíneo de mujeres estériles en comparación con controles fecundos respectivos. La diferencia entre individuos fecundos y estériles era, sin embargo, mayor en mujeres que en hombres.

55 De hecho, la cantidad de ADNlc en plasma de 94 mujeres fecundas demostró ser dos veces menor (49,2 ng/µl ± 58,0) que en 96 mujeres estériles (109,4 ng/µl ± 88,1), p = 1,02e⁻⁷ (figura 1).

Ejemplo 4: cantidad de ADNlc en plasma sanguíneo frente a líquido folicular en 37 mujeres estériles

La concentración de ADNlc en plasma sanguíneo se comparó con aquella en líquido folicular. Se descubrió una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de ADNlc en plasma sanguíneo y en líquido folicular ($r = 0,43$, $p = 6,4e^{-3}$) (figura 3). En un estudio preliminar, mujeres embarazadas tenían menos ADNlc en el líquido folicular y el suero que mujeres no embarazadas (no se muestran los datos).

Ejemplo 5: Efectos de tratamiento con ADNasa sobre la concentración de ADNlc en plasma sanguíneo y la fecundidad

10 Hasta la fecha, 10 pacientes que habían sido estériles durante más de cuatro años y/o tenían un historial de varios fracasos de IVF/ICSI sin ninguna explicación, fueron tratadas durante siete días en la fase lútea tardía de un ciclo previo inmediatamente antes del tratamiento de inducción de la ovulación comenzando el segundo día del siguiente ciclo y usando FSH recombinante o urinaria con agonista o antagonista de GnRH. Todas las pacientes obtuvieron embriones segmentados y se transfirieron uno o varios embriones a día 3 por paciente.

15

Para cada paciente, una muestra de sangre se recogió inmediatamente antes y después del tratamiento con ADNasa 1 para cuantificar el ADNlc en el plasma.

20 Seis de estas pacientes se quedaron embarazadas después de solamente un tratamiento de ese tipo, dando a luz a siete criaturas (un aborto, 4 partos individuales y 1 parto triple). Los datos relativos a los pacientes tratados se muestran en las tablas 1 y 2 a continuación:

Tabla 1: edad e historial de esterilidad de las pacientes incluidas

Paciente	Edad	Historial de esterilidad
# 1	28	5 fracasos de ART
# 2	33	8 fracasos de ART
# 3	32	4 fracasos de ART
# 4	35	6 Fracasos de ART
# 5	37	4 fracasos de ART
# 6	40	4 fracasos de ART
# 7	34	2 fracasos de ART
# 8	24	4 fracasos de ART
# 9	37	2 fracasos de ART; 10 años de esterilidad no explicada; un aborto después de ICSI
# 10	37	2 fracasos de ART

25

Tabla 2: concentraciones de ADNlc inmediatamente antes y después del tratamiento y resultado

Paciente	ADNlc antes del tratamiento (ng/ μ l)	ADNlc después del tratamiento (ng/ μ l)	Resultado
# 1	103,3	65,2	Dio luz a una única criatura
# 2	91,0	61,8	Dio luz a una única criatura
# 3	161,2	140,7	Dio luz a trillizos
# 4	110,0	78,3	Sin embarazo
# 5	116,1	56,0	Dio luz a una única criatura
# 6	153,5	124,9	Sin embarazo
# 7	160,7	138,7	Sin embarazo)
# 8	151,8	92,2	Dio luz a una única criatura
# 9	127,9	85,2	TESE (embarazo bioquímico)
# 10	87,8	77,2	Sin embarazo

Tal como aparece en la tabla 2, todas las pacientes que se quedaron embarazadas presentaban una disminución de ADNlc después de terapia con ADNasa I. Se consideró que el único aborto se debía a la mala calidad del espermatozoides. En ciertas pacientes que no se quedaron embarazadas, la caída de ADNlc era moderada, lo que sugería que la dosis de ADNasa I debe incrementarse en ciertos casos con niveles muy elevados de ADNlc.

