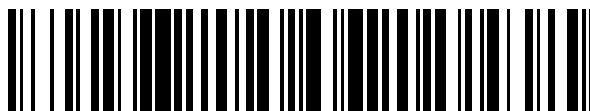


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 962**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2011** **PCT/EP2011/058757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011** **WO11147976**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2011** **E 11725888 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017** **EP 2576825**

54 Título: **Métodos para evaluar la receptividad del endometrio de una paciente**

30 Prioridad:

**14.06.2010 US 354310 P**  
**27.05.2010 EP 10305561**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**01.03.2018**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)**  
**101, rue de Tolbiac**  
**75013 Paris, FR;**  
**UNIVERSITÉ MONTPELLIER (33.3%) y**  
**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HAMAMAH, SAMIR y**  
**HAOUZI, DELPHINE**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

### Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 656 962 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

Métodos para evaluar la receptividad del endometrio de una paciente

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos para evaluar la receptividad del endometrio de una paciente.

10 **Estado de la técnica**

A pesar de los muchos avances en la tecnología de reproducción asistida (ART), las tasas de implante aún son bajas después de una hiperestimulación controlada del ovario (COH) y fertilización *in vitro* (IVF). Se asume que dos tercios de los fracasos en el implante están asociados con una receptividad inadecuada del endometrio o con defectos en la comunicación del embrión-endometrio. El endometrio es receptivo al implante de blastocistos durante una ventana espacial y temporalmente restringida, llamada "la ventana de implante". En seres humanos, este periodo empieza 6-10 días después del incremento de LH y dura aproximadamente 48 horas. Se han sugerido varios parámetros para evaluar la receptividad del endometrio, incluyendo el grosor del endometrio que es un criterio tradicional, el aspecto morfológico del endometrio y el flujo sanguíneo del endometrio y subendometrio. Sin embargo, su valor pronóstico positivo aún es limitado.

Más recientemente, las estrategias transcriptómicas han estado dirigidas a la identificación de biomarcadores de la ventana de implante en seres humanos. Usando la tecnología de micromatrices en muestras de biopsias humanas, varios autores han observado modificaciones en el perfil de expresión génica asociado a la transición del endometrio humano de un estado preceptivo (fase secretora prematura) a uno receptivo (fase secretora intermedia) (Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Mirkin *et al.*, 2005; Talbi *et al.*, 2006). Sin embargo, entre los diversos genes regulados, únicamente dos genes están en común entre todos estos estudios (Haouzi *et al.*, 2009). Dicha variabilidad de los resultados con la misma estrategia puede tener varias explicaciones: diferencias en el día de las biopsias de endometrio, diferentes perfiles de paciente y cantidades inadecuadas de muestras de endometrio estudiadas ( $n \leq 11$ ). Además, únicamente un estudio comparó la fase secretora prematura e intermedia en la misma paciente (Riesewijk *et al.*, 2003), lo que nos parece una condición necesaria para minimizar el impacto de la variabilidad entre pacientes.

Por lo tanto, aún existe una necesidad en la técnica de biomarcadores fiables de la receptividad del endometrio humano que ayuden a mejorar el resultado clínico de IVF.

35 **Objeto de la invención**

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un método para evaluar la receptividad del endometrio de una paciente, que comprende una etapa que consiste en medir el nivel de expresión de once genes en una muestra de biopsia del endometrio obtenida de dicha paciente, donde dichos genes son MFAP5, ANGPTL1, PROK1, NLF2, LAMB3, BCL2L10, CD68, TRPC4, SORCS1, FST y KRT80.

45 **Descripción detallada de la invención**

Los autores de la invención se centraron en identificar genes expresados en el endometrio humano durante la ventana de implante que pudieran usarse como dichos marcadores. Una serie de pacientes normales que responden al tratamiento ( $n=31$ ) experimentó biopsias del endometrio ( $n=62$ ) durante la fase secretora prematura (LH+2) y la fase secretora intermedia (LH+7) del mismo ciclo natural, que precedía a un nuevo intento de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para el factor de infertilidad masculino. Las muestras se analizaron usando micromatrices de ADN y se realizaron análisis de micromatriz por muestras emparejadas entre las fases secretora prematura e intermedia para cada paciente, lo que es esencial para minimizar la variabilidad entre pacientes. Para identificar nuevos marcadores de receptividad del endometrio, los autores de la invención primero han cruzado la lista de genes modulados significativamente entre los grupos de muestra LH+2 y LH+7 con aquellos de otros cuatro estudios transcriptómicos que comparaban las mismas fases del ciclo natural del endometrio (Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Mirkin *et al.*, 2005; Talbi *et al.*, 2006) para identificar una lista de genes que comprende 797 genes modulados específicamente durante la ventana de implante y exclusivos para el presente estudio (figura 1). La agrupación jerárquica con estos datos (797 genes) reveló que esta lista permitía una clara segregación de los dos grupos de muestras de endometrio y la figura 1 ilustra esta separación. Curiosamente, la mayoría de estos genes estaban regulados por aumento durante la ventana de implante (746 genes regulados por aumento, 51 genes regulados por disminución) (figura 1).

Después se usó una nueva estrategia para la predicción de clase aplicada a experimentos de micromatriz para identificar biomarcadores supuestamente implicados en la receptividad del endometrio. Para seleccionar genes candidatos de la ventana de implante, los autores de la invención entonces han comparado la lista de genes

modulados específicamente durante la ventana de implante y exclusivos para el estudio con la lista de factores pronósticos. Los autores de la invención, por lo tanto, han seleccionado los 10 nuevos genes regulados por más aumento que predicen receptividad del endometrio, no enumerados en informes por análisis de micromatriz. Entre estos nuevos genes, 4 genes se han publicado en Haouzi *et al.* (2009). Estos biomarcadores publicados son MFAP5 (proteína 5 asociada a microfibrillas), ANGPTL1 (angiopoyetina de tipo 1), EG-VEGF también llamado PROK1 (factor de crecimiento del endotelio vascular derivado de glándula endocrina o procinetina 1) y NLF2 también llamado C2CD4B (factor 2 de localización nuclear o dominio dependiente de calcio C2 que contiene 4B) y todos se sobreexpresan durante la ventana de implante en análisis de micromatriz respectivamente en un factor de 37, 12,6, 10,2 y 22,5 (tabla A). Además, se eligió un gen encontrado en otros análisis de micromatriz como control positivo de receptividad del endometrio humano: LAMB3 (laminina beta 3). Los seis genes no publicados fueron BCL2L10 (BCL2 de tipo 10), antígeno CD68, TRPC4 (canal de cationes por potencial de receptor transitorio, subfamilia C, miembro 4), SORCS1 (receptor 1 que contiene dominio VPS10 relacionado con sortilina), FST (folistatina) y KRT80 (queratina 80) que también se sobreexpresaban durante la ventana de implante en un factor de 4,7, 5,3, 7,7, 9, 9 y 14,6 respectivamente (tabla A). Conclusión: Se han seleccionado once genes (MFAP5, ANGPTL1, PROK1, NLF2, LAMB3, BCL2L10, CD68, TRPC4, SORCS1, FST y KRT80) por primera vez y representan nuevos biomarcadores para explorar la receptividad del endometrio. Como la biopsia de endometrio es un procedimiento fácil de realizar durante un ciclo natural, la presente invención representa, por consiguiente, una novedosa estrategia en pacientes con implante deficiente después de IVF o ICSI.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para evaluar la receptividad del endometrio de una paciente, que comprende una etapa que consiste en medir el nivel de expresión de once genes en una muestra de biopsia del endometrio obtenida de dicha paciente, donde dichos genes son MFAP5, ANGPTL1, PROK1, NLF2, LAMB3, BCL2L10, CD68, TRPC4, SORCS1, FST y KRT80.

Como se usa en este documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero hembra al que puede aplicarse la presente invención. Típicamente, dicho mamífero es un ser humano (es decir, una mujer), pero puede referirse a otros mamíferos tales como primates, perros, gatos, cerdos, ovejas, vacas.

Todos los genes que pertenecen a la invención son conocidos *per se*, y se enumeran en la siguiente tabla A.

**Tabla A: Conjunto de genes con valor pronóstico.**

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen	Cambio factorial
MFAP5	proteína 5 asociada a microfibrillas	8076	37,01902142
ANGPTL1	angiopoyetina de tipo 1	9068	12,61880198
PROK1	factor de crecimiento del endotelio vascular derivado de glándula endocrina o procinetina 1	84432	10,18590074
NLF2	factor 2 de localización nuclear o dominio dependiente de calcio C2 que contiene 4B	388125	22,53812032
LAMB3	laminina, beta 3	3914	20,42745619
BCL2L10	BCL2 de tipo 10	10017	4,648031259
CD68	antígeno CD68	968	5,223325166
TRPC4	canal de cationes por potencial de receptor transitorio, subfamilia C, miembro 4	7223	7,619199905
SORTS1	receptor 1 que contiene dominio VPS10 relacionado con sortilina	114815	8,985566271
FST	folistatina	10468	8,992203809
KRT80	queratina 80	144501	14,59097378

Los métodos de la invención comprenden además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra de biopsia del endometrio con un control, donde la detección de una diferencia en el nivel de expresión de los genes entre la muestra de biopsia del endometrio y el control es indicativa de si el endometrio es receptivo. El control puede consistir en una muestra de biopsia del endometrio obtenida de un endometrio receptivo o puede consistir en una muestra de biopsia del endometrio obtenida de un endometrio no receptivo.

