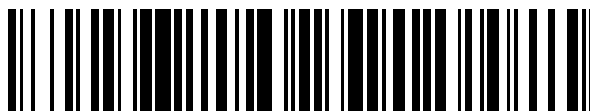


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 571**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2012 PCT/EP2012/070892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13057316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2012 E 12775259 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2768976**

54 Título: **Métodos de evaluación de la receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada**

30 Prioridad:

21.10.2011 EP 11306364

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

09.04.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAMAMAH, SAMIR y
HAOUZI, DELPHINE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 662 571 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 de evaluación de la receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a métodos y kits para evaluar la receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada.

10 **Estado de la técnica**

A pesar de los numerosos avances en la tecnología de reproducción asistida (TRA), las tasas de embarazo siguen siendo bajas tras una hiperestimulación ovárica controlada (HOC) y una fertilización *in vitro* (FIV). El establecimiento y mantenimiento del embarazo es un proceso complejo que depende de varios factores, incluyendo implantación exitosa, un embrión competente, un endometrio receptivo y una diafonía madre-embrión sincronizada. La identificación de biomarcadores de acuerdo con el resultado del embarazo supone un desafío para mejorar el resultado clínico en condiciones de FIV. Con el surgimiento de nuevas tecnologías como Omics, se han identificado biomarcadores como herramientas de descubrimiento que se pueden aplicar a FIV para la selección de embriones competentes, la apreciación de la receptividad endometrial y el diálogo sincronizado entre células del trofotodermo y endometriales (Assou *et al.*, 2008, 2010; Hamel *et al.*, 2008, 2010; Carson *et al.*, 2002; Diaz-Gimeno *et al.*, 2011; Domínguez *et al.*, 2009; Haouzi *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2006; Mirkin *et al.*, 2005; Riesewijk *et al.*, 2003; Talbi *et al.*, 2006; Haouzi *et al.*, 2011). Hasta la fecha, solo el perfil de expresión génica de las células foliculares tales como las células del cúmulo y de granulosa se correlacionó con el resultado del embarazo (Assou *et al.*, 2008, 2010; Hamel *et al.*, 2008, 2010; Gebhardt *et al.*, 2011; Assidi *et al.*, 2011). Con el fin de identificar nuevos biomarcadores relacionados con la receptividad de implantación y el resultado del embarazo, los inventores realizaron los perfiles de expresión génica del endometrio humano en el día de la extracción de ovocitos de pacientes respondedores jóvenes normales bajo una hiperestimulación ovárica controlada.

No existe divulgación alguna en la técnica de los biomarcadores de la receptividad endometrial en pacientes bajo una hiperestimulación ovárica controlada. Sin embargo, existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos para predecir el resultado de la receptividad endometrial en pacientes tras una hiperestimulación ovárica controlada.

Haouzi *et al* (*Human Reproduction*, vol. 24, n.º 6 págs. 1436-1445, 2009) desvelan que los tratamientos con gonadotropina en ciclos COS conducen a alteraciones de la activación transcripcional de genes implicados en la receptividad endometrial normal.

Además, Haouzi *et al* (*Biology of reproduction*, 82, 679-686, 2010) desvelan que el protocolo del antagonista de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y el protocolo del agonista de GnRH afectan a la receptividad endometrial en comparación con el ciclo natural en un mismo paciente.

40 **Objeto de la invención**

La invención se define por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un método de evaluación de la receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada, que comprende una etapa que consiste en medir el nivel de expresión de quince genes en una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de dicha paciente en el que dichos genes son FGFBP1, MUC20, TMPRSS3, PRUNE2, HES2, MGST1, ERRFI1, EDN1, SLC17A7, MET, CPT1B, DCDC2, LRRC39, IL18RAP y FOXP1.

50 **Descripción detallada de la invención**

Los inventores intentaron identificar genes expresados en el endometrio humano en el día de la obtención de ovocitos bajo una hiperestimulación ovárica controlada que podrían usarse como biomarcadores de la receptividad endometrial tras una hiperestimulación ovárica controlada.