Discusión

El corto tratamiento preventivo de mujeres de parejas estériles antes de IVF/ICSI, de acuerdo con sus niveles de

ADN libre, con ADNasa causó embarazo en más del 50% de los casos. Todas las mujeres tratadas mostraban más de 4 años de esterilidad no explicada o muchas transferencias de embriones, en fase temprana del desarrollo, sin implantación.

REFERENCIAS

5

1 - Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguine chez l'homme. C R Acad Sci Paris 1948; 142: 241-3.

2 - Huang ZH, Li LH, Hua D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. Cancer Lett 2006; 243: 64-70.

10 3 - to YM, Zhang J, Leung TN, y col. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. Am J Hum Genet 1999; 64: 218-24.

4 - Botezatu I, Serdyuk O, Potapova G, y col. Genetic analysis of DNA excreted in urine: a new approach for detecting specific genomic DNA sequences from cells dying in an organism. Clin Chem 2000; 46: 1078-84.

15 5 - Minchin RF, Carpenter D, Orr RJ. Polyinosinic acid and polycationic liposomes attenuate the hepatic clearance of circulating plasmid DNA. J Pharmacol Exp Ther 2001; 296: 1006-12.

6 - Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. Cancer Res 1975; 35: 2375-82.

7 - Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, y col. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 6407-11.

20 8 - Garcia-Olmo DC, Ruiz-Piqueras R, Garcia-Olmo D. Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) and its relation to stem cells and cancer metastasis: state of the issue. Histol Histopathol 2004; 19: 575-83.

9 - Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DS. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. Ann N Y Acad Sci 2006; 1075: 299-307.

25 10 - Zachariah R, Schmid S, Radpour R, Buerki N, Fan AX, Halm S, Holzgreve W, Zhong X.Y. Circulating cell-free DNA as a potential biomarker for minimal and mild endometriosis. Reprod Biomed Online. Marzo de 2009; 18(3): 407-11.

11 - Czamanski-Cohen J, Sarid O, Cwikel J, Lunenfeld E, Douvdevani A, Levitas E, Har-Vardi I. Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer. Reprod Biomed Online. Enero de 2013; 26(1): 36-41.

30

REIVINDICACIONES

1. Una ADNasa, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina.
- 5 2. La ADNasa de la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina asociada con un nivel de ADN libre de células estadísticamente mayor que el nivel de ADN libre de células en mujeres fecundas.
3. La ADNasa de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina, donde dicha mujer no tiene endometriosis.
- 10 4. La ADNasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina, donde dicha ADNasa es una ADNasa recombinante.
- 5 15 5. La ADNasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina, donde dicha ADNasa es ADNasa I.
6. La ADNasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina; donde dicha ADNasa se administra por vía intravenosa o intramuscular.
- 20 7. La ADNasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina, donde dicha ADNasa se administra a una mujer estéril durante la fase lútea tardía.
8. La ADNasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina humana.
- 25 9. La ADNasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina humana, donde al menos 2500 UI de ADNasa 1 se administran cada día a una mujer estéril, durante al menos 4 días.
- 30 10. La ADNasa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento de esterilidad femenina humana, donde 2500 UI de ADNasa I se administran dos veces al día a una mujer estéril, durante 7 días de la fase lútea tardía.
11. Un procedimiento para diagnosticar *in vitro* esterilidad en una hembra de mamífero, que comprende
35 las siguientes etapas:
 - (i) determinar el nivel de ADN libre de células en una muestra de fluido corporal de dicha hembra, y
 - (ii) comparar dicho nivel con un umbral predeterminado,
- 40 donde un nivel de ADN libre de células por encima de dicho umbral predeterminado es indicativo de esterilidad.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde dicha hembra no tiene endometriosis.
13. El procedimiento de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde la muestra de fluido corporal es
45 una muestra de plasma, suero, sangre o líquido folicular.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la hembra es humana.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, donde la muestra de fluido corporal es una muestra de
50 plasma y el umbral predeterminado está comprendido entre 50 ng/μl y 100 ng/μl.
16. Un kit para realizar el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende reactivos específicos para medir el nivel de ADN libre de células en una muestra biológica, y reactivos específicos para medir al menos otro parámetro fisiológico en una muestra biológica, donde dicho parámetro
55 fisiológico se selecciona entre el grupo que consiste en el nivel de hormona antimülleriana (AMH), actividad telomerasa y concentración de homocisteína.
17. El kit de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende al menos un agente intercalante de ADN y un anticuerpo que reconoce específicamente AMH.