En una realización preferida, la paciente ha observado un ciclo natural. Los autores de la invención, de hecho creen que un ciclo estimulado o ciclo modificado natural tiene un impacto sobre la receptividad del endometrio. La expresión "ciclo natural" se refiere al ciclo natural por el que la femina o paciente produce un ovocito. La expresión "ciclo natural modificado" se refiere al proceso por el que la femina o paciente produce entre dos y cinco ovocitos en una estimulación suave de ovario con antagonistas de GnRH asociada con FSH recombinante o hMG. La expresión "ciclo estimulado" se refiere al proceso por el que una femina o paciente produce más de un ovocito en estimulación con agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH recombinante o hMG. Los autores de la invención, de hecho, han observado que los tratamientos con gonadotropina en ciclos de hiperestimulación controlada de ovario

(COS) da lugar a alteraciones de la activación transcripcional de los genes implicados en la receptividad del endometrio. Por consiguiente, la presente invención abre nuevas perspectivas, particularmente en pacientes con múltiples fracasos de implante. En este caso, el análisis del perfil del endometrio podría revelar un perfil fuertemente alterado durante protocolos COS, que promueve al médico a adaptar el protocolo de estimulación de IVF o a realizar una transferencia de embriones posterior durante un ciclo natural. Más particularmente, cuando la receptividad del endometrio está seriamente comprometida por el protocolo COS, debe cancelarse el remplazo de embriones frescos, el embrión congelado y el remplazo de embriones descongelados debe realizarse en ciclos naturales.

El método de la presente invención también es particularmente adecuado para entender por qué una paciente experimenta múltiples fracasos de implante.

Los métodos de la invención son particularmente adecuados para potenciar el resultado de embarazo de una paciente. Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a un método para potenciar el resultado de embarazo de una paciente, que comprende:

- i) evaluar la receptividad del endometrio de la paciente realizando el método de la invención.
- ii) evaluar que el embrión puede implantarse cuando el endometrio se considera receptivo en la etapa i).

El embrión de la etapa ii) puede obtenerse a través de un protocolo clásico de fertilización *in vitro* (cIVF) o en un protocolo de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La expresión "fertilización clásica *in vitro*" o "cIVF" se refiere a un proceso por el que se fertilizan los ovocitos por espermatozoides fuera del organismo, *in vitro*. IVF es un tratamiento principal en infertilidad cuando no se ha logrado la concepción *in vivo*. La expresión "inyección intracitoplasmática de espermatozoides" o "ICSI" se refiere a un procedimiento de fertilización *in vitro* en que se inyecta un único espermatozoide directamente en un ovocito. Este procedimiento se usa más habitualmente para superar los factores de infertilidad masculina, aunque también puede usarse cuando los ovocitos no pueden penetrarse fácilmente por el espermatozoide y, ocasionalmente, como un método de fertilización *in vitro*, especialmente el asociado con donación de espermatozoides.

La determinación del nivel de expresión de los genes descritos anteriormente en la tabla A puede realizarse por una diversidad de técnicas. En general, el nivel de expresión determinado es un nivel de expresión relativa.

Más preferiblemente, la determinación comprende poner en contacto la muestra de biopsia del endometrio con reactivos electivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y detectar de ese modo la presencia, o medir la cantidad, de polipéptido o ácidos nucleicos de interés originalmente en la muestra de biopsia del endometrio. El contacto puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, placa de microvaloración, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna y similares. En realizaciones específicas, el contacto se realiza en un sustrato recubierto con el reactivo, tal como una matriz de ácido nucleico o una matriz de ligando específico. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte adecuado que comprenda vidrio, plástico, nailon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de diversas formas y tamaños, tal como un portaobjetos, una membrana, una microesfera, una columna, un gel, etc. El contacto puede hacerse en cualquier condición adecuada para un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo de anticuerpo-antígeno, a formarse entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra de biopsia del endometrio.

En una realización preferida, el nivel de expresión puede determinarse determinando la cantidad de ARNm.

Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en la muestra de biopsia del endometrio se extrae en primer lugar de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo, usando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae por resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído entonces se detecta por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern) y/o amplificación (por ejemplo RT-PCR). Preferiblemente, se prefiere RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. Es particularmente ventajosa la RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa a tiempo real.

Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA).

Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que muestran complementariedad de secuencia u homología con el ARNm de interés de este documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que dichos ácidos nucleicos no tienen que ser idénticos, pero típicamente son al menos aproximadamente un 80 % idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente un 85 % idénticos e incluso más preferiblemente un 90-95 % idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Se conoce en la técnica una amplia diversidad de indicadores apropiados incluyendo, ligandos fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).

Las sondas típicamente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios de una longitud entre 10 y 1000 nucleótidos, por ejemplo, entre 10 y 800, más preferentemente entre 15 y 700, típicamente entre 20 y 500. Los cebadores típicamente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de una longitud entre de 10 y 25 nucleótidos, diseñados para coincidir perfecta o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, a amplificar. Las sondas y

5 cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que hibridan, es decir, hibridan preferiblemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondientes a la temperatura de fusión  $T_m$  más alta, por ejemplo, formamida al 50 %, SCC 5x o 6x. SCC es NaCl 0,15 M, Na citrato 0,015 M).

Los cebadores o sondas de ácido nucleico usados en el método anterior de amplificación y detección pueden ensamblarse como un kit. Dicho kit incluye cebadores consenso y sondas moleculares. Un kit preferido también incluye los componentes necesarios para determinar si se ha producido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones y enzimas de PCR; secuencias de control positivo, cebadores de control de la reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

15 En una realización particular, los métodos de la invención comprenden las etapas de proporcionar ARN totales extraídos de muestras de biopsia del endometrio y someter los ARN a amplificación e hibridación con sondas específicas, más particularmente mediante una RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

En otra realización preferida, el nivel de expresión se determina por análisis de chip de ADN. Dicho chip de ADN o micromatriz de ácido nucleico consiste en diferentes sondas de ácido nucleico que se unen químicamente a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla del tamaño de una microesfera. Un microchip puede estar constituido de polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos tales como

20 ADNc u oligonucleótidos que pueden ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. Para determinar el nivel de expresión, una muestra de biopsia del endometrio de una paciente de ensayo, opcionalmente sometida en primer lugar a una transcripción inversa, se marca y se pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, lo que da lugar a la formación de complejos entre los ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de sonda unidas a la superficie de la micromatriz. Los complejos hibridados marcados entonces se detectan y pueden cuantificarse o semicuantificarse. El marcaje puede conseguirse por

30 diversos métodos, por ejemplo, usando marcaje radioactivo o fluorescente. Están disponibles para los expertos en la materia muchas variantes de la tecnología de hibridación de micromatrices (véase, por ejemplo, la revisión de Hoheisel, Nature Reviews, Genetics, 2006, 7:200-210).

En este contexto, la presente divulgación se refiere además a un chip de ADN que comprende un soporte sólido que

35 porta ácidos nucleicos que son específicos para los genes enumerados en la tabla A.

Otros métodos para determinar el nivel de expresión de dichos genes incluyen la determinación de la cantidad de proteínas codificadas por dichos genes.

Dichos métodos comprenden poner en contacto la muestra de biopsia del endometrio con un compañero de unión capaz de interactuar de forma selectiva con una proteína marcadora presente en la muestra de biopsia del endometrio. El compañero de unión generalmente es un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal.

La presencia de la proteína puede detectarse usando técnicas electroforéticas y de inmunodiagnóstico convencionales, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de tipo competitivo, de reacción directa o emparejado. Dichos ensayos incluyen, aunque sin limitación, transferencias Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunolectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones generalmente incluyen

50 marcadores de revelado tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivos, enzimáticos o moléculas colorantes, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos que han reaccionado con el mismo.

Los ensayos mencionados anteriormente generalmente implican la separación de la proteína no unida en una fase líquida de un soporte en fase sólida a la que se unen los complejos de antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microvaloración); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, láminas o pocillos de microvaloración); látex de poliestireno (por ejemplo, microesferas o placas de microvaloración); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotado; membranas de nailon; microesferas activadas, esferas magnéticamente sensibles y similares.

Más particularmente, puede usarse un método ELISA, donde los pocillos de una placa de microvaloración se recubren con un anticuerpo contra la proteína a ensayar. Una muestra de biopsia del endometrio que contiene o es sospechosa de contener la proteína marcadora se añade entonces a los pocillos recubiertos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de complejos de anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para eliminar los restos no unidos y se añade una segunda molécula de unión marcada de forma detectable. La segunda molécula de unión se deja reaccionar con cualquier proteína marcadora de la muestra capturada,, la

placa se lava y la presencia de la segunda molécula de unión se detecta usando métodos bien conocidos en la técnica.