Una serie de pacientes respondedoras jóvenes normales (<36 años) (n=32), remitidas a FIV debido a infertilidad masculina se sometieron a biopsias endometriales el día de la obtención de ovocitos (36 horas después de la administración de hCG, hCG+2) bajo hiperestimulación ovárica controlada. El ARNm extraído de muestras de biopsia endometrial se analizó individualmente en affymetrix HG-U133 más micromatrices de oligonucleótidos 2.0 GeneChip. El perfil de expresión génica diferencial de acuerdo con el resultado del embarazo en curso (10 pacientes embarazadas contra 22 no embarazadas) se evaluó con métodos bioinformáticos (ASM, análisis significativo de micromatrices, cambio múltiplo > 1,2 y TDF < 5 %). Los genes se analizaron usando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

Se identificó una huella genética en el endometrio el día de la extracción de ovocitos asociada con un resultado

positivo de embarazo. Esta firma molecular comprendía 124 genes (correspondiente a 137 conjuntos de sondas) que estaban todos regulados negativamente en el grupo del resultado positivo de embarazo. La agrupación jerárquica confirmó que estos 124 genes enumeran efectivamente el 100 % de las muestras endometriales asociadas con y sin el logro de un embarazo (Figura 1).

5 Entre los genes cuya expresión disminuida está asociada con el embarazo, las vías biológicas más sobrerrepresentadas fueron la señalización de HGF y FGF. Incluyeron HGF (x-1,8, TDF<0,0001), FGF18 (x-1,8, TDF<0,0001), FGF18 (x-1,8, TDF<0,0001), FGF18 (x-1,8, TDF<0,0001) y MET (x-2,1, TDF <0,0001). Se seleccionaron los quince primeros genes más regulados negativamente (FGFBP1, MUC20, TMPRSS3, PRUNE2, HES2, MGST1, ERFF11, EDN1, SLC17A7, MET, CPT1B, DCDC2, LRRC39, IL18RAP, FOXP1) y se propusieron como valor pronóstico de receptividad endometrial tras una hiperestimulación ovárica controlada. Puesto que la biopsia endometrial es un procedimiento fácil de realizar en el día de la obtención de ovocitos bajo una hiperestimulación ovárica controlada, el método representa una nueva estrategia para mejorar las tasas de implantación y embarazo de las pacientes con implantes pobres.

15 En consecuencia, la presente invención se refiere a un método de evaluación de la receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada, que comprende una etapa que consiste en medir el nivel de expresión de quince genes en una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de dicha paciente en el que dichos quince genes son FGFBP1, MUC20, TMPRSS3, PRUNE2, HES2, MGST1, ERFF11, EDN1, SLC17A7, MET, CPT1B, DCDC2, LRRC39, IL18RAP y FOXP1.

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

25 La expresión "hiperestimulación ovárica controlada" u "HOC" tiene un significado general en la técnica y se refiere al método de inducción de un ciclo estimulado para el cual una paciente produce más de un ovocito. Normalmente, la HOC se realiza con una combinación de protocolos de agonista o antagonista de GnRH con gonadotropina menopáusica humana (hMG) altamente purificada o FSH recombinante.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "receptividad endometrial" es un periodo en el cual el endometrio adquiere un estado funcional que permite la adhesión del blastocisto y que conducirá a un embarazo exitoso.

35 En una realización particular, la biopsia se realiza durante el ciclo estimulado (el ciclo tras una HOC) y preferentemente en el día de la obtención de ovocitos (hCG+2).

Se mide el nivel de expresión de los quince genes.

40 Todos los genes pertenecientes a la invención son conocidos *per se*, y se enumeran en la Tabla A a continuación.

Tabla A: Conjunto de genes predictivos.

