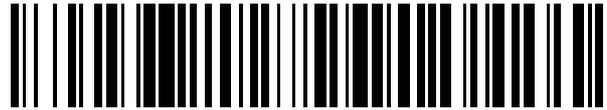


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 161**

51 Int. Cl.:

C12N 5/075 (2010.01)

C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2004 E 10177394 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2325201**

54 Título: **Uso de citocinas de tipo IL-6 para la maduración de ovocitos**

30 Prioridad:

26.11.2003 US 525279 P

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

26.04.2017

73 Titular/es:

**MERCK SERONO SA (100.0%)
Centre Industriel
1267 Coinsins, Vaud, CH**

72 Inventor/es:

**CLARK, ANN M.;
DE MATOS, DANIEL GUSTAVO;
JACKSON, JENNIFER A.;
PALMER, STEPHEN S. y
TRAN, CAM ANH T.**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 610 161 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

Uso de citocinas de tipo IL-6 para la maduración de ovocitos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procedimientos de maduración *in vitro* de ovocitos de mamíferos.

10

2. Descripción de la técnica relacionada

a. Ovario

15 [0002] El ovario de los mamíferos es responsable de la producción de ovocitos maduros a partir de células germinativas y de la producción de hormonas que permiten el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y una satisfactoria conclusión del embarazo. El ovario se divide aproximadamente en una corteza exterior y una médula vascular interior. El estroma del ovario abarca tanto la corteza, que contiene los folículos ováricos en diversas etapas de desarrollo, como las regiones medulares.

20

[0003] Un folículo maduro es una unidad altamente compleja con determinados tipos celulares definidos, y está formado por varias capas de células somáticas que rodean una cavidad llena de fluido, el "antro", en el que reside un único ovocito bañado por fluido folicular. El folículo proporciona los nutrientes y las señales reguladoras requeridas para el crecimiento y la maduración del ovocito.

25

[0004] Los ovocitos presentes en el ovario adulto se desarrollan a partir de un número definido de células germinativas primigenias (*primordial germ cells*, PGC) que migran desde zonas extragonadales a la cresta gonadal para formar el ovario primitivo durante el desarrollo fetal. Una vez establecidas en el ovario en desarrollo, las PGC en proliferación comienzan a diferenciarse en ovogonios, que son las células precursoras que dan lugar a todos los ovocitos del ovario. La población de ovogonios experimenta un número predeterminado y específico de cada especie de ciclos mitóticos hasta que las células entran en la profase de la meiosis y se transforman en ovocitos. La meiosis se detiene en la etapa diplotena de la profase y permanecen en esa etapa hasta que comienza la foliculogénesis en la pubertad. Los ovocitos primarios detenidos en la meiosis están contenidos en un folículo primigenio.

30

b. Folículos primigenios

[0005] Los folículos primigenios son las unidades fundamentales de desarrollo del ovario de los mamíferos. El número de folículos primigenios se determina durante las etapas tempranas de la vida y la mayoría de ellos permanece en un estado de reposo. La reserva de folículos primigenios no se renueva y se utiliza durante todo el periodo de vida reproductora del adulto. Antes y a lo largo de la vida reproductora de la hembra, varios de estos folículos primigenios abandonan el estado de reposo y comienzan a crecer (incorporación inicial). Los folículos se desarrollan hasta la etapa antral, en la que la mayoría experimentan una atresia; sin embargo, algunos de estos folículos son rescatados (incorporación cíclica) para alcanzar la etapa preovulatoria. El final de la vida reproductora normal se produce típicamente cuando se agota el conjunto de folículos primigenios en reposo.

45

c. Foliculogénesis

[0006] La foliculogénesis es el proceso responsable del desarrollo de los folículos reguladores y de la liberación de uno o más ovocitos maduros en un intervalo fijo a lo largo de la vida reproductora de una hembra. La foliculogénesis se reanuda después de una larga fase quiescente e implica transformaciones secuenciales subcelulares y moleculares por parte de diversos componentes del folículo. Durante la vida postnatal, los folículos ováricos continúan creciendo, madurando y bien ovulando o remitiendo. Los folículos son incorporados continuamente hasta que se agota la reserva original.

50

[0007] Los folículos primigenios se activan para transformarse en folículos primarios. Aunque los ovocitos procedentes de los folículos primigenios y primarios no tienen un tamaño significativamente diferente, se producen cambios importantes durante la etapa de folículo primario. La *corona radiata* desarrolla conexiones comunicantes con el ovocito, y comienza a formarse la zona pelúcida entre los dos tipos celulares. La zona pelúcida no rodeará

55

completamente al ovocito hasta que el folículo alcance la etapa preantral tardía. Los folículos secundarios comienzan a aparecer cuando las células foliculares de los folículos primarios experimentan una división mitótica intensa. Un folículo secundario contiene al menos dos capas de células de la granulosa, con las células de teca identificables fuera de la membrana basal, y el folículo contiene una fina red capilar. Los folículos terciarios o antrales están caracterizados por la presencia de una cavidad conocida como antro, que está llena de fluido folicular. Los primeros folículos antrales tienen una amplia red de conexiones comunicantes que permite la transferencia de nutrientes y señales reguladoras entre el ovocito y las células de la granulosa. Los folículos antrales se desarrollan hasta que alcanzan el tamaño preovulatorio. Dentro del folículo antral, las células del cumulus rodean al ovocito. *In vivo*, la expansión del complejo cumulus-ovocito (CCO) es inducida tras la aparición de la LH al final de la ovulación para preparar el ovocito para su fecundación.

d. Maduración del ovocito

[0008] La maduración del ovocito es un fenómeno complejo durante el cual el ovocito progresa desde la etapa diplotena hasta la metafase II (maduración nuclear) en respuesta a la aparición de la LH ovulatoria. Una vez alcanzada la etapa de metafase II, el ovocito permanece detenido hasta que tiene lugar la fecundación y el ovocito completa la meiosis y forma el pronúcleo. La maduración del ovocito también implica transformaciones a nivel citoplasmático para preparar la célula para sustentar la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (maduración citoplasmática). Las etapas finales de maduración del ovocito son cruciales para la adquisición de las propiedades funcionales necesarias para el desarrollo adicional.

e. Fecundación *in vitro*

[0009] La fecundación *in vitro* (FIV) de ovocitos humanos es una técnica médica ampliamente practicada que se usa para superar diversas formas de infertilidad femenina y masculina, abriendo así una vasta nueva frontera de investigación y tratamiento para las parejas infértiles. A pesar del éxito de la FIV, todavía existe una significativa necesidad de procedimientos mejorados de tratamiento de la infertilidad, porque aproximadamente una de cada cinco parejas son incapaces de conseguir un embarazo a término usando los actuales tratamientos de FIV.

[0010] Cuando se realizó por primera vez la FIV, se extrajo un ovocito maduro no fecundado del ovario justo antes de la ovulación. El ovocito maduro fue fecundado en una placa de laboratorio (*in vitro*) y el embrión resultante se transfirió de nuevo al útero de la mujer. Sin embargo, se descubrió que si había más ovocitos disponibles para la fecundación, habría más embriones disponibles para transferirlos al útero, y esto aumentó significativamente la tasa de embarazos. Por lo tanto, la actual práctica clínica implica inyectar a las pacientes hormonas con objeto de inducir la maduración de aproximadamente veinte ovocitos.

[0011] Los tratamientos de FIV estándar incluyen una larga fase de estimulación hormonal de la paciente femenina, por ejemplo, de 30 días, que comienza administrando un agonista o un antagonista de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para suprimir las propias hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) de la paciente. Esto se continúa con inyecciones de gonadotropinas exógenas, por ejemplo, FSH y/o LH, con objeto de asegurar el desarrollo de múltiples folículos preovulatorios. Justo antes de la ovulación, los múltiples ovocitos madurados *in vivo* se extraen de los ovarios. Los ovocitos maduros aislados son subsiguientemente fecundados *in vitro* y cultivados, típicamente durante entre tres y seis días, antes de transferir los embriones desarrollados de nuevo al útero en la etapa de 4-8 células.

[0012] Se han realizado continuos esfuerzos para optimizar y simplificar los procedimientos de FIV con objeto de mejorar las actuales tasas de embarazo de aproximadamente el 25% al 35%. Debido a las bajas tasas de embarazo, es habitual transferir entre dos y cinco embriones en un intento de aumentar las tasas de embarazo.

[0013] La administración de inyecciones hormonales para inducir la maduración simultánea de muchos ovocitos se conoce como hiperestimulación ovárica controlada (HOC). La ventaja de la HOC es la disponibilidad de muchos más ovocitos maduros para su fecundación, lo que aumenta la probabilidad de embarazo. Sin embargo, la mujer que experimenta la HOC debe ser estrechamente controlada mediante exámenes diarios con ultrasonidos de los ovarios y análisis de hormonas en sangre, porque la excesiva estimulación ovárica puede causar un síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO), que es una dolencia grave y potencialmente fatal. La HOC no es eficaz en algunas hembras, incluyendo algunas con enfermedad de ovario poliquístico.

f. Maduración *in vitro* de los ovocitos

[0014] Los efectos secundarios asociados con la HOC podrían evitarse si pudieran extraerse los ovocitos inmaduros de los ovocitos y madurarse *in vitro*. Los ovocitos de los mamíferos experimentan una maduración espontánea tras su extracción del folículo. Aunque los ovocitos madurados *in vitro* tienen unas tasas de maduración nuclear, fecundación y escisión similares a los ovocitos madurados *in vivo*, los ovocitos madurados *in vitro* tienen 5 unas tasas de blastocisto y un potencial de desarrollo significativamente menores.

[0015] Tempranamente en cada ciclo menstrual, varios ovocitos comienzan a crecer preparándose para experimentar la maduración y transformarse en competentes para su desarrollo, es decir, competentes para ser fecundados y desarrollarse hasta un feto sano. Aproximadamente entre el día quinto y séptimo del ciclo, un ovocito 10 se transforma en dominante y continúa creciendo, mientras que los demás ovocitos son inducidos para que degeneren. Una vez que un ovocito se transforma en dominante, crece y experimenta cambios metabólicos durante aproximadamente una semana antes de transformarse en maduro en el momento de la ovulación. Los ovocitos que no experimentan esta fase de crecimiento madurarán *in vitro* y pueden ser fecundados, pero es menos probable que sean competentes para su desarrollo. Por lo tanto, el momento óptimo para obtener el mayor número de ovocitos 15 inmaduros es tempranamente en el ciclo, antes de que ningún ovocito haya comenzado a degenerar. Sin embargo, es menos probable que los ovocitos extraídos tempranamente en el ciclo menstrual y madurados *in vitro* sean competentes para su desarrollo.

[0016] Numerosos acontecimientos dentro del folículo antral afectan a la maduración del ovocito y la 20 adquisición de la competencia para su desarrollo, incluyendo: (i) interacciones entre las células somáticas del folículo (en particular las células del cumulus) y el ovocito; (ii) la composición del fluido folicular; y (iii) la temperatura y la vascularización del entorno folicular. Muchos de estos factores cambian según el tamaño del folículo y el crecimiento del ovocito. Por el contrario, las condiciones de cultivo para la MIV se basan en células somáticas que a menudo no reflejan el entorno folicular, y/o tienen composiciones complejas o aditivos tales como complementos 25 macromoleculares que son de una naturaleza no definida. Se ha demostrado que los metabolitos incluidos típicamente en los medios de MIV tales como glucosa, piruvato, oxígeno y aminoácidos, tienen una diferente influencia sobre la maduración y la competencia de los ovocitos. La manipulación de estos factores y la aplicación de los conocimientos obtenidos del entorno *in vivo* pueden dar como resultado una mejora en la maduración *in vitro* de los ovocitos y en la producción global de embriones *in vitro*.

30

g. Citocinas de tipo IL-6

[0017] Las citocinas de tipo IL (interleucina)-6, que incluyen IL-6, IL-11, LIF (*leukemia inhibitory factor*, factor 35 inhibidor de leucemia), OSM (oncostatina M), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*, factor neurotrófico ciliar), CT-1 (cardiotrofina-1) y CLC (*cardiotrophin-like cytokine*, citotina de tipo cardiotrofina), activan genes objetivo implicados en la diferenciación, la supervivencia, la apoptosis y la proliferación. Las citocinas de tipo IL-6 se unen a complejos receptores de la membrana plasmática que contienen la común cadena de receptores transductores de señales gp 130 (glucoproteína 130). La transducción de señales implica la activación de miembros de la familias de las cinasas de tirosinas JAK (cinasa Janus), dando lugar a la activación de la familia de los factores de transcripción de los STAT 40 (*signal transducers and activators of transcription*, transductores de señales y activadores de la transcripción). Otra vía de señalización principal para las citocinas de tipo IL-6 es la cascada MAPK (*mitogen-activated protein kinase*, cinasa de proteína activada por mitógeno).