Como alternativa, puede preferirse un método de inmunohistoquímica (IHC). IHC proporciona específicamente un método de detección de dianas en la muestra de biopsia del endometrio *in situ*. La integridad celular global de la muestra de biopsia del endometrio se mantiene en IHC, permitiendo de ese modo la detección tanto de la presencia como de la localización de las dianas de interés. Típicamente, se fija una muestra de biopsia del endometrio con formalina, se incluye en parafina y se corta en secciones para la tinción y posterior inspección por microscopía óptica. Los métodos actuales de IHC usan marcaje directo o marcaje basado en anticuerpo secundario o basado en hapteno. Los ejemplos de sistemas IHC conocidos incluyen, por ejemplo, EnVision(TM) (DakoCytomation), Powervision(R) (Immunovision, Springdale, AZ), el kit NBA(TM) (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA), HistoFine(R) (Nichirei Corp, Tokio, Japón).

En una realización particular, puede montarse una sección tisular (es decir, muestra de biopsia del endometrio) en un portaobjetos u otro soporte después de la incubación con anticuerpos dirigidos contra las proteínas codificadas por los genes de interés. Después, pueden realizarse inspecciones microscópicas en la muestra montada en un soporte sólido adecuado. Para la producción de fotomicrografías, pueden montarse secciones que comprenden la muestra de biopsia del endometrio en un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano, para resaltar por tinción selectiva la presencia de las proteínas de interés.

Por lo tanto, las biopsias de muestras del endometrio de IHC pueden incluir, por ejemplo: (a) preparaciones que comprenden células del endometrio, (b) dichas células fijas e incluidas y (c) la detección de las proteínas de interés en dichas muestras de biopsia del endometrio. En algunas realizaciones, un procedimiento de tinción IHC puede comprender etapas tales como: corte y recorte del tejido, fijación, deshidratación, infiltración en parafina, corte en secciones delgadas, montaje en portaobjetos de vidrio, horneado, desparafinado, rehidratación, recuperación del antígeno, etapas de bloqueo, aplicación de anticuerpos primarios, lavado, aplicación de anticuerpos secundarios (opcionalmente acoplados a un marcador detectable adecuado), lavado, tinción de contraste y examen microscópico.

La invención también se refiere al uso de un kit para realizar los métodos descritos anteriormente, donde dicho kit comprende un medio para medir los niveles de expresión de los genes de la tabla A que son indicativos de si el endometrio es receptivo.

Otro objetivo de la divulgación se refiere a un explante de endometrio que se puede obtener de un endometrio que se ha considerado receptivo de acuerdo con el método de la presente invención.

Por consiguiente, dicho explante de endometrio se caracteriza porque tiene células endometriales (por ejemplo, células epiteliales, estromáticas o glandulares) que sobreexpresan al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en MFAP5, ANGPTL1, PROK1, NLF2, LAMB3, BCL2L10, CD68, TRPC4, SORCS1, FST y KRT80. Preferiblemente, dicho explante de endometrio sobreexpresa todos los genes descritos en la tabla A.

Los explantes de endometrio, por tanto, pueden obtenerse de una biopsia del endometrio durante la que se retira un pequeño trozo del revestimiento uterino de la paciente.

El explante de endometrio de acuerdo con la divulgación es particularmente adecuado para preparar un sistema de cocultivo del endometrio para cocultivo de endometrio-embrión durante IVF.

En una realización particular, dicho cocultivo de endometrio-embrión es autólogo (los explantes de endometrio y el embrión proceden de la misma paciente).

Típicamente, el explante de endometrio se trata para obtener una población de células endometriales. Por ejemplo, el tratamiento del explante de endometrio puede realizarse como se describe en el documento US 2008064100; Eyheremendy *et al.*, 2010; Spandorfer *et al.*, 2004.

Las células endometriales obtenidas pueden caracterizarse como células endometriales competentes. La presente invención se refiere además a un método para identificar células endometriales competentes. Como se usa en este documento, la expresión "células endometriales competentes" se refiere a células endometriales obtenidas de un explante de endometrio que presenta sobreexpresión de al menos un gen seleccionado de grupo que consiste en MFAP5, ANGPTL1, PROK1, NLF2, LAMB3, BCL2L10, CD68, TRPC4, SORCS1, FST y KRT80. Preferiblemente, dichas células endometriales competentes sobreexpresan todos los genes descritos en la tabla A.

Entonces, la población de células endometriales competentes puede cultivarse después con un embrión para obtener un blastocisto que puede implantarse finalmente en la paciente.

Por consiguiente, otro objetivo de la invención se refiere a una célula endometrial competente para su uso en un método de fertilización *in vitro* (IVF), donde dicho método comprende las etapas de i) identificar una célula

endometrial competente de acuerdo con el método de la reivindicación 2; ii) cultivar dicha célula competente identificada en la etapa i) para obtener una población de células endometriales; y iii) cocultivar dicha población de células endometriales con un embrión.

- 5 La divulgación, por tanto, se refiere a un método de cultivo de un embrión hasta una fase de desarrollo de blastocisto que comprende la etapa de cocultivar dicho embrión en presencia de una población de células endometriales competentes como se define anteriormente.

- 10 En una realización particular, la etapa III) consiste en cocultivar dicho embrión sobre una superficie de cultivo celular recubierta con una capa de células endometriales competentes obtenidas como se define anteriormente.

- 15 La expresión "superficie de cultivo celular" o "matriz de cultivo celular" se refiere a todos los tipos de superficie o matriz adecuados para cultivo celular. La expresión "superficie de cultivo celular" incluye, aunque sin limitación, placa, cubeta, pocillo o frasco de cultivo tisular. En una realización particular, la superficie de cultivo es una superficie de plástico de la placa, cubeta, pocillo o frasco de cultivo tisular. La superficie de cultivo celular tiene que ser compatible con el recubrimiento de células endometriales competentes. De acuerdo con una realización de la invención, la superficie de cultivo celular se selecciona de manera que las células endometriales competentes puedan adherirse de forma natural a la misma. Pueden seleccionarse diversos materiales de superficie de cultivo celular. Los ejemplos de dichos materiales incluyen, aunque sin limitación, placas de cultivo tisular o placas recubiertas con colágeno.

- 25 Típicamente, para obtener una capa de células endometriales competentes sobre una superficie de cultivo celular, las células endometriales competentes se recubren primero sobre la superficie de cultivo celular con un medio de cultivo que contiene colágeno. Después de un tiempo suficiente para permitir la adhesión de la célula endometrial competente sobre la superficie de cultivo celular, el medio de cultivo que contiene colágeno se retira y se reemplaza por un medio que permite la expansión de dichas células endometriales competentes.

- 30 En una realización particular, las células endometriales competentes se tratan previamente para detener su proliferación antes de entrar en contacto con el embrión. Por lo tanto, las células endometriales competentes se inactivan por radiación gamma o con un agente de bloqueo del ciclo celular.

En otra realización, las células endometriales competentes pueden immortalizarse para obtener líneas de células endometriales competentes.

- 35 Las condiciones (por ejemplo, temperatura, niveles de CO<sub>2</sub>, etc.) y el medio de cultivo para el cocultivo de endometrio-embrión son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Eyheremendy *et al.*, 2010 y Spandorfer *et al.*, 2004.

- 40 El sistema de cocultivo de endometrio de la presente invención, por tanto, es particularmente adecuado para aumentar el potencial de implante *in vivo* de un embrión de fertilización *in vivo*. "Potencial de implante" es la capacidad de los embriones de implantarse en el útero. Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método para aumentar el potencial de implante *in vivo* de un embrión e fertilización *in vitro*. Este método incluye realizar una de las realizaciones descritas anteriormente para cultivar un embrión hasta una fase de desarrollo de blastocisto, de modo que se consiga la maduración completa del embrión en cultivo o se potencie la maduración, en comparación con otros métodos de IVF. De acuerdo con ciertas realizaciones de este método, el blastocisto se introduce entonces en el útero de un hospedador mamífero, de modo que se consiga el implante potenciado del embrión. En algunas realizaciones, la maduración completa del embrión *in vitro* se correlaciona con el establecimiento de un embarazo viable. Típicamente, una vez que una paciente se ha considerado candidata apropiada para el procedimiento, experimenta el método de la invención para determinar la receptividad del endometrio. Si el endometrio se considera receptivo, se realiza una biopsia del endometrio durante la cual se retira un pequeño trozo de su revestimiento uterino para obtener explantes de endometrio como se describe *supra*. Los explantes de endometrio entonces pueden enviarse a un laboratorio o empresa, donde se tratan, purifican y congelan. La paciente entonces experimenta un ciclo de IVF típico y se le administra medicación para estimular el crecimiento de los óvulos en los ovarios. Los óvulos de la paciente se recuperan y se mezclan con los espermatozoides. En este momento, El laboratorio empieza a descongelar y cultivar las células del endometrio obtenidas de los explantes de endometrio preparados anteriormente. Una vez se confirma la fertilización, los embriones de la paciente se cocultivan con células endometriales. Cuando se alcanza la fase de blastocisto, el embrión o embriones de la paciente se transfieren al útero para el implante y embarazo.