Símbolo génico	Nombre génico	ID génica
FGFBP1	Proteína de unión del factor de crecimiento de fibroblastos 1	9982
MUC20	Mucina 20 asociada a una superficie celular	200958
TMPRSS3	Proteasa transmembranal, serina 3	64699
PRUNE2	Homólogo de prune 2 (Drosophila)	158471
HES2	Hairy y enhancer de split 2 (Drosophila)	54626
MGST1	Glutación S-transferasa microsomal 1	4257
ERFF11	Inhibidor por retroalimentación del receptor ERBB 1	54206
EDN1	Endotelina 1	1906
SLC17A7	Miembro 7 de la familia de transportadores de soluto (co-transportador de fosfato inorgánico dependiente de sodio)	57030
MET	Protooncogén Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)	4233
CPT1B	Carnitina palmitoiltransferasa 1B (músculo)	1375
DCDC2	2 que contiene un dominio doublecortin	51473
LRRC39	39 que contiene una repetición rica en leucinas	127495
IL18RAP	proteína de accesorio del receptor de interleucina 18	8807
FOXP1	Forkhead box P1	27086

45 La determinación del nivel de expresión de los genes como se ha descrito anteriormente en la Tabla A puede realizarse por una variedad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión como se determina es un nivel de expresión relativa.

Más preferentemente, la determinación comprende poner en contacto la muestra de biopsia endometrial con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y detectar de ese modo la presencia, o medir

originalmente la cantidad, de polipéptido o ácidos nucleicos de interés en la muestra de biopsia endometrial. La puesta en contacto se puede realizar en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, una placa de microtitulación, un tubo de ensayo, un pocillo, un cristal, una columna, etc. En realizaciones específicas, la puesta en 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 comprende vidrio, plástico, nylon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede tener varias formas y tamaños, tales como un portaobjetos, una membrana, una perla, una columna, un gel, etc. La puesta en contacto puede realizarse en cualquier condición adecuada para que se forme un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo anticuerpo-antígeno, entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra de biopsia endometrial.

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

Los métodos de determinación de la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en la muestra de biopsia endometrial se extrae primero de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo usando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae mediante resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído se detecta acto seguido por hibridación (p. ej., análisis de membrana Northern) y/o amplificación (p. ej., RT-PCR). Preferentemente, se prefiere RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa. La RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa en tiempo real es particularmente ventajosa.

Otros métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa (RCL), la amplificación mediada por transcripción (AMT), la amplificación por desplazamiento de cadena (ADC) y la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (ABSAN).

Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que exhiben complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés encuentran utilidad en la presente memoria como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Queda entendido que tales ácidos nucleicos no necesitan ser idénticos, sino normalmente ser al menos aproximadamente 80 % idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferentemente 85 % idénticos e incluso más preferentemente 90-95 % idénticos. En ciertas realizaciones, resultará ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como una etiqueta detectable para detectar la hibridación. En la técnica se conoce una amplia variedad de indicadores apropiados que incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (p. ej., avidina/biotina).

Las sondas comprenden normalmente ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 y 1.000 nucleótidos de longitud, por ejemplo de entre 10 y 800, más preferentemente de entre 15 y 700, normalmente de entre 20 y 500. Los cebadores son normalmente ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de entre 10 y 25 nucleótidos de longitud, diseñados para coincidir perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, que se va a amplificar. Las sondas y cebadores son "específicos" de los ácidos nucleicos a los que se hibridan, es decir, se hibridan preferentemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondiente a la temperatura de fusión más alta T_m , p. ej., 50 % de formamida, 5x o 6x SCC. SCC es NaCl 0,15 M, Na-citrato 0,015 M).

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

En una realización particular, los métodos de la invención comprenden las etapas que consisten en proporcionar ARNs totales extraídos a partir de muestras de biopsia endometrial y someter los ARN a amplificación e hibridación con sondas específicas, más particularmente por medio de una RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa.