[0018] Los receptores implicados en el reconocimiento de las citocinas de tipo IL-6 pueden subdividirse en los 45 α -receptores no señalizantes y los receptores transductores de señales. Los α -receptores no señalizantes incluyen, pero no se limitan a, IL-6R α , IL-11R α y CNTFR α , en los que R se refiere al receptor. Los receptores transductores de señales incluyen, pero no se limitan, gp130, LIFR y OSMR. Los receptores traductores de señales se asocian con las JAKs y quedan fosforilados por tirosina en respuesta a la estimulación de las citocinas. Cada una de las citocinas de tipo IL-6 se caracteriza por un determinado perfil de incorporación de receptor, que en todos los casos implica al 50 menos una molécula de gp130.

[0019] Las IL-6, IL-11 y el CNTF se unen primero específicamente a sus respectivas subunidades α -receptoras. Aquí, únicamente el complejo de citocinas y α -receptor incorpora eficazmente las subunidades del receptor de señalización. Las IL-6 e IL-11 señalizan a través de homodímeros de la gp 130. La mayoría de las 55 demás citocinas de tipo IL-6 señalizan a través de heterodímeros bien de gp130 y el LIFR (LIF, CNTF, CT-1 y CLC) o bien el gp130 y el OSMR (OSM). La OSM es capaz de incorporar dos complejos receptores diferentes: ambos heterodímeros de LIFR-gp130 y de OSMR-gp130. El LIF y la OSM acoplan directamente sus subunidades del receptor de señalización sin la necesidad de subunidades adicionales α -receptoras.

1) LIF

[0020] El LIF desencadena una diversidad de efectos biológicos sobre muchos tipos celulares, incluyendo células precursoras embrionarias, células precursoras primigenias, neuronas, adipocitos, hepatocitos y osteoblastos.

- 5 El LIF afecta a varios tipos de células endocrinas (unidad útero-placenta, metabolismo óseo, adrenal, ovárico y testicular). La diversidad en su actividad biológica está reflejada en los diversos sinónimos del LIF, que incluyen factor estimulante de los hepatocitos III (*hepatocyte stimulating factor III*, HSF III; Baumann y Wong, J. Immunol. 143: 1163, 1989); factor de diferenciación del nervio colinérgico (*cholinergic nerve differentiation factor*, CNDF; Yamamori y col., Science 246: 1412, 1990); inhibidor de la lipasa de lipoproteína derivado de melanoma (*melanoma-derived lipoprotein lipase inhibitor*, MLPLI; Mori y col., Biochem. Biophys Res. Comm. 160: 1085, 1989); interleucina humana para células DA (*human interleukin for DA cells*, HILDA; Moreau y col., Nature 336: 690, 1988); factor de diferenciación (*differentiation factor*, D-factor; Tomida y col., J. Biol. Chem. 259: 10978, 1984); factor inhibidor de la diferenciación (*differentiation inhibitory factor*, DIF; Abe y col., J. Biol. Chem. 264: 8941, 1989); actividad inhibidora de la diferenciación (*differentiation inhibitory activity*, DIA; Smith y Hooper, Devel. Biol. 121:1, 1987); y factor retardante de la diferenciación (*differentiation retarding factor*, DRF; Koopman y Cotton, Exp. Cell. Res. 154: 233, 1984).

[0021] El LIF juega un papel central en la regulación de diversos sistemas adultos y embrionarios. En los sistemas reproductores, el LIF es una citocina importante en el embarazo temprano. De hecho, ratones hembras con el gen del LIF desactivado son infértiles debido a un defecto en el proceso de implantación embrionaria. El LIF está presente en el fluido folicular humano, y sus niveles se regulan según la etapa de desarrollo del folículo antral. Los niveles del LIF en el fluido folicular también responden a la gonadotropina coriónica humana (*human chorionic gonadotropin*, hCG). Las células de la granulosa cultivadas a partir de folículos maduros, pero no a partir de folículos inmaduros, muestran un aumento en la producción del LIF tras un tratamiento con β -hCG (GC- β humana), lo que sugiere que el LIF podría estar implicado en la ovulación y el desarrollo final del ovocito. Adicionalmente, se ha demostrado que el LIF estimula la transición del folículo primigenio a primario en ratas.

- 20 El LIF juega un papel central en la regulación de diversos sistemas adultos y embrionarios. En los sistemas reproductores, el LIF es una citocina importante en el embarazo temprano. De hecho, ratones hembras con el gen del LIF desactivado son infértiles debido a un defecto en el proceso de implantación embrionaria. El LIF está presente en el fluido folicular humano, y sus niveles se regulan según la etapa de desarrollo del folículo antral. Los niveles del LIF en el fluido folicular también responden a la gonadotropina coriónica humana (*human chorionic gonadotropin*, hCG). Las células de la granulosa cultivadas a partir de folículos maduros, pero no a partir de folículos inmaduros, muestran un aumento en la producción del LIF tras un tratamiento con β -hCG (GC- β humana), lo que sugiere que el LIF podría estar implicado en la ovulación y el desarrollo final del ovocito. Adicionalmente, se ha demostrado que el LIF estimula la transición del folículo primigenio a primario en ratas.

[0022] El LIF es también un factor importante en el cultivo *in vitro* de células precursoras embrionarias (*embryonic stem*, ES) y de células germinativas embrionarias (*embryonic germ*, EG). Las células EG o las células ES conservan el fenotipo de célula precursora *in vitro* cuando se cultivan en una capa alimentadora de fibroblastos cuando se cultivan en un medio condicionado por ciertas células o por la adición exógena de LIF. En ausencia de células alimentadoras o de medio condicionado o exógeno, las células LIF, ES o EG se diferencian espontáneamente en una amplia variedad de tipos celulares.

35 2) CT-1

[0023] La CT-1 provoca hipertrofia de los miocitos cardíacos y tiene efectos pleótropos sobre otros diversos tipos celulares. Pennica y col. (J Biol Chem., 5 de mayo de 1995; 270 (18): 10915-22) desvelan que la CT-1 inhibió la diferenciación de células precursoras embrionarias de ratón. Ensayos biológicos *in vitro* indicaron que la CT-1 era activa en ensayos en los que el LIF era activo, y viceversa. Estos datos demostraron que la CT-1 tiene un amplio intervalo de actividades hematopoyéticas, neuronales y de desarrollo, y que podría actuar a través del receptor del LIF y la subunidad de señalización de la gp130. Pennica y col. predicen que la CT-1 debería imitar los muchos efectos *in vitro* e *in vivo* del LIF.

- 45 **[0024]** El documento W09730146 desvela un procedimiento para mejorar el mantenimiento del embarazo en un mamífero cultivando un embrión en un medio que contiene CT-1 antes de la introducción del embrión en un mamífero. El documento WO9730146 sugiere que el medio que contiene CT-1 puede ser adecuado para procedimientos de manipulación temprana del ovocito/embrión tales como fecundación *in vitro*, segmentación de embriones y transferencia nuclear en los que las tasas de supervivencia de los embriones son bajas.

50

3) OSM

[0025] La Oncostatina M (OSM) es una citocina pleótrota producida tardíamente en el ciclo de activación de los linfocitos T y los macrófagos que ha sido ampliamente caracterizada, con numerosas actividades atribuidas a ella. La OSM se aisló originalmente a partir de medio condicionado de una línea celular de linfoma histiocítico tratada con éster de forbol, U937, basándose en la capacidad para inhibir el crecimiento o el desarrollo de una línea celular de melanoma humano.

55

[0026] La OSM se une a tres receptores de superficie celulares. La OSM se une a un polipéptido de la gp130,

también conocido como la subunidad de transducción de señales de IL-6, con una afinidad baja. En una segunda interacción de afinidad intermedia, la OSM y el LIF compiten por unirse a un receptor formado por el receptor de baja afinidad del LIF y la gp130. Este complejo receptor de afinidad intermedia es capaz de señalizar y ejercer efectos biológicos *in vitro*. Aunque este complejo receptor es compartido por las dos citocinas, la afinidad de la interacción y las señales biológicas proporcionadas por cada una de las citocinas son distintas. El tercer receptor reconocido por la OSM es un receptor de alta afinidad del que se sabe que no se une a otras citocinas. El receptor de alta afinidad de la OSM está formado por la gp130 y una subunidad conversora de afinidad que es requerida para la unión ligando-receptor de alta afinidad y funcional.

10 **4) IL-6**

[0027] La interleucina-6 (IL-6) es una citocina multifuncional que es producida por diversas células tales como linfocitos B, y linfocitos T, monocitos, fibroblastos y células endoteliales. La IL-6 muestra numerosas actividades relacionadas con la proliferación y/o la diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas. Estas actividades resultan de la acción de la IL-6 sola o en combinación con otras citocinas tales como IL-3 e IL-4. Algunos efectos biológicos específicos de la IL-6 incluyen la diferenciación terminal de los linfocitos B, la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T, la regulación de la respuesta en fase aguda, la regulación del crecimiento de las células epiteliales, la diferenciación de los megacariocitos y la trombopoyesis. Según estas actividades y efectos, las células objetivo de la IL-6 incluyen linfocitos B, linfocitos T, células de mieloma, megacariocitos, monocitos, células precursoras tempranas y hepatocitos.

[0028] Aunque la IL-6 es una citocina multifuncional, se cree que los diversos efectos biológicos que ejerce están iniciados por la interacción gradual de la IL-6 con dos subunidades receptoras distintas de una célula. En primer lugar, la IL-6 forma un complejo con una subunidad receptora de 80 kD. Este complejo se une a una subunidad no ligando, que es una glucoproteína de membrana denominada gp130. La unión del complejo receptor IL-6-80kD a la gp130 da como resultado la transducción de señales.

5) sIL-6R α

[0029] El sistema receptor para la IL-6 comprende dos cadenas funcionalmente diferentes: una cadena de unión a ligando (IL-6R) y una cadena que no se une a ligando, sino transductora de señales (gp130). La cadena gp130 se asocia con el complejo IL-6R/IL-6, dando como resultado la formación de sitios de unión de alta afinidad de la IL-6 y la transducción de señales. Se ha demostrado que una forma extracelular soluble del receptor de la interleucina-6 (sIL-6R) media en la señal de la IL-6 a través de la gp130 anclada a la membrana.

6) Quimera IL-6/sIL-6R α

[0030] Puede asociarse un complejo de sIL-6R e IL-6 (quimera IL-6/sIL-6R α) con la gp130 expresada tanto en células negativas para IL-6R como positivas para IL-6R. Esta asociación induce la homodimerización de la gp130 y la activación de la vía JAK-STAT, dando así lugar a la respuesta celular.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0031] La presente descripción se refiere a un procedimiento de maduración de un ovocito *in vitro*, que comprende incubar un ovocito inmaduro en un medio fisiológicamente aceptable que comprende un LIF.

[0032] El ovocito puede estar en la etapa de un folículo antral temprano o un folículo antral.

[0033] El medio utilizado puede comprender además FSH, hCG o una combinación de los mismos. Alternativamente, el medio puede no contener FSH, hCG o una combinación de los mismos.

[0034] La presente descripción también se refiere a un ovocito maduro producido mediante un procedimiento que comprende incubar un ovocito inmaduro en un medio fisiológicamente aceptable que comprende una citocina de tipo IL-6.

[0035] La presente descripción también se refiere a un procedimiento de fecundación *in vitro* que comprende incubar espermatozoides con un ovocito maduro, en el que dicho ovocito maduro se produce mediante un procedimiento que comprende incubar un ovocito inmaduro en un medio fisiológicamente aceptable que comprende una citocina de tipo IL-6.

[0036] La presente descripción también se refiere a un embrión producido mediante un procedimiento que comprende incubar esperma con un ovocito maduro *in vitro*, en el que dicho ovocito maduro se produce mediante un procedimiento que comprende incubar un ovocito inmaduro en un medio fisiológicamente aceptable que comprende una citocina de tipo IL-6.