- 60 En algunas realizaciones de la presente divulgación, también se proporciona un método para aumentar el potencial de nacer vivo de un embrión de mamífero fertilizado *in vitro*. "Potencial de nacer vivo" se refiere a la capacidad de un embrión de nacer vivo. El método comprende cultivar un embrión hasta una fase de desarrollo de blastocisto, como se describe anteriormente, de modo que se consiga un potencial de maduración potenciada o una maduración completa de los embriones en cultivo. El blastocisto entonces se transfiere al útero de un hospedador mamífero; y se permite que el embrión se implante y crezca *in vivo*, de modo que se potencia la capacidad del embrión de nacer vivo respecto a la de un embrión que no se cultiva de acuerdo con la invención.

El método de la invención también es particularmente adecuado para limitar los embarazos múltiples porque ello puede proporcionar una tasa de implante mayor y, por lo tanto, podrían transferirse menos embriones en cada ciclo, provocando una incidencia disminuida de embarazos múltiples.

- 5 La invención se ilustrará adicionalmente por los siguientes ejemplos y figuras. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

### Descripción de las figuras

- 10 Figura 1: Identificación de nuevos biomarcadores de receptividad del endometrio.  
 Figura 2: Ensayo Win (ensayo de implante en ventana) durante la ventana de implante en un ciclo natural.  
 Figura 3: Consecuencias para la gestión sanitaria de la paciente durante el procedimiento de IVF.  
 Figura 4: Ensayo Win para comprobar el estado receptivo de pacientes entre ciclos naturales y estimulados.  
 Figura 5: Consecuencias para la gestión sanitaria de la paciente durante el procedimiento de IVF.  
 15 Figura 6: Ensayo Win para comprobar el estado receptivo de pacientes con múltiples fracasos de implante.  
 Figura 7: Ensayo Win para comprobar el estado receptivo de mujeres infértiles con enfermedades ginecológicas.  
 Figura 8: Ensayo Win para comprobar el impacto del tratamiento de sustitución hormonal durante la preparación del endometrio en pacientes destinatarias para la donación ovocitos.

### 20 Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### Material y métodos: Identificación de nuevos biomarcadores de receptividad del endometrio Haouzi et al., 2009) (Figura 1)

25 **Características de las pacientes y biopsias del endometrio:** Este proyecto ha recibido la aprobación del comité de revisión institucional. La población del estudio incluía 31 pacientes (edad de 30,4 años  $\pm$  3,2), reclutadas después de obtener el consentimiento informado por escrito. Todas las pacientes tenían niveles normales en suero de FSH, LH, estradiol y AMH en el día 3 y eran normales que responden al tratamiento durante un primer intento de ICSI previo. Se remitieron para ICSI para el factor de infertilidad masculino. Durante el mismo ciclo natural que precedía al segundo intento de ICSI, se obtuvieron dos biopsias del endometrio en todas las mujeres en el día 2 (LH+2) y el día 7 (LH+7) después del máximo de LH. El incremento de LH se estimó por la propia paciente de acuerdo con el primer día de su menstruación. No se realizó análisis histológico para verificar que la cronología de LH era precisa. Por lo tanto, no puede excluirse la posibilidad de un retardo de un día desde el primer día de la menstruación. Cada muestra de biopsia se lavó en PBS y se congeló a -80 °C en tampón de extracción de ARN RLT (kit RNeasy, Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.).

40 **Preparación de ARN complementario (ARNc) e hibridación de micromatriz:** Se usó el ARN total (100 ng) para preparar el ARNc marcado amplificado dos veces para la hibridación con matrices de oligonucleótidos pangenómicos HG-U133 plus 2.0 GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.) como se describe en (Haouzi et al., 2009).

45 **Análisis de los datos de micromatriz:** Las matrices HG-U133 plus 2.0 contienen 54 675 conjuntos de sondas oligonucleotídicas, que corresponden a  $\approx$  30 000 genes humanos únicos o genes predichos. El análisis de matriz se realizó con el GeneChip Operating Software 1.2 (Affymetrix) para medir la detección de ARN significativo (instrucción de detección "presente" o "ausente") y para evaluar la intensidad de la señal para cada conjunto de sondas.

50 **Bioinformática y análisis *in silico*:** Se usó el análisis significativo de micromatrices (SAM, Universidad de Stanford, EE. UU., Tusher et al. 2001) para identificar genes cuya expresión variaba significativamente entre los dos grupos de muestra, LH+2 (n=31) y LH+7 (n=31). SAM proporciona la media o mediana de los valores de cambio factorial (FC) y un porcentaje de confianza de la tasa de falso descubrimiento (FDR) basado en la permutación de datos.

55 Para comparar el perfil de expresión de las muestras de endometrio (n=62) de los grupos LH+2 y LH+7, se realizó una clasificación no supervisada tanto con análisis de componentes principales (PCA) como con agrupación jerárquica (Eisen et al., 1998; de Hoon et al., 2004). El PCA implicaba textos originales basados en el programa informático de estadística R a través de red RAGE (<http://rage.montp.inserm.fr>) (Reme et al., 2008). El análisis de agrupación jerárquica basado en los niveles de expresión de sondas variables se realizó con los paquetes de programa informático CLUSTER y TREEVIEW. Los perfiles de expresión genética se analizaron con el módulo de análisis supervisado RAGE, usando un ensayo U de Mann Whitney no paramétrico con múltiples correcciones de ensayo y se confirmaron con el programa informático SAM.

65 **Construcción de los factores pronósticos:** Este proceso de 3 etapas descrito de forma extensa en otra parte Rème et al., 2008) se ha modificado para muestras emparejadas. Se usaron instrucciones de detección de Affymetrix en todo momento con únicamente dos niveles de expresión, "Presente" como 1 y "distinto" como 0. Como recomiendan otros, los conjuntos de sonda se filtraron seleccionando la mitad del tamaño de una clase de muestras



como el número mínimo de instrucciones presentes en todas las muestras. Los conjuntos de sondas con señales poco informativas se eliminaron adicionalmente usando un coeficiente de variación, mínima de un 40 %, que da lugar a 16 130 conjuntos de sondas finales de un chip U133P de 54 613 conjuntos de sondas.

5 La reducción de la dimensionalidad de los datos se consiguió comparando cada distribución de conjunto de sondas en grupos de muestra considerados como extracciones múltiples de un criterio de dos fases (presencia = 1, distinto = 0). En resumen, para justificar las situaciones emparejadas (LH2 y LH7) para un paciente, se construyó un vector de conjunto de sondas cuyos valores son 0 si ambas situaciones dan lugar a la misma instrucción y 1 si difieren. Este vector entonces se compara con el vector nulo usando un ensayo  $\chi^2$ , con un valor P corregido de ensayo múltiple que produce una lista de un conjunto de 200-500 sondas, posteriormente usada para el análisis supervisado. La capacidad de dicha lista de separar las clases de muestras se evalúa como se describe previamente maximizando la significación de la muestra para las comparaciones de muestras usando un ensayo  $X^2$  con corrección de Bonferroni para ensayo múltiple y corrección de Yates para pequeñas cantidades de muestra en dos comparaciones de clase. Si se alcanza el umbral de significación, las muestras no están en la misma clase. Esto se repite para la comparación de cada muestra de clase emparejada con cualquier muestra de la otra clase y puede determinarse la cantidad inicial y la potencia de las comparaciones no significativas. La reducción de la lista se consigue minimizando la cantidad de comparaciones no significativas por eliminaciones sucesivas del conjunto de sondas que da la máxima mejora. El proceso se detiene cuando no puede mejorarse más ningún criterio por eliminación de conjuntos de sondas, siendo la lista restante los factores pronósticos.

20 Para una validación cruzada de dejar uno fuera, cada pareja de muestras se elimina a su vez y el proceso completo de reducción de la dimensionalidad y construcción de los factores pronósticos se ejecuta con corrección de Bonferroni sobre las muestras restantes como se describe para las clases iniciales. Cada conjunto de factores pronósticos construido de esta manera se ensaya para su capacidad de generar errores de clasificación incorrecta cuando la muestra excluida se devuelve a su clase, donde la cantidad de comparaciones no significativas debe ser 0.

## Resultados

30 **Perfil de expresión génica como función de la receptividad del endometrio:** La selección usando un coeficiente de variación ( $\geq 40\%$ ) y la "instrucción de detección" Ausente/Presente (presencia en al menos 15 muestras) entre muestras LH+2 y LH+7 se realizó en primer lugar, definiendo  $\approx 16\,200$  conjuntos de sondas. Después, se realizó un análisis SAM entre los grupos de muestra LH+2 y LH+7 (LH+2 frente a LH+7, análisis de muestras emparejadas). Se modularon significativamente 1012 genes entre estos dos grupos, incluyendo 945 genes regulados por aumento y 67 genes regulados por disminución en el grupo de muestra LH+7 (cambio factorial  $\geq 2$  y un valor  $P < 0,05$ ).

**Validación de la lista de factores pronósticos:** En primer lugar, se realizó un análisis PCA de las muestras LH+2 y LH+7 con la lista de factores pronósticos (que comprende 60 conjuntos de sondas) establecida anteriormente como se describe en materiales y métodos con un error de validación cruzada de dejar uno fuera de un 6 % para un valor  $P \leq 0,01$ . Se separó un 75 % de las muestras LH+7 de las otras muestras en este PCA usando las dos primeras dimensiones, que representa un 52 % de la información de datos. Después se ensaya nuestra lista de factores pronósticos en las muestras de Talbi *et al.*, (2006), que consistían en tres muestras de secreción prematura y ocho muestras de secreción intermedia. El análisis PCA de estas muestras independientes con nuestra lista de factores pronósticos permite una separación distintiva usando las dos primeras dimensiones, entre los dos grupos de muestras (LH+2 y LH+7), que representan un 53 % de la información de datos.