En otra realización preferente, el nivel de expresión se determina mediante análisis de chip de ADN. Tal chip de ADN o micromatriz de ácido nucleico consiste en sondas de ácido nucleico diferentes que están unidas 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 por polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, materiales basados en sílice o sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos tales como 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 endometrial de una paciente de ensayo, opcionalmente sometida en primer lugar a una transcripción inversa, se etiqueta y pone en contacto con la micromatriz en condiciones de hibridación, lo que conduce a la formación de complejos entre ácidos nucleicos diana que son complementarios a secuencias de sonda unidas a la superficie de la micromatriz. Los complejos hibridados etiquetados se detectan posteriormente y se pueden cuantificar o semicuantificar. El etiquetado puede lograrse mediante diversos métodos, p. ej., mediante el uso de etiquetas radiactivas o fluorescentes. Muchas variantes de la tecnología de hibridación de micromatrices están disponibles para el experto en la materia (véase, p. ej., la revisión de Hoheisel, *Nature Reviews, Genetics*, 2006, 7:200-210).

En este contexto, la invención proporciona además un chip de ADN que comprende un soporte sólido que transporta ácidos nucleicos que son específicos de los genes enumerados en la tabla A.

5 Otros métodos de determinación del nivel de expresión de dichos genes incluyen la determinación de la cantidad de proteínas codificadas por dichos genes.

10 Tales métodos comprenden poner en contacto la muestra de biopsia endometrial con un compañero de unión capaz de interactuar selectivamente con una proteína marcadora presente en la muestra de biopsia endometrial. El compañero de unión es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal.

15 La presencia de la proteína puede detectarse usando técnicas de electroforesis e inmunodiagnóstico convencionales, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, entre otros, membranas Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados por enzimas y mediadores, tales como ELISA; ensayos de tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; Inmunolectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones incluyen generalmente etiquetas reveladoras tales como etiquetas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas o moléculas de colorante, u otros métodos de detección de la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos reaccionados con el mismo.

20 Los ensayos mencionados anteriormente implican generalmente la separación de una proteína no unida en una fase líquida de un soporte en fase sólida al que se unen los complejos antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (p. ej., en forma de membrana o pocillo de microtitulación); cloruro de polivinilo (p. ej., láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (p. ej., perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilidina; papel diazotado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles y similares.

30 Más particularmente, se puede usar un método de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un anticuerpo contra la proteína a ensayar. Posteriormente se agrega una muestra de biopsia endometrial que contiene o se sospecha que contiene la proteína marcadora a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la(s) placa(s) puede(n) lavarse para eliminar fracciones no unidas y añadir una molécula de unión secundaria detectablemente marcada. La molécula de unión secundaria se deja reaccionar con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta usando métodos bien conocidos en la técnica.

35 Alternativamente, puede preferirse un método de inmunohistoquímica (IHQ). La IHQ proporciona específicamente un método de detección que se orienta selectivamente en la muestra de biopsia endometrial *in situ*. La integridad celular global de la muestra de biopsia endometrial se mantiene en IHQ, lo que permite la detección tanto de la presencia como la ubicación de las dianas de interés. Normalmente, una muestra de biopsia endometrial se fija con formalina, se incrusta en parafina y se corta en secciones para su tinción y posterior inspección mediante microscopía óptica. Los métodos actuales de IHQ usan etiquetado directo o etiquetado secundario basado en anticuerpos o basado en haptenos. Los ejemplos de sistemas IHQ 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).

45 En una realización particular, una sección de tejido (es decir, muestra de biopsia endometrial) puede montarse en un portaobjetos u otro soporte después de la incubación con anticuerpos dirigidos contra las proteínas codificadas por los genes de interés. A continuación, se pueden realizar inspecciones microscópicas en la muestra montada en un soporte sólido adecuado. Para la producción de fotomicrografías, las secciones que comprenden la muestra de biopsia endometrial pueden montarse en un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano para que resalte mediante tinción selectiva la presencia de las proteínas de interés.