[0037] La presente descripción también se refiere a un procedimiento de tratamiento de la infertilidad que comprende implantar un embrión producido mediante un procedimiento que comprende incubar esperma con un ovocito maduro *in vitro*, en el que dicho ovocito maduro se produce mediante un procedimiento que comprende incubar un ovocito inmaduro en un medio fisiológicamente aceptable que comprende una citocina de tipo IL-6.

[0038] Un aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para la maduración *in vitro* de ovocitos tal como se establece en la reivindicación 1.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0039]

La Figura 1 representa el efecto dosis-respuesta del LIF AS900230-7 sobre la expansión del cumulus;
 La Figura 2 representa el efecto dosis-respuesta del LIF AS900230-1 sobre la expansión del cumulus;
 20 La Figura 3 representa el efecto dosis-respuesta del LIF A900227-1 sobre la expansión del cumulus;
 La Figura 4 representa el efecto dosis-respuesta del LIF sobre la expansión del cumulus;
 La Figura 5 representa el efecto dosis-respuesta de la CT-1 AS900915-1 sobre la expansión del cumulus;
 La Figura 6 representa el efecto dosis-respuesta de la oncostatina AS901a65-1 sobre la expansión del cumulus;
 La Figura 7 representa el efecto dosis-respuesta de la IL-6 AS901167-1 humana sobre la expansión del cumulus;
 25 La Figura 8 representa el efecto dosis-respuesta de la IL-6 AS900038-7 humana sobre la expansión del cumulus;
 La Figura 9 representa el efecto dosis-respuesta de la sIL-6R α sobre la expansión del cumulus;
 La Figura 10 representa el efecto dosis-respuesta de la IL-6R α (1-339)-6His AS900419 sobre la expansión del cumulus; y
 La Figura 11 representa el efecto dosis-respuesta de la quimera IL-6/sIL-6R α AS901166 sobre la expansión del
 30 cumulus.
 La Figura 12 muestra el efecto del LIF sobre la tasa de ovocitos fecundados *in vitro*.
 La Figura 13 muestra el efecto del LIF sobre la tasa de ovocitos fecundados *in vitro*.
 La Figura 14 muestra el efecto del LIF sobre la tasa total de formación de blastocistos.
 La Figura 15 muestra el efecto del LIF sobre la tasa total de formación de blastocistos.
 35 La Figura 16 muestra el efecto del LIF sobre la tasa de formación de blastocistos a partir de embriones de 2 células.
 La Figura 17 muestra el efecto del LIF sobre las tasas de nacimientos.
 La Figura 18 muestra el efecto del LIF sobre las tasas de nacimientos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 **[0040]** Según se describió anteriormente, el proceso de ovogénesis es un proceso extremadamente complejo relacionado con la construcción de un ovocito que contiene una gran y compleja dote de recursos para la construcción del embrión.

45 1. Maduración *in vitro*

[0041] La presente descripción se refiere al uso de ciertas citocinas de tipo IL-6 para la maduración de ovocitos *in vitro*.

50 a. Ovocitos

[0042] Los ovocitos inmaduros usados en la práctica de la presente invención se recuperan a partir de una hembra cuando los ovocitos están en etapas de desarrollo que incluyen, pero no se limitan a, antrales tempranos y folículos antrales.

55 **[0043]** Los ovocitos inmaduros pueden recuperarse a partir de una hembra que no ha experimentado una terapia hormonal externa. Alternativamente, los ovocitos inmaduros pueden recuperarse a partir de una en la que ha experimentado terapia hormonal externa. La hembra puede haber recibido hormonas que incluyen, pero no se limitan a, GnRH, FSH, LH o hCG. Las hormonas pueden haber sido administradas en combinación o

secuencialmente en cualquier orden.

[0044] Los ovocitos inmaduros pueden recuperarse a partir de la hembra mediante procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, ecografía y aspiración. Los ovocitos inmaduros pueden criopreservarse tras su aislamiento y descongelarse en un momento posterior para su maduración *in vitro*.

b. Maduración

[0045] Los ovocitos inmaduros aislados se incuban en un medio de cultivo que comprende LIF.

[0046] El medio de cultivo puede ser cualquier medio de cultivo fisiológicamente aceptable que incluye, pero no se limita a, TCM 199, aMEM y Ham's F10. El medio de cultivo puede comprender adicionalmente otros factores que incluyen, pero no se limitan a, FSH, hCG, estradiol, cisteamina, piruvato sódico, glutamina y suero o fluido folicular autólogo inactivado por calor. El medio de cultivo puede comprender ciertas citocinas de tipo IL-6 junto con FSH, hCG, estradiol, cisteamina, piruvato sódico, glutamina y suero o fluido folicular autólogo inactivado por calor o una combinación de los mismos. El medio de cultivo también puede comprender ciertas citocinas de IL-6 y carecer de FSH y/o hCG.

[0047] Los ovocitos inmaduros se incuban en el medio de cultivo a unas temperaturas que incluyen, pero no se limitan a, desde aproximadamente 37°C hasta aproximadamente 39°C durante un periodo de tiempo que incluye, pero no se limita a, aproximadamente 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66 ó 72 horas. Los ovocitos se incuban hasta que se produce la maduración evidenciada mediante procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, una inspección visual bajo el microscopio de la ruptura de la vesícula germinal (*germinal vesicle break down*, GVBD), la expansión del cumulus, la formación en placa de metafase II (*metaphase II plate formation*, MII), la extrusión del cuerpo polar, o ensayos funcionalmente mediante fecundación *in vitro* y producción de embriones.

c. Producción de embriones

[0048] Los ovocitos inmaduros pueden incubarse con esperma *in vitro* para producir embriones de mamíferos usando procedimientos de fecundación *in vitro* estándar (véase Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory & Clinical Perspectives, editado por Gardner, y col., 2001 Martin Ddunetz Ltd., Londres). El embrión puede implantarse en el útero de una hembra capaz de llevar el embrión a término.

2. Citocinas IL-6

[0049] Las citocinas de tipo IL-6 incluyen, pero no se limitan a, aquellas citocinas que se unen a heterodímeros de LIFR-gp130, heterodímeros de OSMR-gp130 y homodímeros de gp130. Las citocinas de tipo IL-6 también incluyen, pero no se limitan a, aquellas citocinas que no se unen a IL-11R α y CNTFR α .

[0050] Las citocinas de tipo IL-6 son una subfamilia de citocinas en haz de hélice que comprenden cuatro largas hélices α denominadas A, B, C y D, que están dispuestas de una forma que da lugar a una topología arriba-arriba-abajo-abajo. Al contrario que la IL-6 y probablemente también que la IL-11, en las que todas las hélices son lineales, la hélice A de LIF, OSM y CNTF es ondulada. Las citocinas lineales pueden señalar a través del homodímero de gp130, mientras que las citocinas onduladas pueden señalar a través de los heterodímeros de LIFR-gp 130 u OSMR-gp 130. Las citocinas de tipo IL-6 incluyen, pero no se limitan a, IL-6, LIF, OSM, CT-1 y quimera IL-6/sIL-6Ra, así como fragmentos, análogos, homólogos, variantes y derivados de las mismas que conserven una actividad biológica de dicha citocina de tipo IL-6.

[0051] Según se usa en este documento, el término "análogo", cuando se usa en el contexto de una citocina de tipo IL-6, significa un péptido o polipéptido que comprende uno o más aminoácidos no estándar u otras variaciones estructurales a partir del conjunto convencional de aminoácidos.

[0052] Según se usa en este documento, el término "derivado", cuando se usa en el contexto de una citocina de tipo IL-6, significa un péptido o polipéptido diferente en una estructura distinta a la primaria (aminoácidos y análogos de aminoácidos). A modo de ilustración, los derivados pueden diferir por estar glucosilados, una forma de modificación post-traduccional. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos pueden exhibir patrones de glucosilación debidos a la expresión en sistemas heterólogos. Si se conserva al menos una actividad biológica, entonces estos péptidos o polipéptidos son derivados según la invención. Otros derivados incluyen, pero no se limitan a, péptidos de fusión o polipéptidos de fusión con un N o C terminal modificado covalentemente, péptidos o polipéptidos PEGilados,

péptidos o polipéptidos asociados con fracciones lipídicas, péptidos o polipéptidos alquilados, péptidos o polipéptidos unidos a través de un grupo funcional de cadena lateral de aminoácidos a otros péptidos, polipéptidos o compuestos químicos, y modificaciones adicionales, como se comprenderá en la materia.

5 **[0053]** Según se usa en este documento, el término "fragmento", cuando se usa en el contexto de una citocina de tipo IL-6, significa un péptido de desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. El fragmento puede tener 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 aminoácidos de longitud.

10 **[0054]** Según se usa en este documento, el término "homólogo", cuando se usa en el contexto de una citocina de tipo IL-6, significa un péptido o polipéptido que comparte un ancestro evolutivo común.

[0055] Según se usa en este documento, el término "variante", cuando se usa en el contexto de una citocina de tipo IL-6, significa un péptido o polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos mediante la inserción, la 15 delección o la sustitución conservativa de aminoácidos, pero que conserva al menos una actividad biológica. Para el propósito de la presente invención, "actividad biológica" incluye, pero no se limita a, la capacidad de ser unida por un anticuerpo o específico.

[0056] En la materia se reconoce que una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, sustituir un 20 aminoácido por un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofilia, grado y distribución de las regiones cargadas), implica típicamente un cambio menor. Estos cambios menores pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de los aminoácidos, según se entiende en la materia. Kyte y col., J. Mol Biol. 157: 105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido se basa en una consideración de su hidrofobicidad y carga. En la materia se sabe que los aminoácidos con índices hidropáticos similares pueden ser sustituidos y conservar aún 25 la función proteica. En un aspecto, están sustituidos los aminoácidos con índices hidropáticos de $\forall 2$. La hidrofilia de los aminoácidos también puede usarse para revelar sustituciones que darían como resultado proteínas que conservan la función biológica. Una consideración de la hidrofilia de los aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la mayor hidrofilia media local de ese péptido, una medida útil de la que se ha informado que se correlaciona bien con la antigenicidad y la inmunogenicidad. Patente de EE.UU. nº 4.554.101. La sustitución de 30 aminoácidos con unos valores de hidrofilia similares puede dar como resultado péptidos que conservan la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como se entiende en la materia. En un aspecto, las sustituciones se realizan con aminoácidos con unos valores de hidrofilia de ± 2 entre sí. Tanto el índice de hidrofobicidad como el valor de hidrofilia de los aminoácidos están afectados por la cadena lateral en particular de ese aminoácido. Coherentemente con esa observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la 35 función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos, y particularmente de las cadenas laterales de esos aminoácidos, según se revela por la hidrofobicidad, la hidrofilia, la carga, el tamaño y otras propiedades.

[0057] Adicionalmente, hay disponibles algoritmos informatizados para ayudar a predecir los dominios de la 40 secuencia de aminoácidos que probablemente estén más accesibles a un disolvente acuoso. Estos dominios se conocen en la materia por estar frecuentemente dispuestos hacia el exterior de un péptido, contribuyendo así potencialmente a la unión de determinantes, incluyendo determinantes antigénicos.

[0058] La presente invención tienen múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes.

45 **EJEMPLO 1**

Efecto del LIF sobre la expansión *in vitro* del cumulus del complejo cumulus-ovocito

[0059] Se ensayó la capacidad del LIF de inducir la expansión del cumulus de CCOs murinos *in vitro*. Se 50 sensibilizaron ratones hembra CD-1 de siete a ocho semanas de edad (Charles River) con PMSG (5 UI/hembra, Calbiochem). Las hembras se sacrificaron 48 horas después mediante hipoxemia progresiva. Se aplicó alcohol (70%) a la región abdominal de los animales para limpiar la zona, y también para disminuir la contaminación de las muestras con pelo. Se realizó una incisión ventral para exponer la cavidad abdominal. Se separaron los ovarios conectados con los oviductos del cuerno uterino y el tejido adiposo visceral. Se añadieron diez ovarios a tubos 55 (Coming) que contenían 3 ml de medio L-15 (Gibco) más un 10% de suero bovino fetal (*fetal calf serum*, FCS) y se mantuvieron a 37°C.