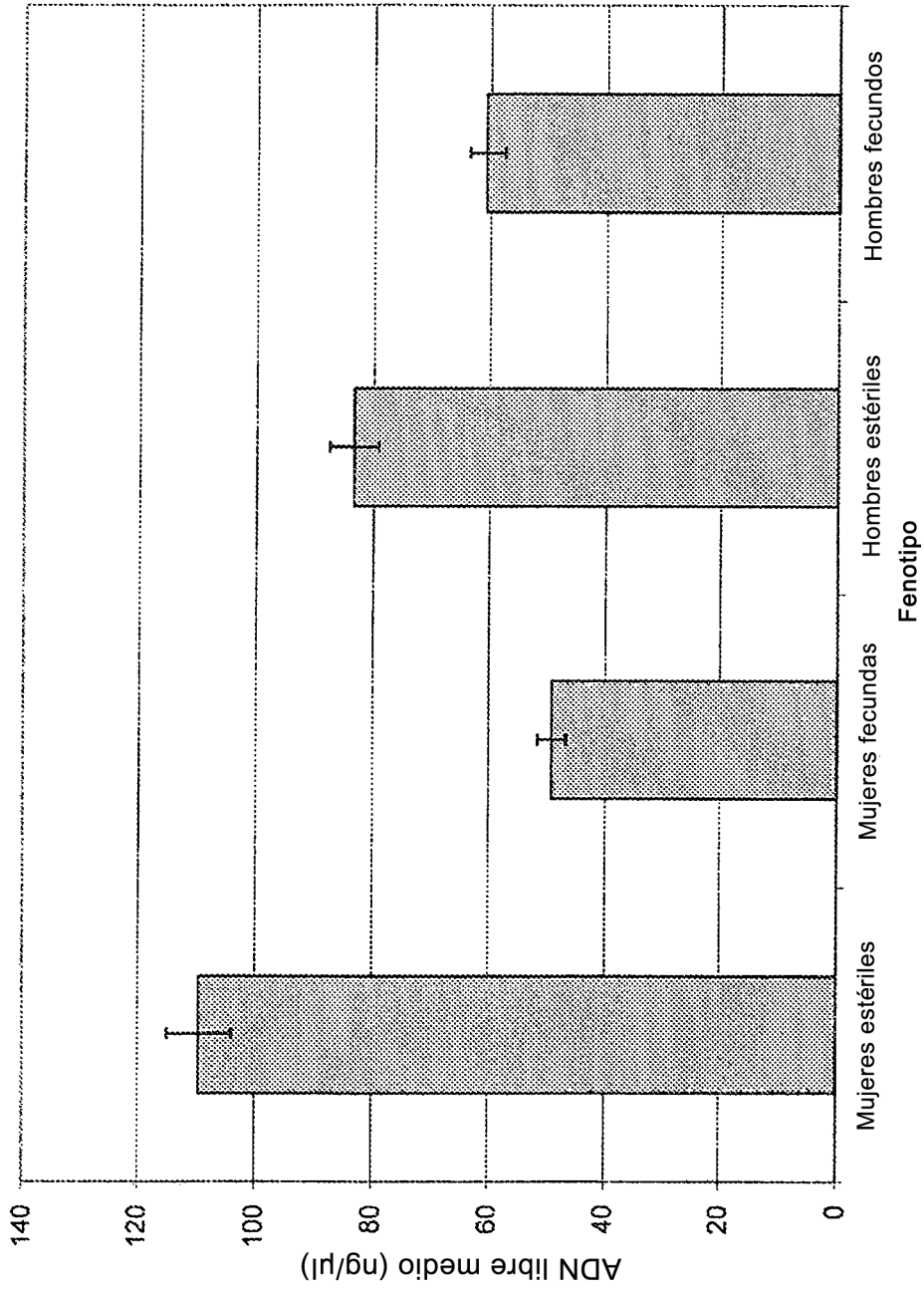


Figura 1