50 Por lo tanto, las muestras de biopsia endometrial por IHQ pueden incluir, por ejemplo: (a) preparaciones que comprenden células endometriales (b) dichas células fijadas e incrustadas y (c) detección de las proteínas de interés en dichas muestras de biopsia endometrial. En algunas realizaciones, un procedimiento de tinción por IHQ puede comprender etapas tales como: corte y recorte de tejido, fijación, deshidratación, infiltración de parafina, corte en secciones delgadas, montaje en portaobjetos de vidrio, coacción, desparafinación, rehidratación, recuperación de antígeno, etapas de bloqueo, aplicación de anticuerpos primarios, lavado, aplicación de anticuerpos secundarios (opcionalmente acoplados a una etiqueta detectable adecuada), lavado, contratinción y examen microscópico.

60 El método de la invención puede comprender además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra de biopsia endometrial con una muestra de control, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra de biopsia endometrial y la muestra de control es indicativo de si el endometrio es receptivo o no. Normalmente, la muestra de control puede consistir en una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de un endometrio receptivo o un endometrio no receptivo y, preferentemente, una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de un endometrio no receptivo. Normalmente, el nivel de expresión

de dicho(s) gen(es) en una paciente cuyo endometrio es receptivo se considera inferior ("expresión disminuida") a la muestra de control que consiste en una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de un endometrio no receptivo. Por ejemplo, un gen expresado negativamente tiene un nivel de expresión de al menos 1,5, al menos 2, al menos 2,5, al menos 5, al menos 7,5 o al menos 10 veces menor que el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control.

El método de la invención comprende las etapas que consisten en la medición del nivel de expresión de 15 genes de la invención en la muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada, cálculo de una puntuación y comparación de dicha puntuación con un valor de referencia.

En una realización, dicho valor de referencia puede ser una puntuación calculada en las muestras de biopsia endometrial de un control negativo (una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de una paciente no embarazada con endometrio no receptivo) o un control positivo (una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de una paciente embarazada con endometrio receptivo).

En una realización, la puntuación puede ser la media o el promedio de los niveles de expresión de todos los genes medidos en la muestra de biopsia endometrial.

Los inventores han demostrado así que la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) puede repercutir en la receptividad endometrial. En consecuencia, el método de la invención abre nuevas perspectivas en TRA, particularmente en pacientes con múltiples fracasos de implantación. En este caso, el análisis del perfil endometrial podría revelar un perfil fuertemente alterado durante los protocolos de HOC, lo que llevó al médico a adaptar el protocolo de estimulación de FIV o realizar la transferencia de embriones más tarde durante un ciclo natural. Más particularmente, cuando la receptividad del endometrio se ve seriamente comprometida por el protocolo de HOC, el reemplazo de embriones recientes debe ser cancelado, el reemplazo del embrión (u ovocito) congelado y descongelado debe realizarse en ciclos naturales.

La invención también se refiere al uso de un kit para realizar los métodos descritos anteriormente, en el que dicho kit comprende medios para medir el nivel de expresión del gen seleccionado de la Tabla A.

La invención se refiere además a un kit que comprende medios para la medición específica de los niveles de expresión de FGFBPL MUC20, Tmprss3, Prune2, HES2, Must1, Errfi1, Edn1, SLC17A7, MET, CPT1B, DCDC2, Lrrc39, IL18rap, y Foxp1, en el que dichos medios son cebadores o anticuerpos.

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

Descripción de las figuras:

Figura 1: El listado de genes del "resultado del embarazo" delinea dos grupos de muestras endometriales de acuerdo con el resultado del embarazo. P⁻, sin embarazo; P⁺, con embarazo positivo.

Figura 2: Receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada. La muestra de biopsia endometrial se obtuvo el día de la obtención de ovocitos. La expresión disminuida de los genes de la invención es indicativa de que el endometrio no es receptivo. La paciente presenta un endometrio no receptivo y una transferencia de embriones desfavorable.