**Nueva selección de genes candidatos de la ventana de implante:** Para identificar nuevos marcadores de receptividad del endometrio, en primer lugar se cruzó nuestra lista de genes modulada significativamente entre los grupos de muestra LH+2 y LH+7 con las de otros cuatro estudios transcriptómicos que comparaban la misma fase del ciclo natural del endometrio (Carson *et al.*, 2002; Riesewijk *et al.*, 2003; Mirkin *et al.*, 2005; Talbi *et al.*, 2006) para identificar una lista de genes que comprende 797 genes modulados específicamente durante la ventana de implante y exclusivos para el presente estudio. Se realizó un agrupamiento jerárquico con los mismos datos (797 genes). Esta lista genes permitió la separación de dos grupos de muestra de endometrio. Curiosamente, la mayoría de estos genes estaban regulados por aumento durante la ventana de implante (746 genes regulados por aumento, 51 genes regulados por disminución).

Para seleccionar genes candidatos de la ventana de implante, entonces se ha comparado nuestra lista de genes modulados específicamente durante la ventana de implante y exclusivos para nuestro estudio con la lista de factores pronósticos. Se han seleccionado 10 nuevos genes que predicen la receptividad del endometrio, no enumerados en informes por análisis de micromatriz. Entre estos nuevos genes, únicamente 4 genes se han publicado en Haouzi *et al.* (2009). Estos nuevos marcadores publicados son MFAP5 (proteína 5 asociada a microfibrillas), ANGPTL1 (angiopoyetina de tipo 1), EG-VEGF también llamado PROK1 (factor de crecimiento del endotelio vascular derivado de glándula endocrina o procinética 1) y NLF2 (factor 2 de localización nuclear) y todos se sobreexpresan durante la ventana de implante en análisis de micromatriz respectivamente en un factor de 37, 12,6, 10,2 y 22,5. Además, un gen encontrado en otros dos análisis de micromatriz, establecidos por Riesewijk *et al.* (2003) y Talbi *et al.* (2006), y en nuestro estudio se eligieron como control positivo de receptividad del endometrio humano. Este gen es LAMB3 y

se sobreexpresa en un factor de 20,4 en nuestro estudio, y un factor de 15 y 6,6 en los estudios de Riesewijk y Tablbi respectivamente. Los seis genes no publicados fueron BCL2L10 (BCL2 de tipo 10), CD68, TRPC4 (canal de cationes por potencial de receptor transitorio, subfamilia C, miembro 4), SORCS1 (receptor 1 que contiene dominio VPS10 relacionado con sortilina), FST (folistatina) y KRT80 (queratina 80) que también se sobreexpresaban durante la ventana de implante en un factor de 4,7, 5,3, 7,7, 9, 9 y 14,6 respectivamente.

### **Análisis:**

Nuestro análisis de micromatriz identificó una serie de biomarcadores de receptividad del endometrio humano entre los que se seleccionaron 11 candidatos: LAMB3, MFAP5, ANGPTL1, EG-VEGF (PROK1), NLF2, FST, KRT80, BCL2L10, CD68, TRPC4 y SORCS1.

En el endometrio de babuino, la expresión de laminina está aumentada en el sitio de implante y en todo el endometrio, lo que sugiere una función de este componente de matriz extracelular en la receptividad del endometrio. MFAP5, también llamado MAGP2, también se sobreexpresaba en nuestro grupo de muestra LH+7. Este gen codifica una glucoproteína asociada a microfibrilla que es un componente de las microfibrillas, un componente estructural importante de los tejidos elásticos tales como la vasculatura. Mediante la interacción con la matriz extracelular, tal como colágeno y también las proteínas asociadas a las células, tales como integrinas, esta proteína, por lo tanto, está situada para modular potencialmente las interacciones de matriz celular y participar en las rutas de señalización celular. Además, recientemente se ha sugerido que MFAP5 tiene una función en la activación de la señalización de Notch, una ruta implicada en la vasculatura durante la embriogénesis, el desarrollo y la homeostasis normal.

También se descubrió que dos miembros de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular, EG-VEGF y ANGPTL1, se sobreexpresaban en el endometrio humano durante la ventana de implante. El factor de crecimiento del endotelio vascular derivado de glándula endocrina (EG-VEGF), también llamado PROK1, es un factor angiogénico y potenciador de la permeabilidad recién identificado expresado predominantemente en tejidos esteroideogénicos. EG-VEGF también se expresa en las muestras de endometrio normales periimplante de pacientes en edad de reproducción, y se detecta infrecuentemente en las muestras de endometrio de pacientes posmenopáusicas y pacientes con carcinoma endometrial. EG-VEGF se expresa predominantemente en las células epiteliales glandulares con un máximo de expresión de proteínas en la fase lútea intermedia del ciclo menstrual. La coexistencia de EG-VEGF y su receptor, PROKR1, en el endometrio apoya la idea de que EG-VEGF puede regular la proliferación, la angiogénesis y la permeabilidad y puede inducir la formación de fenestración endotelial. ANGPTL1 (angiopoyetina de tipo 1) es un miembro de la familia de proteínas relacionada con angiopoyetina. En estudios *in vitro*, ANGPTL1 tiene actividades antiapoptóticas a través de la ruta de fosfatidilinositol 3-cinasa/Akt y regula la angiogénesis. En el modelo de oveja ovariectomizada, se aumenta el ARNm de ANGPTL1 después de tratamiento con estradiol. En nuestro estudio, se observó una sobreexpresión del gen ANGPTL1 durante la ventana de implante del endometrio.

En nuestros datos de micromatriz y el análisis de PCR cuantitativo, la expresión del gen NLF2 era muy potente en el grupo de muestra LH+7, lo que sugiere que tiene una función en el remodelado del endometrio durante la ventana de implante. La invasión en el estroma del endometrio se facilita por inflamación. NLF2, también llamado C2CD4B (dominio dependiente de calcio C2 que contiene 4B), se identificó recientemente como un factor nuclear y como un miembro de una familia de genes reguladores que desempeñan una función en la inflamación de células endoteliales. Identificado inicialmente en un cribado en matriz del genoma completo de células endoteliales microvasculares humanas con interleucina 1beta, NLF2 es probablemente parte de la ruta de señalización que causa cambios en la arquitectura celular y la adhesión en la inflamación de células endoteliales.

La folistatina (FST) es una glucoproteína de la gónada de una cadena que inhibe específicamente la liberación de la hormona foliculoestimulante (FSH). La folistatina se ha descrito previamente presente en el endometrio y se localizó en células del estroma y epiteliales. La secreción de FSH desde células epiteliales podría ser importante para restringir la biodisponibilidad de activina dentro del lumen uterino. La folistatina también podría tener efectos independientes de activina y también puede unirse a otros miembros de la superfamilia de TGF beta, incluyendo inhibina y ciertos miembros de la familia de BMP (proteína morfogenética de los huesos). En el útero humano, los patrones de expresión del gen que codifica FST es coherente con una función en la decidualización, un evento clave para el implante de blastocistos y un resultado satisfactorio de embarazo después de IVF. Además, recientemente se ha informado de una expresión disminuida de FST en células epiteliales en el endometrio de mujeres con fracaso de implante después de IVF en comparación con mujeres fértiles de control, lo que refuerza la noción de que FST puede desempeñar una función en el implante. Este hallazgo fue coherente con el presente estudio que muestra una sobreexpresión de la expresión génica de FST en el endometrio receptivo humano.

También se identificó el gen de queratina 80 (KRT80) como un biomarcador de la ventana de implante a juzgar por su sobreexpresión en el endometrio receptivo en comparación con el endometrio prerreceptivo. Las queratinas son proteínas de los filamentos intermedios responsables de la arquitectura celular de las células epiteliales, lo que es necesario para conseguir una función específica. Estas proteínas son necesarias a nivel celular para la fagocitosis, pinocitosis, adhesión celular, motilidad celular, organización subcelular y división celular. A nivel tisular, las proteínas estructurales son necesarias para la contracción y mantener el epitelio intacto. Las proteínas estructurales también

pueden desempeñar una función en el tráfico intracelular a través de la red de microtúbulos.

La apoptosis desempeña una función crítica en el mantenimiento de la homeostasis celular durante la menstruación eliminando las células senescentes de la capa funcional del endometrio uterino durante la fase secretora tardía y menstrual del ciclo. Se detectó apoptosis en el epitelio glandular del endometrio secretor tardío y menstruante, mientras que se detectó muy poca apoptosis durante la fase proliferativa o al inicio de la fase secretora. Los miembros de la familia de proteínas Bcl2 son elementos fundamentales en las rutas que controlan la apoptosis y actúan como reguladores pro y antiapoptóticos. Entre ellos, BCL2L10, que ha demostrado previamente suprimir la apoptosis celular, se encontró, en el presente estudio, sobreexpresado en el endometrio receptivo humano en comparación con el endometrio prerreceptivo. Este hallazgo fue coherente con el periodo de detección de apoptosis a través del ciclo menstrual.