[0060] El contenido de cada tubo se transfirió posteriormente a una placa de Petri de 60 x 15 mm (Falcon). Se eliminó el almohadillado graso y el oviducto de los ovarios mediante unas tijeras o con agujas de calibre 27 bajo un

estereomicroscopio (Nikon SM2-800) con una etapa de calentamiento en una placa térmica. Los ovarios limpios se colocaron entonces en una nueva placa de Petri rellena con 2-3 ml de medio nuevo (L15 + 10% de FCS).

[0061] Los CCOs fueron recuperados mediante la ruptura mecánica de cada ovario con agujas y colocados en una nueva placa de Petri de 35 x 10 mm rellena con medio nuevo (L15 + 10% de FCS). Se seleccionaron los ovocitos con el cumulus intacto sobre la base de un citoplasma homogéneo usando un estereomicroscopio de pocos aumentos (20-30 X). Se transfirieron dos CCOs mediante una pipeta con boca de vidrio a cada pocillo de una placa de 96 pocillos que contenía 90 µl de medio de cultivo (αMEM [Gibco] con un 10% de FCS y antibióticos PenStrep [Invitrogen]) sin un aceite mineral. Antes de la adición de los CCOs a la placa de 96 pocillos, el medio de la placa se pre-equilibró durante un periodo de 1 hora a 37°C en una estufa de incubación humidificada con un 5% de CO₂. Después de la adición de los CCOs a cada pocillo se añadieron diferentes lotes de LIF en un volumen de 10 µl, de forma que el volumen final en cada pocillo era de 100 µl. Cada placa de 96 pocillos contenía 4 pocillos de un "Control Negativo" que contenía αMEM y FCS, y 4 pocillos de un "Control Positivo" que contenía αMEM, FCS y 5 ng/ml de EGF (Sigma). Se desarrollaron dos placas, duplicadas, por ensayo. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C en una estufa de incubación humidificada con un 5% de CO₂

[0062] Entonces cada CCO se inspeccionó visualmente usando un microscopio invertido Nikon para identificar la formación de una matriz extracelular mucoide por parte de las células del cumulus, que es un indicador de la expansión del cumulus. El porcentaje de expansión del cumulus se definió como el número de CCOs expandidos con respecto a los CCOs totales que se usaron en cada grupo de tratamiento. Si algún lote de LIF inducía una expansión mayor del 50% en los CCO, se consideraba positivo, y entonces todas las formas del LIF eran ensayadas de nuevo en un ensayo de reconfirmación. Entonces se evaluaron los lotes positivos confirmados de LIF en pruebas de dosis-respuesta. Las pruebas de dosis-respuesta se realizaron como se describe, pero se asignaron 3 pocillos con de 4 a 5 CCOs por pocillo a cada concentración de LIF.

[0063] Las tasas de maduración *in vitro* de las diferentes formas y lotes de LIF se muestran en la Tabla 1. La mayoría de las formas y lotes de LIF probados inducía la expansión del cumulus (expansión del 20 al 100 %). Únicamente AS900227-1 falló a la concentración ensayada en la inducción de la expansión del cumulus.

Tabla 1 – Cribado primario de MIV

LIF # - lote #	Forma	Origen	Ovocitos totales	Ovocitos expandidos	% de expansión ¹
AS900230-1	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	5	5	100%
AS900230-2	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	5	5	100%
AS900230-3	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	5	5	100%
AS900230-4	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	5	4	80%
AS900230-5	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	4	4	100%
AS900230-6	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	4	2	50%
AS900230-7	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	5	5	100%
AS900230-8	LIF-ATT-6HIS	Células HEK	4	2	20%
AS900227-1	LIF-6HIS	Células HEK	4	4	0%
AS900227-4	LIF-6HIS	Células HEK	4	2	50%
AS900001-2	LIF (calidad clínica)	<i>E. coli</i>	4	1	25%

¹ Los controles positivos fueron del 100% y los controles negativos fueron del 0%

[0064] Como reconfirmación de los positivos del cribado primario de MIV, se evaluaron 2 formulaciones de LIF (AS900230-1 y AS900227-4) frente a dos formas comerciales de LIF (Antigenix y Calbiochem). Los resultados de los ensayos de reconfirmación de MIV se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2 – Reconfirmación del ensayo de MIV

LIF # - lote #	Origen	Ovocitos totales	Ovocitos expandidos	% de expansión ¹
AS900230-1	Serono	5	5	100%
AS900227-4	Serono	5	4	80%
LIF	Calbiochem	5	3	60%
LIF	Antigenix	5	5	100%

¹ Los controles positivos fueron del 100% y los controles negativos fueron del 0%

[0065] Basándonos en los resultados positivos de los ensayos de cribado primario de MIV y de reconfirmación de MIV, se realizó un análisis de dosis-respuesta para AS900230-7 (Figura 1), AS900230-1 (Figura 2), AS900227-1 (Figura 3) y LIF de Antigenix (Figura 4). Aunque AS900227-1 era el único LIF incapaz de inducir la expansión del cumulus en el cribado primario de MIV, era capaz de inducir la expansión del cumulus en pruebas de dosis-respuesta de una forma dependiente de la dosis. La ausencia de una expansión del 50% en el cribado primario por parte de AS900227-1 puede haber sido debida a problemas con la dilución.

15 **EJEMPLO DE REFERENCIA 2**

Efecto de la CT-1 y la OSM sobre la maduración *in vitro* del cumulus del complejo cumulus-ovocito

[0066] Se ensayó la capacidad de la CT-1 y de la OSM para inducir la expansión *in vitro* del cumulus de los CCOs de la forma descrita en el Ejemplo 1. Según se muestra en la Tabla 3, la CT-1 murina (Preprotech, nº de Catálogo 250-25, lote 021203) y la OSM humana AS901165-1 (Calbiochem, nº de Catálogo 496260, lote B30866) indujeron una expansión del 100% del cumulus a 1 µg/ml y 500 ng/ml. Basándonos en los resultados positivos para la CT-1 murina y la OSM humana, se repitió el ensayo de MIV a diferentes concentraciones para determinar la dosis-respuesta de la CT-1 (AS900915-1) (Figura 5) y la OSM (AS901165-1; Figura 6) humanas.

25

Tabla 3 – Ensayo de MIV

Familia de IL-6	Concentración	Expandidos	Total	% ¹	Media	D. T.
CT-1 murina	1 µg/ml	3	3	100		
(Cardiotrofina-1)		3	3	100	100,0	0,0
	500 ng/ml	3	3	100		
		3	3	100	100,0	0,0
OSM	1 µg/ml	3	3	100		
(Oncostatina M)		3	3	100	100,0	0,0
	500 ng/ml	3	3	100		
		3	3	100	100,0	0,0

Total = ovocitos totales evaluados
 Expandidos = número de ovocitos expandidos
¹ Los controles positivos fueron del 100% y los controles negativos fueron del 0%

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

30 **Comparación entre la CT-1 humana y la CT-1 murina**

[0067] Se realizó otro ensayo de MIV para comparar la dosis-respuesta de la CT-1 murina frente a la CT-1 humana. Los resultados de la Tabla 4 indican que tanto la CT-1 humana como la CT-1 murina inducen la expansión *in vitro* del cumulus de los CCOs.

5

Tabla 4 – Ensayo de MIV

Familia de IL-6	Concentración	Expandidos	Total	% ¹	Media	D. T.
CT-1 murina	1 µg/ml	2	2	100		
(Cardiotrofina-1)		2	2	100	100,0	0,00
	100 ng/ml	2	2	100		
		2	2	100	100,0	0,00
	10 ng/ml	2	2	100		
		2	2	100	100,0	0,00
	1 ng/ml	1	2	50		
		1	2	50	50,0	0,00
CT-1 humana	1 µg/ml	2	2	100		
(Cardiotrofina-1)		2	2	100	100,0	0,0
AS900915-1	100 ng/ml	2	2	100		
		2	2	100	100,0	0,0
	10 ng/ml	2	2	100		
		2	2	100	100,0	0,0
	1 ng/ml	0	2	0		
		0	2	0	0,0	0,0
Total = ovocitos totales evaluados						
Expandidos = número de ovocitos expandidos						
¹ Los controles positivos fueron del 100% y los controles negativos fueron del 0%						

EJEMPLO 4

10 Efecto de la IL-6 y la sIL-6Rα sobre la maduración *in vitro* del cumulus del complejo cumulus-ovocito

[0068] Basándonos en la capacidad del LIF, la CT-1 y la OSM de inducir la expansión *in vitro* del cumulus de los CCOs según se muestra en los Ejemplos 1-3, también ensayamos la IL-6 y la sIL-6Rα. Los resultados de la Tabla 5 indican que la IL-6 y la sIL-6Rα también inducen la expansión *in vitro* del cumulus.

15

Tabla 5 - Ensayo de MIV

Familia de IL-6	Concentración	Expandidos	Total	% ¹	Media	D. T.
IL-6	2 µg/ml	4	4	100		
(Peprotech)		2	3	67	83,3	23,6
	1 µg/ml	1	3	33		
		2	3	67	50,0	23,6
	500 ng/ml	0	3	0		
		0	3	0	0,0	0,0
sIL-6Rα	2 µg/ml	2	3	67		
(Peprotech)		1	3	33	50,0	23,6
	1 µg/ml	0	3	0		
		0	3	0	0,0	0,0
	500 ng/ml	1	3	33		
		1	3	33	33,3	0,0
Total = ovocitos totales evaluados						
Expandidos = número de ovocitos expandidos						
¹ Los controles positivos fueron del 100% y los controles negativos fueron del 0%						

[0069] Basándonos en los resultados anteriores, se realizó un ensayo adicional de MIV para determinar la dosis-respuesta de diferentes formas de la IL-6 (Tabla 6). Las Figuras 7-8 muestran que se produce una moderada expansión del cumulus con cantidades relativamente mayores de IL-6. Las Figuras 9-10 muestran la dosis-respuesta para las diferentes formas de la sIL-6Rα.

Tabla 6 - Ensayo de MIV

Familia de IL-6	Concentración	Expandidos	Total	% ¹	Media	D. T.
IL-6	3 µg/ml	4	4	100		
(Peprotech)		4	4	100		
		4	4	100	100,0	0,0
	1,8 µg/ml	4	4	100		
		3	4	75		
		2	4	50	75,0	25,0
	1,4 µg/ml	1	4	25		
		4	4	100		
		2	4	50	58,3	38,2
	1 µg/ml	1	4	25		
		2	4	50		
		2	4	50	41,7	14,4
IL-6	3 µg/ml	0	4	0		
(AS900073-2)		0	4	0	0,0	0,0
	2 µg/ml	2	4	50		
		0	4	0	25,0	35,4
	1 µg/ml	0	4	0		
		1	4	25	12,5	17,6
IL-6-D-ATT-6His	3 µg/ml	0	4	0		
(AS900226-1)		0	4	0	0,0	0,0

	2 µg/ml	4	4	100		
		0	4	0	50,0	70,7
	1 µg/ml	1	4	25		
		0	4	0	12,5	17,6
Total = ovocitos totales evaluados Expandidos = número de ovocitos expandidos ¹ Los controles positivos fueron del 100% y los controles negativos fueron del 0%						

EJEMPLO 5

Efecto de la IL-6/sIL-6Rα sobre la maduración *in vitro* del cumulus del complejo cumulus-ovocito

- 5
- [0070] Basándonos en la capacidad de la IL-6 y la sIL-6Rα para inducir individualmente la expansión *in vitro* del cumulus de los CCOs según se muestra en el Ejemplo 4, probamos la capacidad de la quimera IL-6/sIL-6Rα para inducir la expansión *in vitro* del cumulus. La Tabla 7 muestra que la quimera IL-6/sIL-6Rα era capaz de inducir la expansión *in vitro* del cumulus de los CCOs. La dosis-respuesta de la quimera IL-6/sIL-6Rα de la Figura 11 indica
- 10 que la quimera es más potente que la IL-6 o la sIL-6Rα para inducir la expansión *in vitro* del cumulus. Además, la inducción por IL-6/sIL-6Rα es menos variable.