Figura 3: Receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada. La muestra de biopsia endometrial se obtuvo el día de la obtención de ovocitos. La sobreexpresión de los genes de la invención es indicativa de que el endometrio es receptivo. La paciente presenta un endometrio receptivo y una transferencia de embriones favorable.

Ejemplos

EJEMPLO 1:

Material y métodos

Características de la paciente y biopsia endometrial: Este proyecto recibió la aprobación del Consejo de Revisión Institucional. La población de estudio incluyó 32 pacientes respondedoras normales (FSH sérica, LH y estradiol normales en el día 3), edad <36 años y remitidas a FIV debido a infertilidad masculina. Las pacientes habían controlado la estimulación ovárica con una combinación de protocolos largos de antagonistas o agonistas de GnRH con gonadotropina menopáusica humana altamente purificada o FSH recombinante. Después de haber recopilado el consentimiento informado del paciente, se llevó a cabo una biopsia endometrial en condiciones de ciclo estimulado y en el día de la obtención de ovocitos (hCG+2). Cada biopsia se congeló a -80 °C en tampón de extracción de ARN RLT (RNeasy Mini kit, Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.).

Preparación de ARN complementario (ARNc) e hibridación de micromatrices: Se usó ARN total (entre 50 y 100 ng) para preparar ARNc amplificado dos veces y etiquetado para hibridación con HG-U133 más matrices 2.0 (Affymetrix™) como se describe en Haouzi *et al.* (2009). Cada biopsia endometrial se procesó individualmente en un chip de micromatrices de ADN.

5

Procesamiento de datos:

Las imágenes escaneadas por GeneChip se procesaron usando el software AGCC (Affymetrix GeneChip Command Console). Los datos de micromatrices se analizaron usando el software Affymetrix Expression Console y la normalización se realizó con el algoritmo MAS5 para obtener una llamada de detección y una señal de valor de intensidad para cada conjunto de sondas.

10

Bioinformática y análisis *in silico*:

15 El análisis significativo de micromatrices (ASM, Universidad de Stanford, EE. UU., Tusher *et al.* 2001) se usó para identificar genes cuya expresión varió significativamente entre los dos grupos de muestra de hCG+2, embarazadas (n=10) y no embarazadas (n=22). ASM proporciona valores de cambio múltiple de media o mediana (CM) y un porcentaje de confianza de tasa de descubrimiento falso (TDF) basada en la permutación de datos.

20 Para comparar la expresión del perfil de las muestras endometriales de hCG+2 (n=32) de grupos de embarazadas y no embarazadas, se realizó una clasificación supervisada con un agrupamiento jerárquico. El análisis del agrupamiento jerárquico basado en los niveles de expresión de sondas variables se realizó con los paquetes de software CLUSTER y TREEVIEW.

25 Anotaciones funcionales:

Los listados de genes seleccionados se analizaron usando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Esos genes con símbolos genéticos conocidos y sus correspondientes valores de expresión se cargaron en el software. Cada símbolo genético se asignó a su diana génica correspondiente en la Ingenuity Pathways Knowledge Base. Las redes de estos genes se generaron algorítmicamente en función de su conectividad y se les asignó una puntuación. La puntuación es un valor numérico usado para clasificar las redes de acuerdo con su relevancia para los genes en el conjunto de datos de entrada, pero puede no ser una indicación de la calidad o importancia de la red. La puntuación tiene en cuenta el número de genes de enfoque en la red y el tamaño de la red para aproximar cuán relevante es esta red al listado original de genes de enfoque. La red identificada se presenta a continuación como un gráfico que indica las relaciones moleculares entre genes/productos génicos. Los genes se representan como nodos y la relación biológica entre dos nodos se representa como un borde (línea).