Los cambios en el número y distribución de macrófagos y células dendríticas podrían apuntar hacia una función posible de estas células inmunocompetentes en el implante y éxito de un embarazo temprano. En el presente estudio, se informó de la sobreexpresión del gen de CD68 en el endometrio receptivo, que codifica una glucoproteína transmembrana altamente expresada por monocitos humanos y macrófagos tisulares. Esta proteína de membrana integrada de tipo I se une a lectinas específicas de tejido y órgano o selectinas que se expresan abundantemente durante la ventana de implante.

TRPC4 es un miembro de la familia del canal de cationes por potencial de receptor transitorio que puede facilitar la entrada de calcio desde un almacenamiento (SOCE) para la señalización de calcio en el miometrio humano. El ARNm y la proteína de TRPC4 se han descrito previamente sobreexpresados en miometrio humano de un embarazo a término. Sin embargo, se informa por primera vez de una sobreexpresión de este gen en el endometrio receptivo en comparación con el endometrio prerreceptivo, lo que sugiere una función potencial de TRPC4 en el proceso de implante.

SORCS1, que se sobreexpresa en este estudio durante la ventana de implante humana, es el primer miembro identificado de un subgrupo de la familia del receptor de dominio Vps10p de mamífero que comprende un Vps10p-D N-terminal (llamado después proteína 10 de clasificación de proteínas vacuolares de levadura), un dominio rico en leucina, un único dominio transmembrana y un corto dominio citoplasmático. Las funciones de este gen no se dilucidaron porque se ha informado de que sorCS1 se sintetizaba como una proproteína que se escinde en formas maduras en la red a través del Golgi y se expresa en tres isoformas con diferentes dominios citoplasmáticos capaces de mediar un tráfico diferente del receptor.

En conclusión, nuestros datos usando el análisis del patrón transcriptómico del cambio del endometrio entre las fases prerreceptiva y receptiva podría abrir nuevas perspectivas, especialmente en pacientes con múltiples fracasos de implante. El análisis de estos biomarcadores permitiría (i) la evaluación del estado receptivo del endometrio de todas las pacientes que asisten para un procedimiento de IVF y, por consiguiente, la identificación de perfiles alterados del endometrio en algunas pacientes normales que responden al tratamiento. La información proporcionada por estos biomarcadores durante un ciclo natural entonces podría usarse posteriormente para adaptar el protocolo de IVF en pacientes con implante deficiente.

#### **Ejemplo 2: Perfil ejemplar de una paciente con evaluación de receptividad del endometrio en ciclo natural.**

De acuerdo con una realización de la invención, la evaluación de la receptividad del endometrio de una paciente comprende una primera etapa que consiste en medir la expresión de ARNm de los 11 biomarcadores (ensayo Win: ensayo de implante en ventana) durante la ventana de implante (LH+7) en ciclo natural (figura 2) y una segunda etapa que comprende dos escenarios: (i) la paciente presenta un retardo de su ventana de implante y, en este caso, el ensayo Win podría ayudar en la detección de la ventana de implante; (ii) el ensayo Win podría permitir la identificación de pacientes que nunca presentan un endometrio receptivo y, en este caso, se orientan hacia un procedimiento de adopción (figura 3): Consecuencias para la gestión sanitaria de la paciente durante el procedimiento de IVF.

#### **Ejemplo 3: Perfil ejemplar de una paciente con evaluación de receptividad del endometrio en ciclo estimulado.**

De acuerdo con una realización de la invención, las comparaciones de la expresión génica de las mismas pacientes entre ciclos naturales y estimulados reveló perfiles de endometrio asociados con una receptividad moderadamente alterada en la mayoría de los casos (86 %) o una receptividad muy alterada durante el protocolo COH en unos pocos casos (14 %) (figura 4). La invención proporciona dos consecuencias del ensayo Win: i) Podría considerarse el remplazo de embriones frescos durante el procedimiento de IVF. La congelación de embriones posibilita ahorrar un intento de IVF y la transferencia de embriones puede hacerse posteriormente durante un ciclo natural; ii) Para pacientes con múltiples fracasos de implante, el análisis del perfil del endometrio (ensayo Win) podría revelar un perfil fuertemente alterado durante protocolos COH, que promueve al médico a adaptar el protocolo de estimulación de IVF o a realizar una transferencia de embriones posterior durante un ciclo natural o a orientar al paciente a un procedimiento de adopción (figura 5).

**Ejemplo 4: Ensayo Win como medio para establecer tratamientos "a la carta" "adecuados".**

Los autores de la invención han descrito que ambos protocolos (antagonistas y agonistas de GnRH) afectaban a la receptividad del endometrio, pero de forma diferente. La cuestión para la gestión sanitaria de la paciente es "¿Qué protocolos usar?" respecto a los diferentes efectos de los análogos de GnRH y las respuestas heterogéneas de las pacientes durante los tratamientos.

De acuerdo con una realización de la invención, para pacientes con múltiples fracasos de implante, el análisis del perfil del endometrio (ensayo Win) podría ayudar al médico a adaptar el protocolo de estimulación de IVF (figura 6).

**Ejemplo 5: Ensayo Win para comprobar el estado receptivo de mujeres infértiles con enfermedades ginecológicas.**

De acuerdo con una realización de la invención, el ensayo Win podría usarse como marcadores para evaluar la receptividad del endometrio en mujeres con enfermedades ginecológicas. La relación potencial entre varias enfermedades ginecológicas (por ejemplo, endometriosis y adenomiosis) y una receptividad anómala del endometrio como una posible causa de subfertilidad en estas pacientes puede ensayarse con el ensayo Win (figura 7).

**Ejemplo 6: Ensayo Win para comprobar el impacto del tratamiento de sustitución hormonal durante la preparación del endometrio en pacientes destinatarias para la donación ovocitos.**

De acuerdo con una realización de la invención, el ensayo Win puede usarse para mejorar los tratamientos hormonales para la maduración del endometrio. El ensayo Win revela un perfil alterado del endometrio en el momento de la ventana de implante en pacientes destinatarias de ovocitos en tratamiento con sustitución hormonal (tratamientos con estrógeno y progesterona) en comparación con el ciclo natural (figura 8).

El "ensayo Win" (que comprende un conjunto de 11 genes publicados de la lista génica exclusiva y también de la lista de factores pronósticos) es una herramienta de diagnóstico particularmente relevante ya que los varios genes publicados de la lista exclusiva se han encontrado por otros estudios a niveles proteómicos (tabla B).

**Tabla B: Correlación entre los niveles de expresión génica y proteica que se mencionan como biomarcadores de receptividad del endometrio**

Nombre	Símbolo	Estudios transcriptómicos					Estudios proteómicos	
		Carson <i>et al.</i> (2002)	Riesewijk <i>et al.</i> (2003)	Mirkin <i>et al.</i> (2005)	Talbi <i>et al.</i> (2006)	Haouzi <i>et al.</i> (2009a)	Díaz-Gimeno <i>et al.</i> (2011)	Li <i>et al.</i> (2006)
Anexina A4	ANX A4		x 4	x 6,5	x 4,9	x 2,6	x 4,7	x 2,1
Anexina A2	ANXA2		x 4	x 5,6	x 2			x 1,9
Monoamina oxidasa A	MAOA		x 15			x 9,9	x 8,4	x 2,1
Transgelina 2	TAGLN		x 6			x 5,9		x 3,4
L-plastina	LCP1			x 2,6	x 1,6			x 1,7
Componente 1 de membrana del receptor de progesterona	PGRMC1				x -1,8			x 1,6
Estatmina 1	STMN1			x -3,2				x -2,4
Apolipoproteína L2	APOL2					x 2,4		x -2,2
Familia de aldehído deshidrogenasa 1, miembro A3	ALDH1 A3					x 16,5		x 3,7
Proteína A10 de unión a calcio S100	S100A10					x 3,5		x 1,8
								x 4,8

**Referencias**

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Carson DD, Lagow E, Thathiah A, Al-Shami R, Farach-Carson MC, Vernon M, Yuan L, Fritz MA, Lessey B. (2002).

Changes in gene expression during the early to mid-luteal (receptive phase) transition in human endometrium detected by high-density microarray screening. *Mol Hum Reprod.* 8(9):871-9.

De Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J. and Miyano, S. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004;20:1453-4. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genomewide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:14863-8.