Tabla 7 - Ensayo de MIV

Familia de IL-6	Concentración	Expandidos	Total	% ¹	Media	D. T.
IL-6/sIL-6Rα	3 µg/ml	4	4	100		
		4	4	100	100,0	0,0
	2 µg/ml	4	4	100		
		4	4	100	100,0	0,0
	1 µg/ml	4	4	100		
		4	4	100	100,0	0,0
Total = ovocitos totales evaluados Expandidos = número de ovocitos expandidos ¹ Los controles positivos fueron del 100% y los controles negativos fueron del 0%						

15 **EJEMPLO 6**

Efecto del LIF sobre la calidad de los ovocitos madurados *in vitro*

- [0071] Según se muestra en los Ejemplos 1-5, las citocinas de tipo IL-6 inducen la maduración *in vitro* de los
- 20 ovocitos. Estimulan la expansión del cumulus de una forma dependiente de la dosis. A continuación probamos los efectos de una citocina de tipo IL-6 sobre la calidad de los ovocitos madurados *in vitro* midiendo la tasa de fecundación, la tasa de blastocistos y la tasa de nacimientos.

- [0072] Se aislaron CCOs murinos a partir de ratones hembra B6CBAF1/J de siete a ocho semanas de edad
- 25 (Jackson labs) según se describe en el Ejemplo 1. Los CCOs recuperados se maduraron *in vitro*, según se describió anteriormente, en una MIV que contenía 1,5 UI/ml de rhCG (*recombinant human chorionic gonadotropins*, gonadotropinas coriónicas humanas recombinantes). Se realizaron repeticiones de los experimentos en días diferentes con diferentes lotes de ovocitos. Los ovocitos se maduraron en presencia de 1.000, 1 ó 0,1 ng/ml de LIF (Antigenix America, HC88832), con o sin 0,2 UI de rFSH (*recombinant human follicle stimulating hormone*, hormona foliculoestimulante humana recombinante). Se incluyó un grupo de control negativo (medio de MIV sin LIF ni FSH) y un grupo de control positivo (ovocitos madurados *in vivo* = ovocitos ovulados). Los ovocitos madurados *in vitro* se
- 30 prepararon administrando PMSG a ratones, seguido, 48 horas después, por 5 UI de hCG (ip). 18 horas después de la sensibilización con hCG (día de la fecundación *in vitro*), las hembras se sacrificaron y se extrajeron los ovarios y los oviductos. Se obtuvieron los CCOs mediante ruptura mecánica.

- 35 [0073] Los CCOs madurados *in vitro* e *in vivo* se lavaron con medio de fecundación *in vitro* (FIV) (KSOM complementado con un 3% de BSA, fracción V [Sigma]) y después se colocaron en microgotas de 50 µl bajo aceite

mineral. Entonces se añadieron los espermatozoides a una concentración de $2 \times 10^6/\text{ml}$. Las suspensiones de esperma epididímico se prepararon a partir de ratones macho adultos y se pre-incubaron durante 2 horas en medio de FIV para asegurar la capacitación. El esperma y los ovocitos se incubaron durante 4-5 horas, tras lo cual se retiraron los CCOs, se lavaron, se despojaron de células del cumulus y se colocaron en microgotas de 30 μl del medio de cultivo de embriones *in vitro* (CIV) (KSOM complementado con un 0,5% de la fracción V cristalina de BSA [Calbiochem]) bajo aceite mineral en una estufa de incubación humidificada con un 5% de O_2 , un 5% de CO_2 y un 90% de N_2 a 37°C .

[0074] La tasa de fecundación *in vitro* se midió en el Día 1 basándose en el porcentaje de embriones con 2 células. Según se muestra en la Figura 12, hubo un incremento significativo en la tasa de fecundación en el grupo de MIV (1.000 ng/ml de LIF + FSH) y en el grupo madurado *in vivo* en comparación con el grupo FSH-IVM. Se observó un incremento similar en la tasa de fecundación con 2.000 ng/ml de LIF + FSH (Figura 13). El LIF (1.000 ó 1 ng/ml) solo también produjo un incremento significativo en la tasa de fecundación en comparación con el control negativo (medio MIV sin FSH) (Figura 12).

[0075] La tasa de desarrollo de los embriones se midió en el Día 4 basándose en el porcentaje de blastocistos. De forma similar a los resultados para la tasa de fecundación *in vitro*, el grupo de MIV (1.000 ng/ml de LIF + FSH) y el grupo madurado *in vivo* mostró un incremento significativo en la tasa de blastocistos en comparación con el grupo FSH-MIV (Figura 14). Se observó un incremento similar en la tasa de blastocistos con 2.000 ng/ml de LIF + FSH (Figura 15). Además, el LIF (1.000 ó 1 ng/ml) solo produjo un incremento significativo en la tasa de blastocistos en comparación con el control negativo (medio MIV sin FSH) (Figura 14).

[0076] También se midió la tasa de desarrollo de los embriones determinando el número total de blastocistos por embriones de 2 células. Según se muestra en la Figura 16, aproximadamente el 80% de los embriones de 2 células se desarrollaron en blastocistos para todos los grupos con ovocitos madurados en presencia de LIF y FSH, así como en el grupo madurado *in vivo*. Los grupos con ovocitos madurados con LIF solo tuvieron resultados similares. No había blastocistos en el control negativo (-FSH). Las tasas eran muy variables para los grupos con FSH y 0,1 ng/ml de LIF.

[0077] Se midieron las tasas de nacimientos para los diferentes grupos experimentales transfiriendo quirúrgicamente embriones en el Día 4 al cuerno uterino de hembras CD1 de 8-12 semanas de edad pseudogestantes de 2,5 días (Charles River). Los embriones producidos a partir de ovocitos madurados *in vitro* en medio con FSH y 1.000 ng/ml de LIF tenían una tasa de nacimientos mayor ($0,05 < p < 0,07$) que el grupo de control (FSH sola) y la misma que el grupo madurado *in vivo* ($p > 0,05$) (Figura 17). Se observó un incremento similar en la tasa de nacimientos con 2.000 ng/ml de LIF + FSH (Figura 18). Además, la tasa de gestación era mayor con FSH+1.000 ng/ml de LIF era ligeramente mayor (Figura 17).

[0078] El incremento en la tasa de fecundación, la tasa de blastocistos y la tasa de nacimientos indica que la adición de LIF a un medio de MIV de ratón estándar incrementa la calidad de los ovocitos.

[0079] Las siguientes afirmaciones numeradas, que describen aspectos de las propuestas de los presentes inventores, son parte de la descripción:

1. Un procedimiento para la maduración *in vitro* de ovocitos, que comprende incubar un ovocito inmaduro en un medio fisiológicamente aceptable que comprende una citocina de tipo IL-6.
2. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que el ovocito está en la etapa de un folículo antral temprano o un folículo antral.
3. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que la citocina de tipo IL-6 se une a un receptor seleccionado del grupo que consiste en heterodímeros de LIFR-gp130, heterodímeros de OSMR-gp130 y homodímeros de gp130.
4. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que la citocina de tipo IL-6 no se une a un receptor seleccionado del grupo que consiste en IL-11Ra y CNTFRa.
5. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que la citocina de tipo IL-6 es LIF.
6. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que la citocina de tipo IL-6 es CT-1.
7. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que la citocina de tipo IL-6 es IL-6.
8. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que la citocina de tipo IL-6 es sIL-6R α .
9. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que la citocina de tipo IL-6 es IL-6/sIL-6R α .
10. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que el medio comprende adicionalmente FSH, hCG, o una combinación de las mismas.
11. El procedimiento, según la afirmación 1, en el que el que el medio no comprende FSH, hCG, o una combinación de las mismas.

12. Un ovocito maduro producido mediante los procedimientos según cualquiera de las afirmaciones 1-11.
13. Un procedimiento de fecundación *in vitro* que comprende incubar espermatozoides con un ovocito maduro producido mediante el procedimiento de la afirmación 1.
14. Un embrión producido mediante el procedimiento de la afirmación 13.
- 5 15. Un procedimiento de tratamiento de la infertilidad que comprende implantar un embrión, según la afirmación 14, en el útero de una hembra.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la maduración *in vitro* de ovocitos, que comprende: incubar ovocitos inmaduros con cumulus intacto en un medio de cultivo, que comprende factor inhibidor de leucemia (LIF), de manera que se induce de un 20% a un 100% de expansión de cumulus.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el ovocito está en la etapa de un folículo antral temprano o folículo antral.

10 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el medio comprende adicionalmente FSH, hCG o una combinación de las mismas.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el medio no comprende adicionalmente FSH, hCG o una combinación de las mismas.