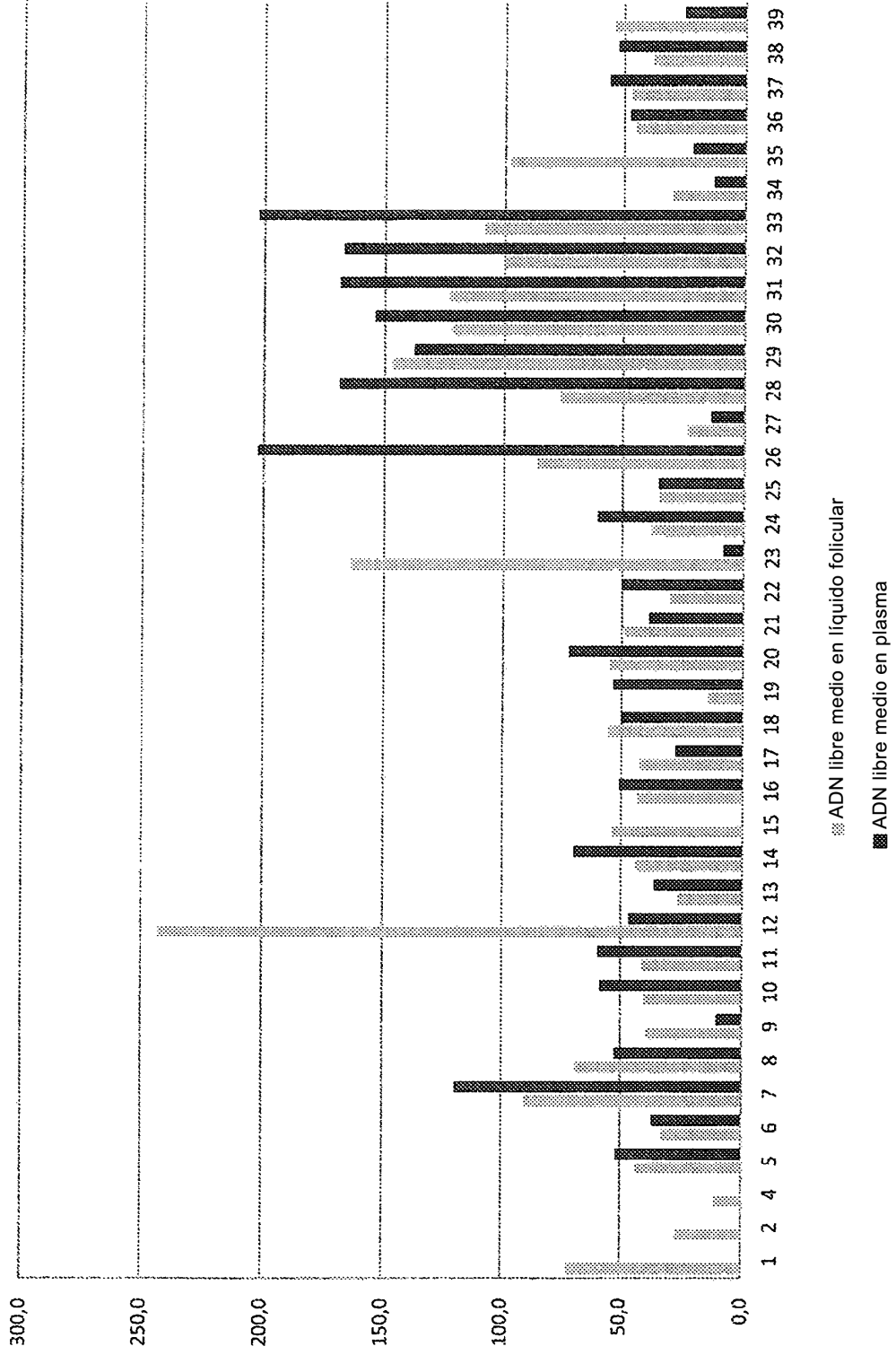


Figura 2