- Eyheremendy V, Raffo FG, Papayannis M, Barnes J, Granados C, Blaquier J. (2010) Beneficial effect of autologous endometrial cell coculture in patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril*. 93(3):769-73.
- Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Rème T, Dewailly D, Hamamah S. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod*. 2009;24:198-205.
- 5 Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca S, Oehninger S. (2005). In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. *Hum Reprod*. 20(8):2104-17.
- Rème T, Hose D, De Vos J, Vassal A, Poulain PO, Pantesco V, Goldschmidt H, Klein B. A new method for class prediction based on signed-rank algorithms applied to Affymetrix microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 2008;11:9-16.
- 10 Riesewijk A, Martin J, van Os R, Horcajadas JA, Polman J, Pellicer A, Mosselman S, Simon C. (2003). Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod*. 9(5):253-64.
- 15 Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veeck L, Davis OK, Rosenwaks Z. (2004) Autologous endometrial coculture in patients with IVF failures: outcome of the first 1030 cases. *J Reprod Med* 49(6), 463-7.
- Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC. (2006). Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology*. 147(3):1097-121.
- 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para evaluar la receptividad del endometrio de una paciente, que comprende las etapas que consisten en:
  - 5 i) medir el nivel de expresión de once genes en una muestra de biopsia del endometrio obtenida de dicha paciente, en el que dichos genes son MFAP5, ANGPTL1, PROK1, NLF2, LAMB3, BCL2L10, CD68, TRPC4, SORCS1, FST y KRT80; y
  - 10 (ii) comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra de biopsia del endometrio con un control, en el que la detección de una sobreexpresión de los genes en la muestra de biopsia del endometrio en comparación con el control es indicativa de que el endometrio es receptivo.
2. Un método para identificar una célula competente del endometrio que comprende una etapa de evaluar la receptividad del endometrio de una paciente de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en el que una célula de un endometrio evaluado como receptivo es una célula competente del endometrio.
3. Una célula competente del endometrio para su uso en un método de fertilización *in vitro* (IVF), en la que dicho método comprende las etapas de:
  - 20 i) identificar una célula competente del endometrio de acuerdo con el método de la reivindicación 2;
  - ii) cultivar dicha célula competente identificada en la etapa i) para obtener una población de células endometriales; y
  - iii) cocultivar dicha población de células endometriales con un embrión.
- 25 4. Uso de un kit que comprende un medio para medir específicamente el nivel de expresión de once genes en una muestra de biopsia del endometrio para realizar el método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichos once genes son MFAP5, ANGPTL1, PROK1, NLF2, LAMB3, BCL2L10, CD68, TRPC4, SORCS1, FST y KRT80.

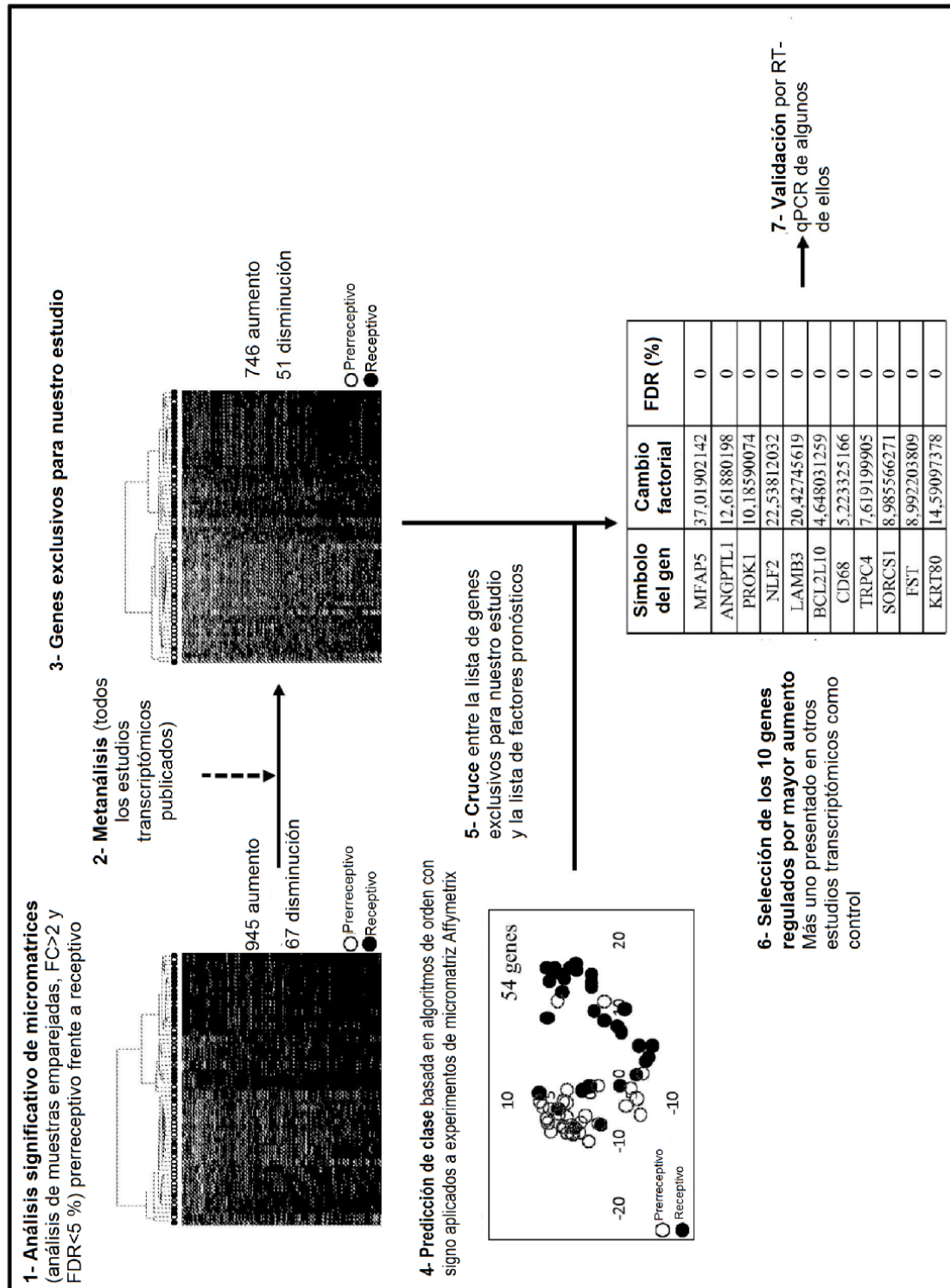
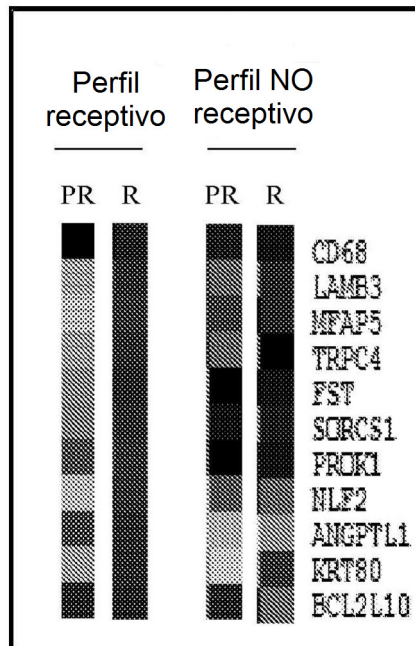


Figura 1

**"Ensayo Win"**

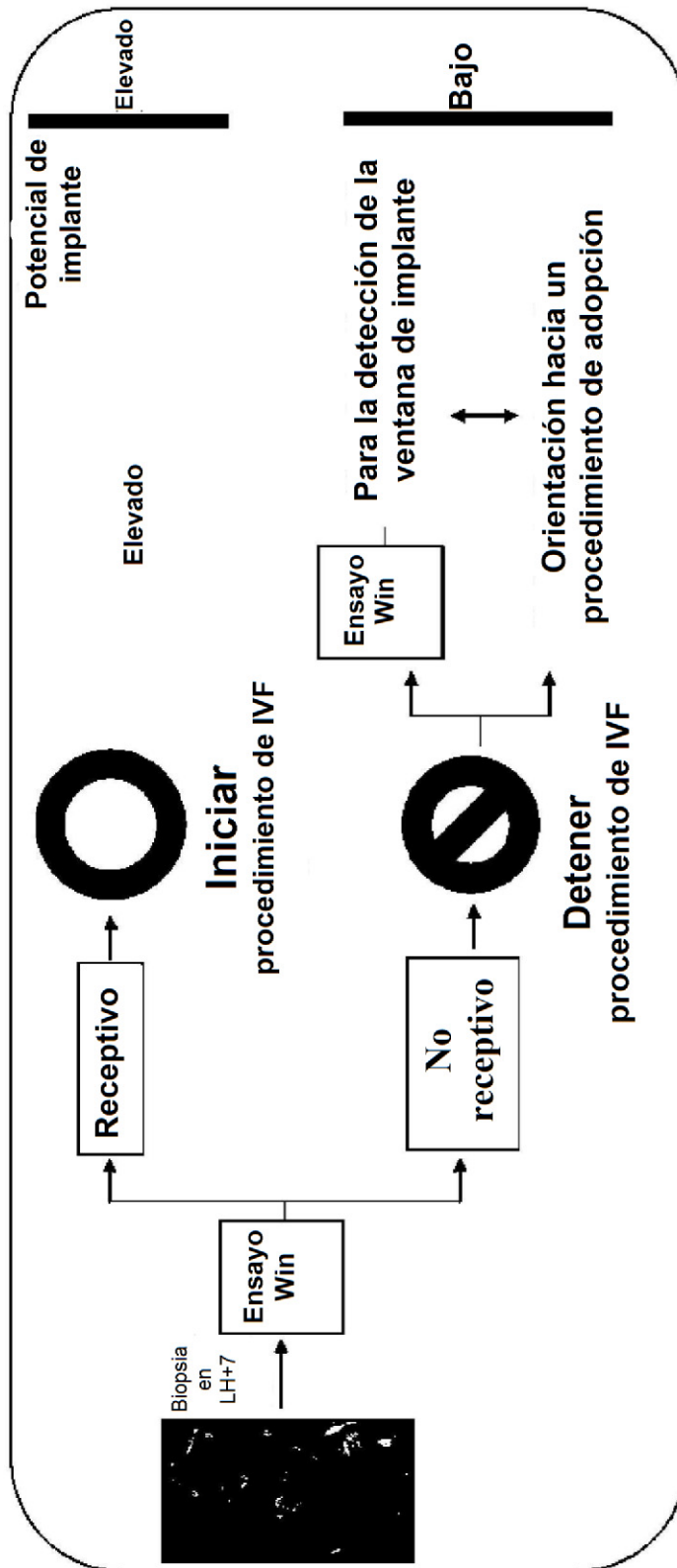


PR: muestra prerreceptiva (LH+2)