15

FIGURA 1

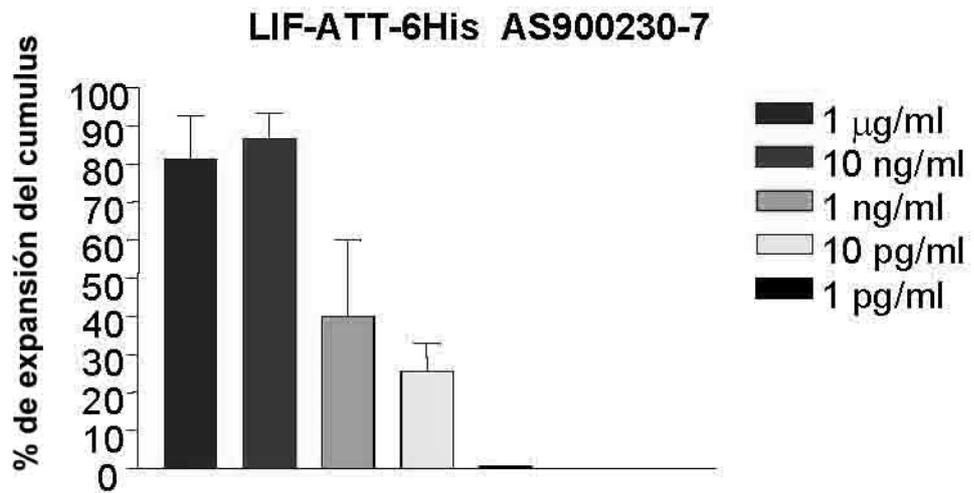


FIGURA 2

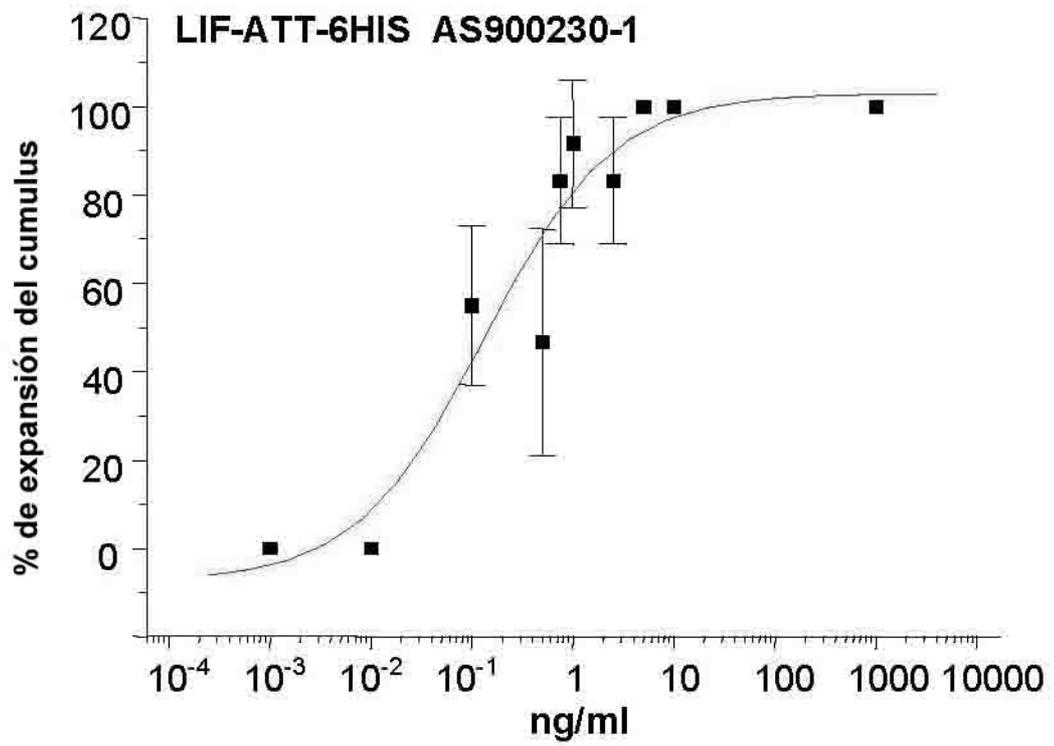


FIGURA 3

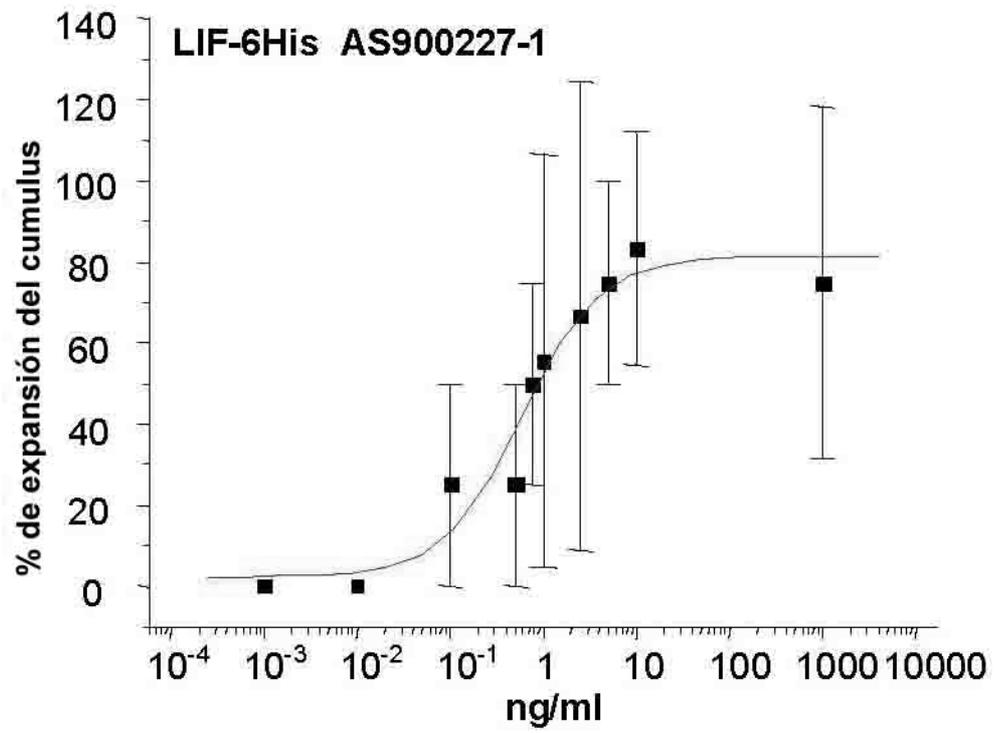


FIGURA 4

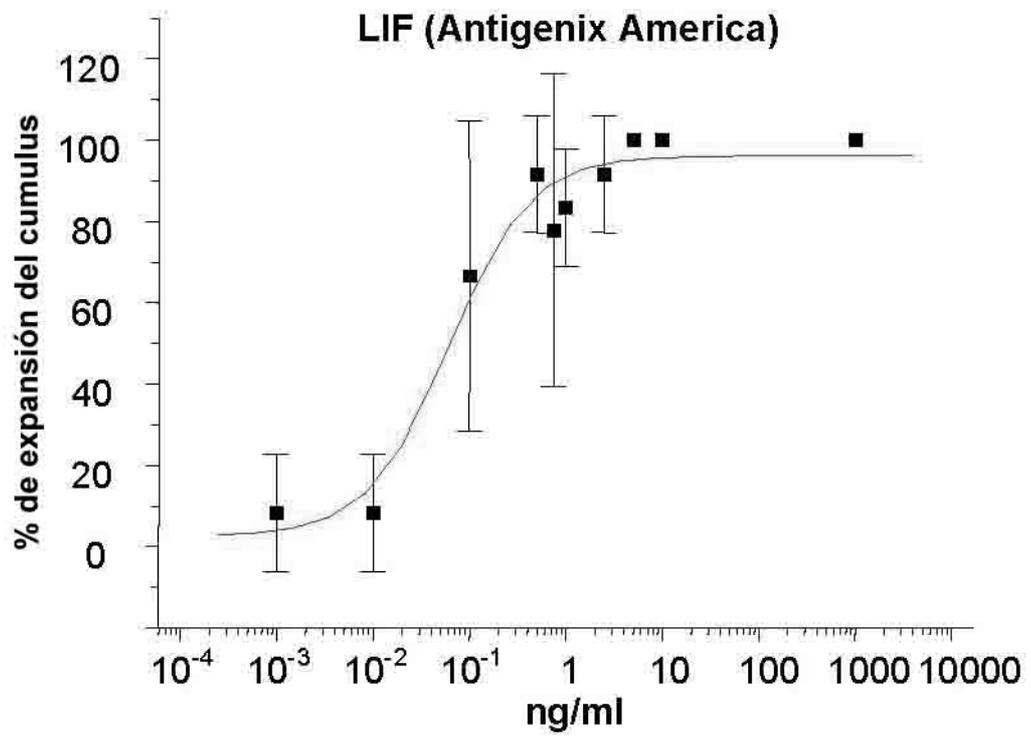


FIGURA 5

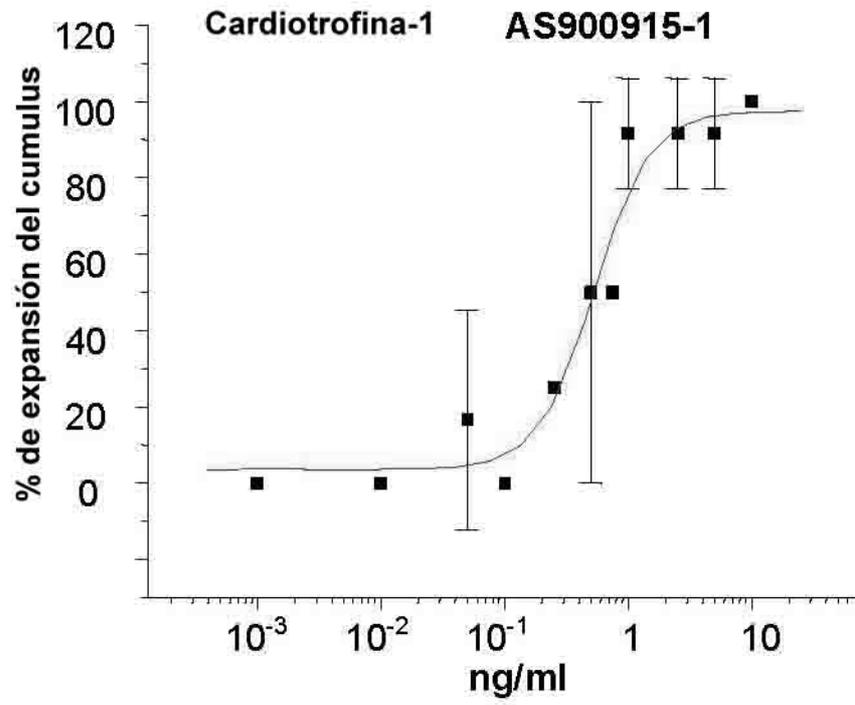


FIGURA 6

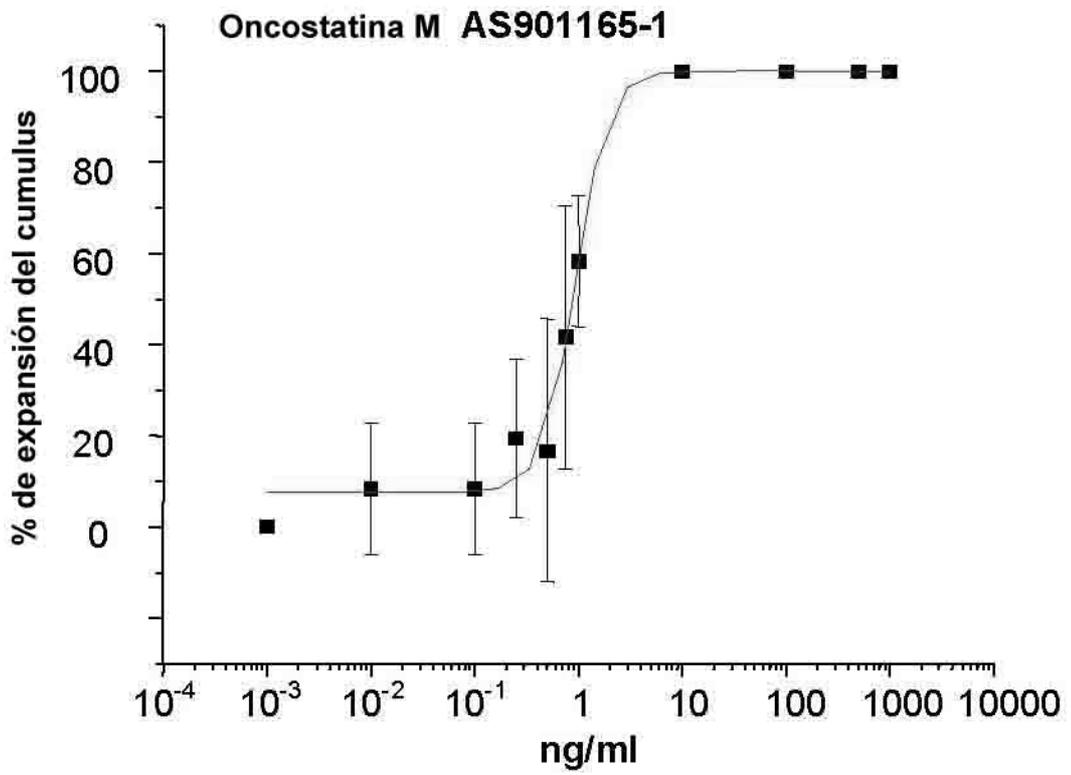


FIGURA 7

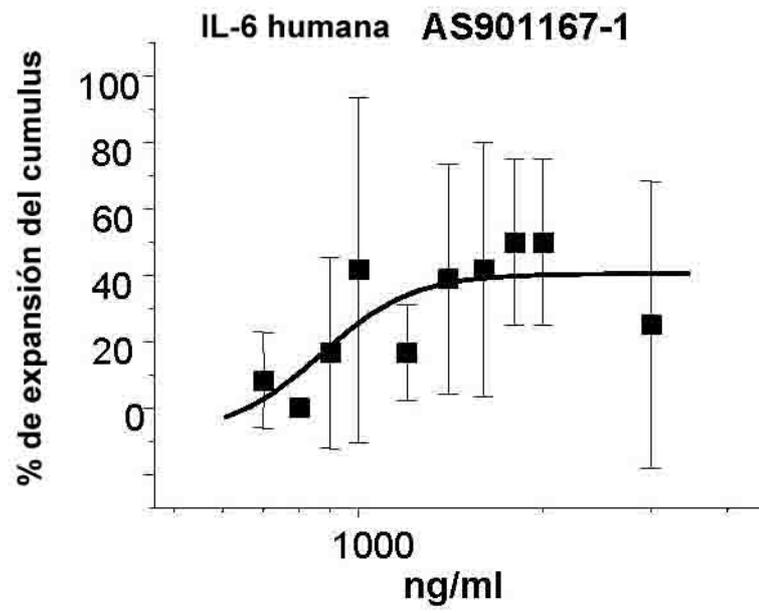


FIGURA 8

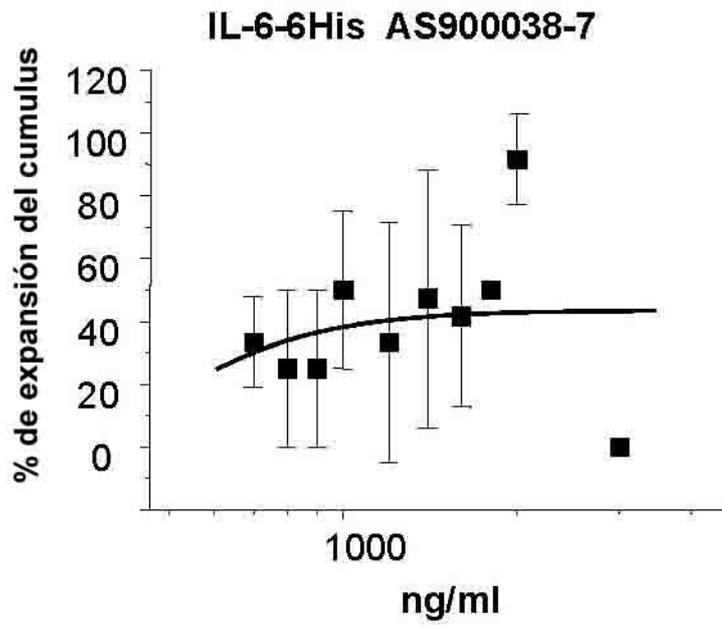


FIGURA 9

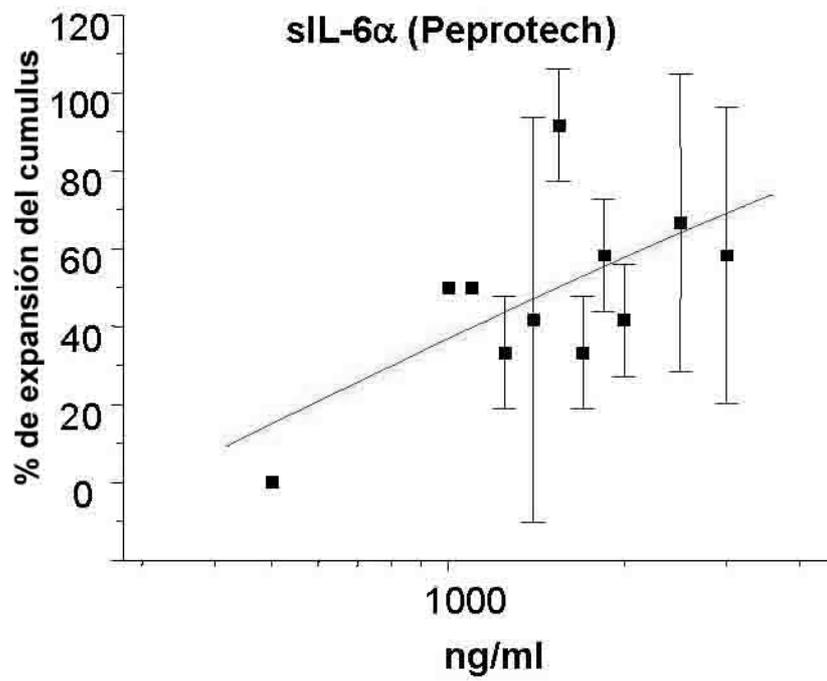


FIGURA 10

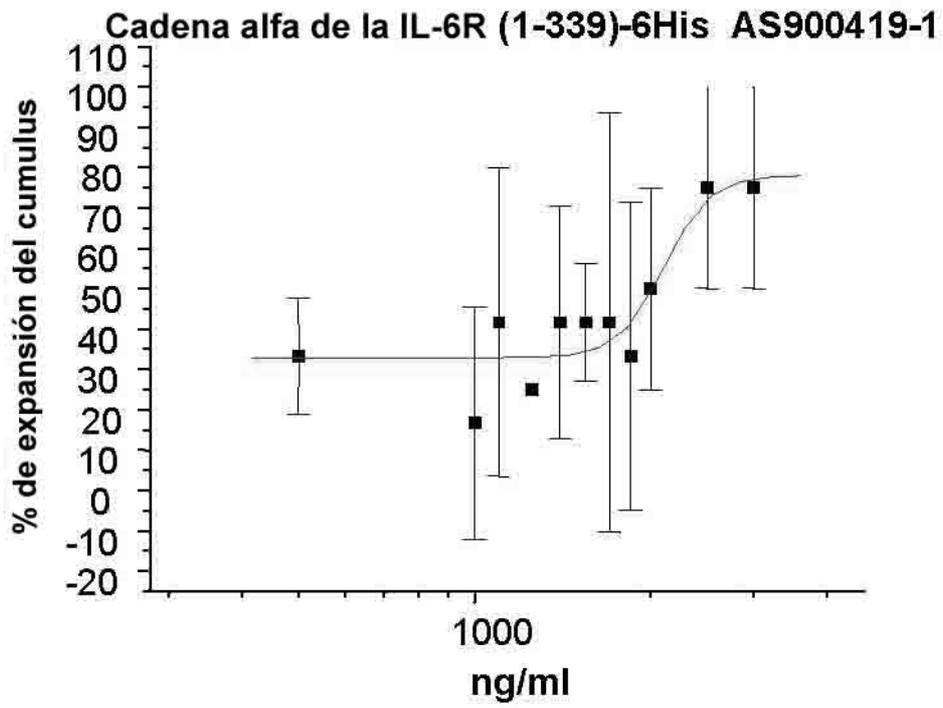


FIGURA 11

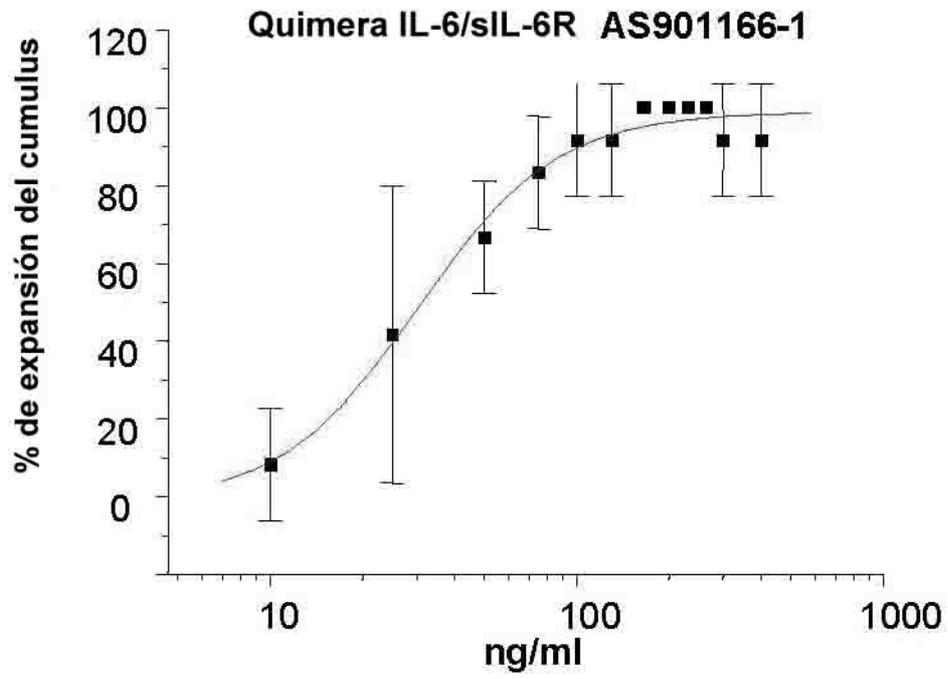


FIGURA 12

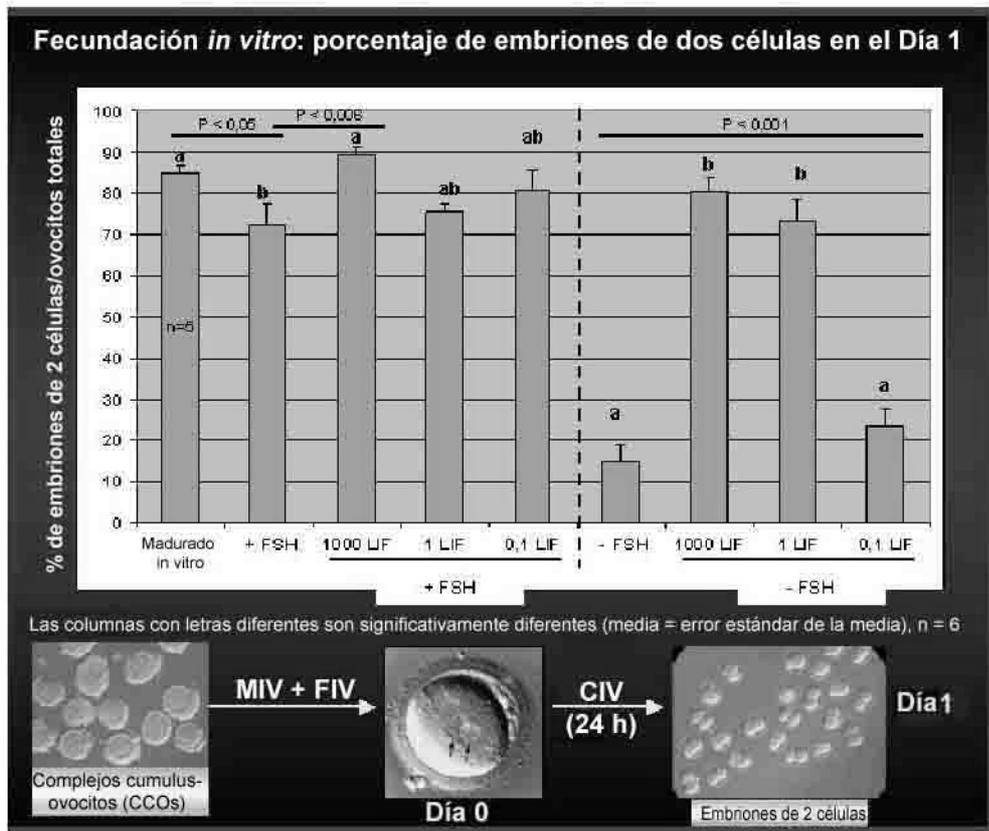
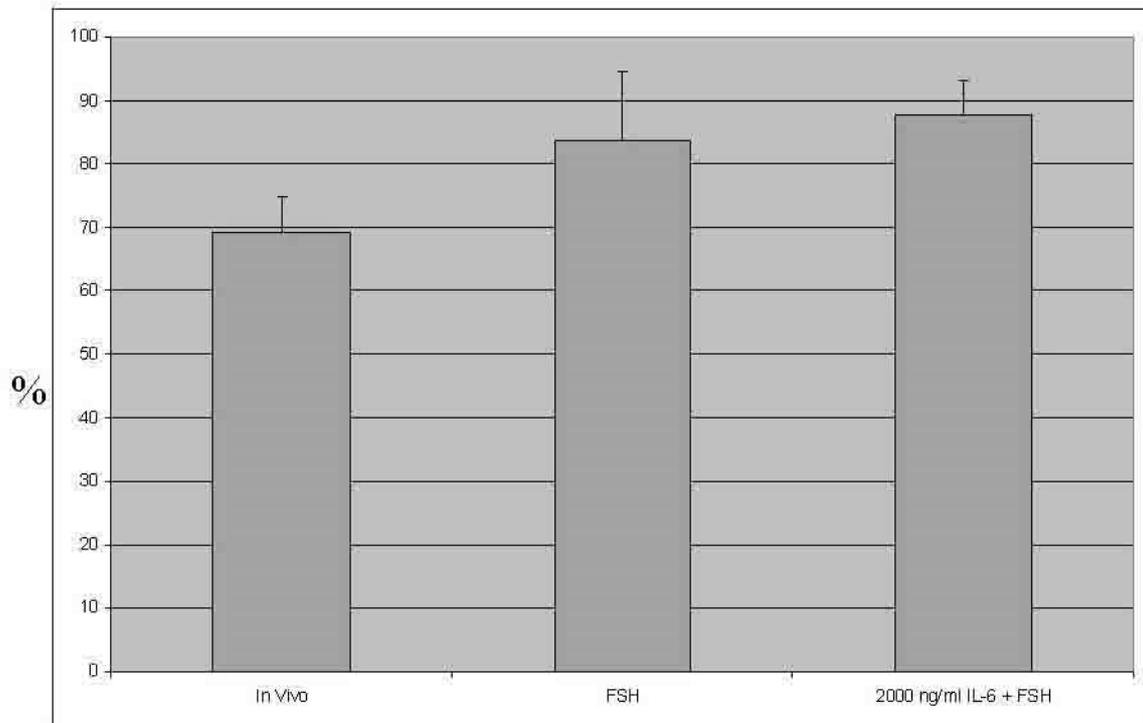


FIGURA 13

Tasa de fecundación: ovocitos escindidos/ovocitos totales



n = 2 (repeticiones independientes) (media \pm EEM)