R: muestra receptiva (LH+7)

**Figura 2**



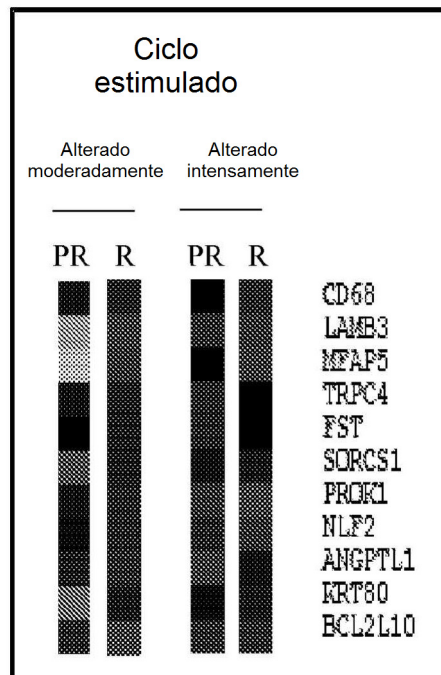


### El ensayo Win permite:

- ✓ reducir el tiempo de gestión sanitaria del paciente,
- ✓ evitar tratamientos duros e inútiles para el paciente.

Figura 3

**"Ensayo Win"**



PR: muestra prerreceptiva (hCG+2)

R: muestra receptiva (hCG+5)

**Figura 4**

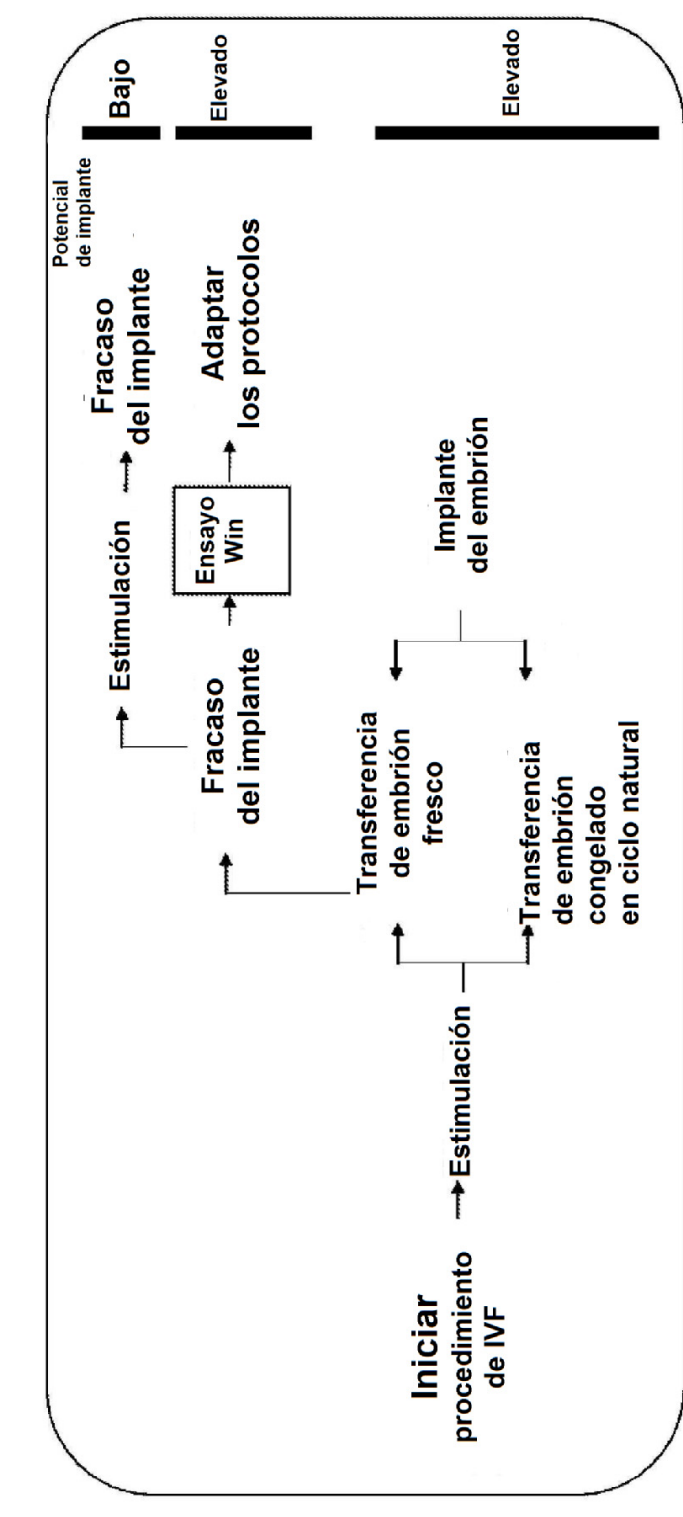
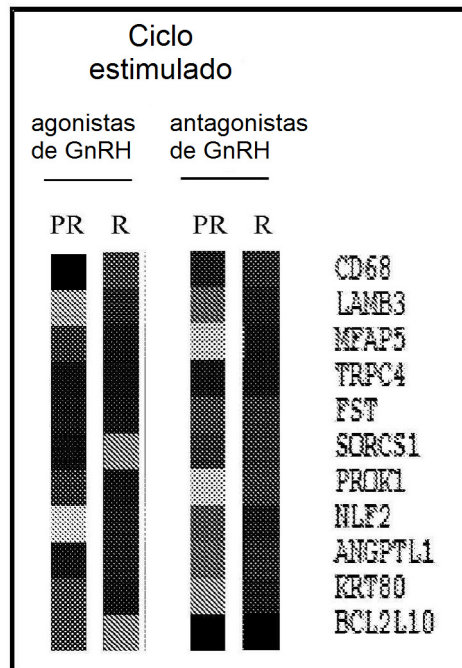


Figura 5

**"Ensayo Win"**

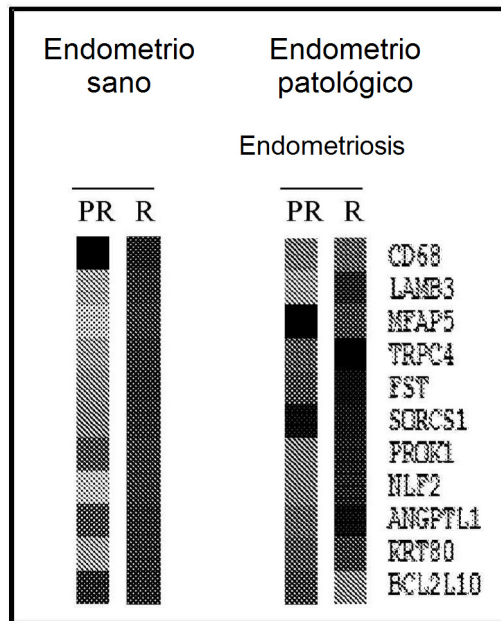


PR: muestra prerreceptiva (hCG+2)

R: muestra receptiva (hCG+5)

**Figura 6**

**"Ensayo Win"**

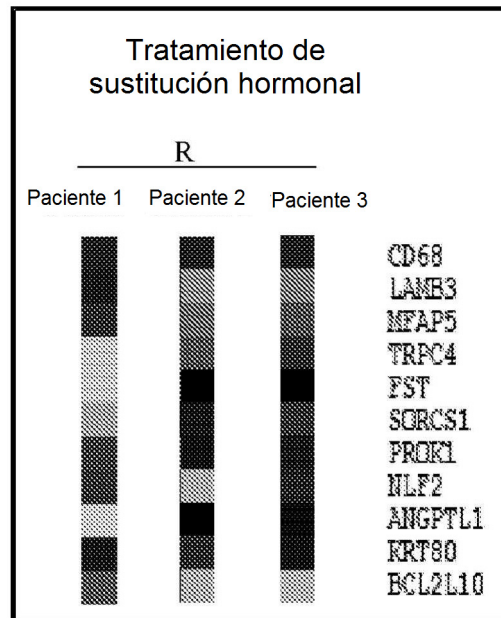


PR: muestra prerreceptiva (LH+2)

R: muestra receptiva (LH+7)

Figura 7

**"Ensayo Win"**



R: muestra receptiva

**Figura 8**