FIGURA 14

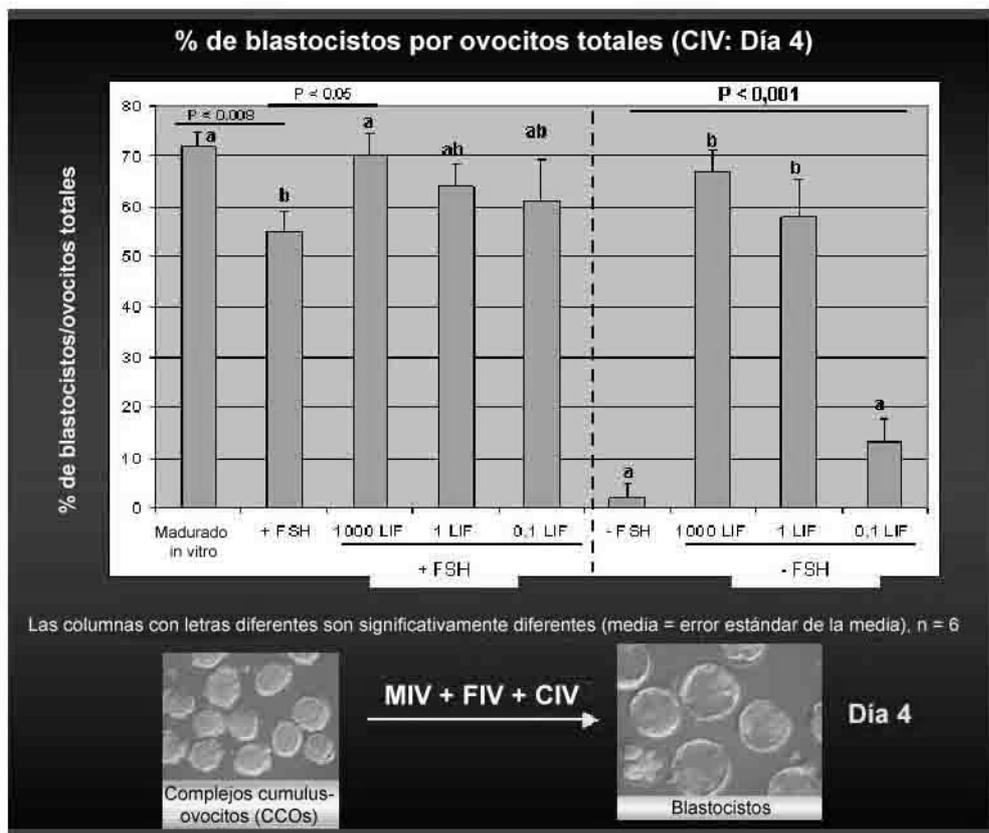
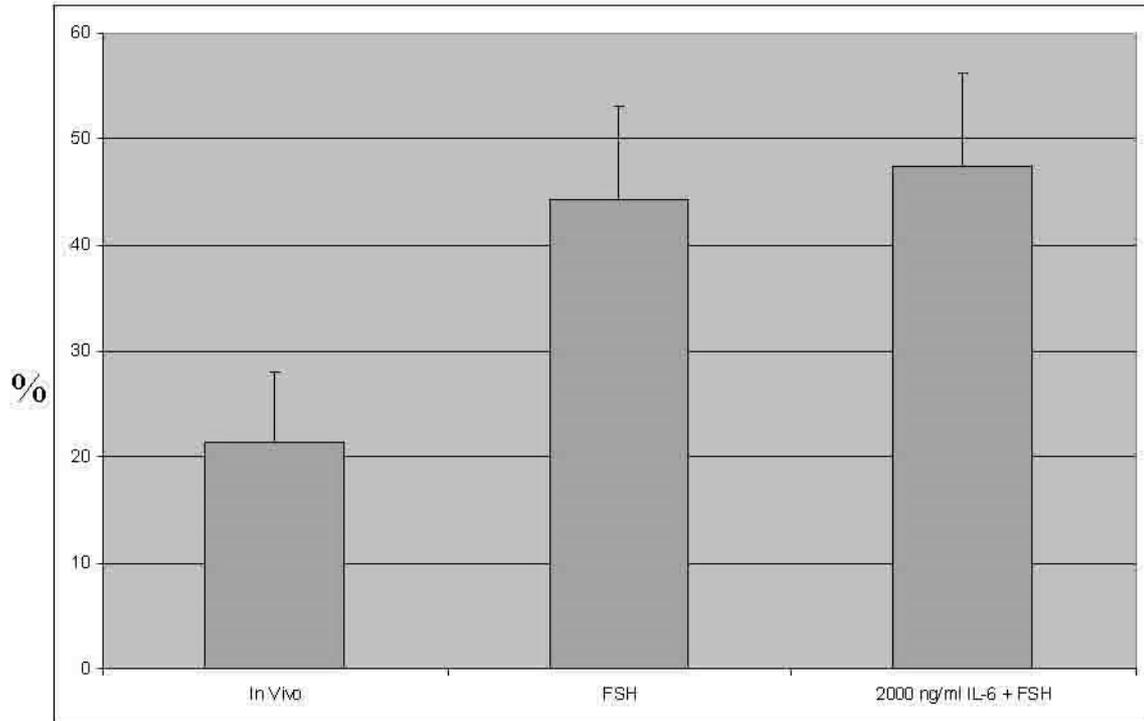


FIGURA 15

Tasa de blastocistos: Blastocistos/Blastocistos totales



n = 2 (repeticiones independientes) (media \pm EEM)

FIGURA 16

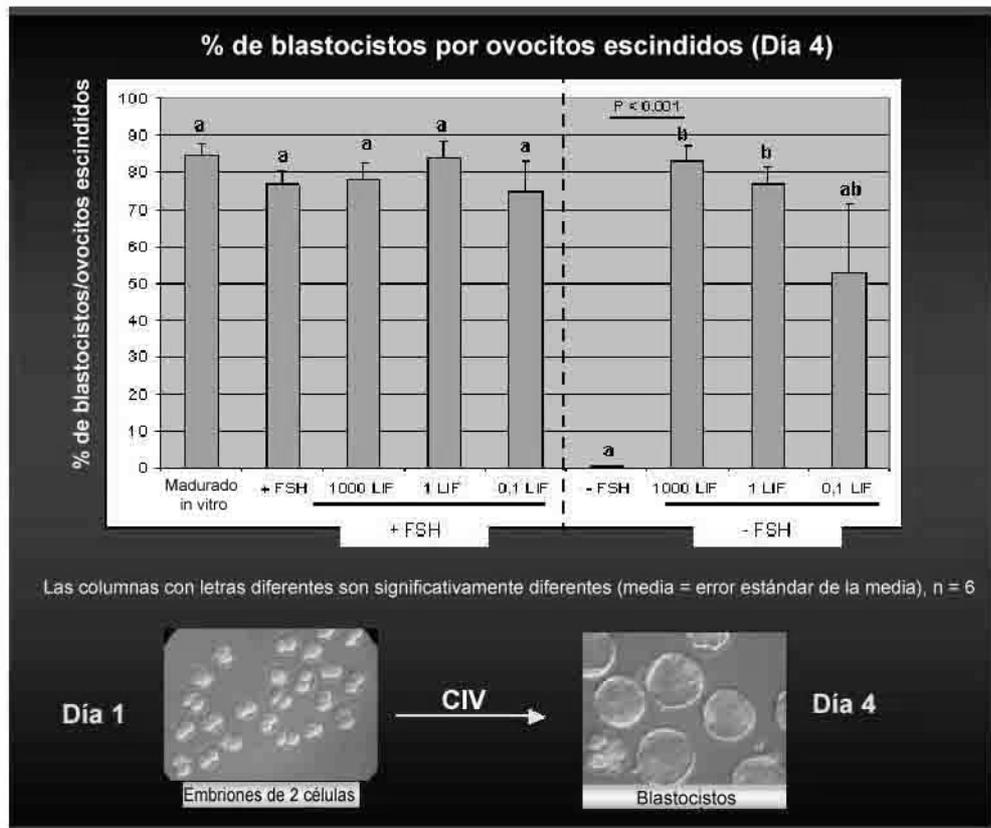


FIGURA 17

Transferencia de embriones: tasas de nacimiento

Tratamientos	Tasa total de nacimientos (%)	Tasa de nacidos vivos (%)	Tasa de aún vivos (%)	Tasa de embarazos (%)
Control madurado <i>in vivo</i> (ovocitos ovulados)	26/137 (19)	23/137 (17)	3/137 (2)	11/14 (79)
FSH (0,2 UI/ml)	7/56 (12)	5/56 (9)	2/56 (4)	4/6 (67)
FSH + 1.000 ng/ml de LIF	18/76 (24)	15/76 (20)	3/76 (4)	7/8 (87)
FSH + 1 ng/ml de LIF	8/67 (12)	8/67 (12)	0	4/7 (57)
FSH + 0,1 ng/ml de LIF	6/59 (10)	6/59 (10)	0	4/6 (67)
---- + 1.000 ng/ml de LIF	4/59 (7)	3/59 (5)	1/59 (2)	3/7 (43)
---- + 1 ng/ml de LIF	10/64 (16)	9/64 (14)	1/64 (2)	6/8 (75)

Tasa total de nacimientos (%): crías totales/blastocistos totales transferidos (porcentaje)

Tasa de nacidos vivos (%): crías vivas/blastocistos totales transferidos (porcentaje) (n = 4)

Tasa de aún vivos (%): crías muertas/blastocistos totales transferidos (porcentaje) (4 repeticiones del mismo experimento)

Tasa de embarazos (%): hembras gestantes/blastocistos totales transferidos (porcentaje)

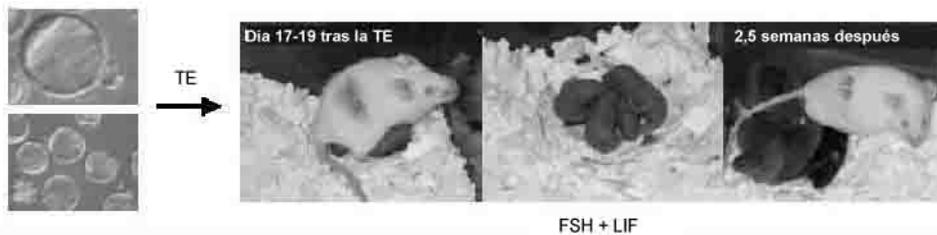
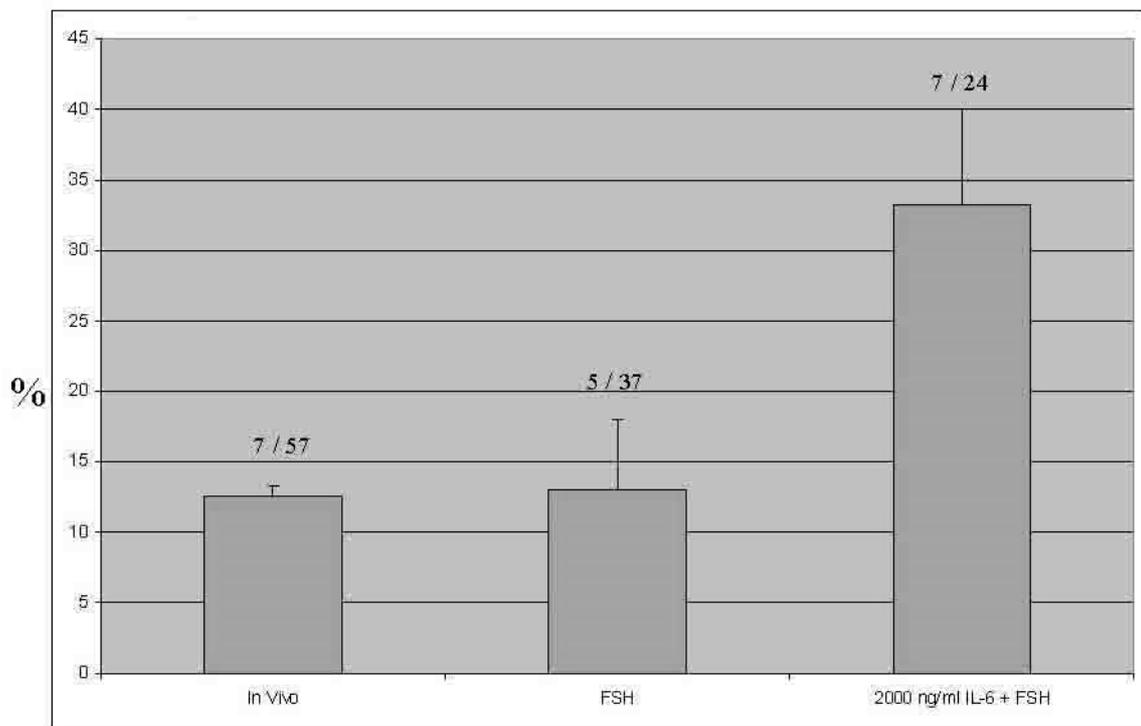


FIGURA 18

Tasa de partos: crías/blastocistos totales transferidos



n = 2 (repeticiones independientes) (media \pm EEM)