30

35

40 Resultados

Distinto perfil de expresión génica de hCG+2 en el endometrio entre pacientes embarazadas y no embarazadas

Se realizó en primer lugar una selección usando un coeficiente de variación ($\geq 40\%$) y la "llamada de detección" ausente/presente (presencia en al menos 1 muestra) entre muestras endometriales de hCG+2 de pacientes embarazadas y no embarazadas, delineando 14.378 conjuntos de sonda. Luego, se realizó un análisis ASM entre los dos grupos: 137 conjuntos de sonda correspondientes a 124 genes se regularon negativamente de manera significativa en el grupo de embarazadas en comparación con el grupo de no embarazadas. El agrupamiento supervisado con estos 124 genes separaba claramente los dos grupos endometriales (Figura 1). Los quince genes más regulados negativamente se enumeran en la Tabla B.

45

50

Dos vías principales de señalización difieren entre grupos endometriales de embarazadas y no embarazadas

Entre los genes cuya expresión disminuida está asociada con el embarazo, las vías biológicas más sobrerrepresentadas fueron la señalización de HGF y FGF. Incluyeron HGF (x-1,8, TDF <0,0001), FGF18 (x-1,8, TDF <0,0001), FGF18 (x-1,8, TDF <0,0001) y MET (x-2,1, TDF <0,0001).

55

Símbolo génico	Nombre génico	ID génica	Cambio múltiplo	Valor q (%)
FGFBP1	Proteína de unión del factor de crecimiento de fibroblastos 1	9982	-3,888	0
MUC20	Mucina 20 asociada una superficie celular	200958	-2,599	0
TMPRSS3	Proteasa transmembranal, serina 3	64699	-2,411	0
PRUNE2	Homólogo de prune 2 (Drosophila)	158471	-2,401	0
HES2	Hairy y enhancer de split 2 (Drosophila)	54626	-2,360	0
MGST1	Glutación S-transferasa microsomal 1	4257	-2,354	0

Símbolo génico	Nombre génico	ID génica	Cambio múltiplo	Valor q (%)
ERRF1	Inhibidor por retroalimentación del receptor ERBB 1	54206	-2,322	0
EDN1	Endotelina 1	1906	-2,245	0
SLC17A7	Miembro 7 de la familia de transportadores de soluto (co-transportador de fosfato inorgánico dependiente de sodio)	57030	-2,158	0
MET	Protooncogén Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos)	4233	-2,124	0
CPT1B	Carnitina palmitoiltransferasa 1B (músculo)	1375	-2,046	0
DCDC2	2 que contiene un dominio doublecortin	51473	-2,028	0
LRRC39	39 que contiene una repetición rica en leucinas	127495	-2,025	0
ILL18RAP	Proteína de accesorio del receptor 18 de interleucina	8807	-2,019	0
FOXP1	Forkhead box P1	27086	-1,970	0

Tabla B: Conjunto de genes predictivos.

EJEMPLO 2:

5

Los inventores han llevado a cabo estudios prospectivos para validar la relevancia de los ensayos de diagnóstico de acuerdo con la invención para evaluar la receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada.

10

La población de estudio incluyó a todas las pacientes bajo COS sometidas a procedimientos de FIV/IIPE. El método de acuerdo con la invención ha sido validado por inventores usando RT-PCR cuantitativa en una muestra de biopsia endometrial obtenida el día de la obtención de ovocitos.

15

Se midió el nivel de expresión de los 15 genes de la invención en la muestra de biopsia endometrial de las pacientes, se calculó la media del nivel de expresión de los 15 genes de la invención y se comparó con el nivel de expresión de dichos genes en las muestras de biopsia endometrial de un control negativo (paciente sin embarazo) y un control positivo (paciente con embarazo).

20

Los resultados demostraron que la expresión disminuida de los genes de la invención es indicativa de que el endometrio es receptivo (Figura 2) y la sobreexpresión de los genes de la invención es indicativa de que el endometrio es no receptivo (Figura 3). Los genes de la invención presentan un valor pronóstico de la receptividad endometrial tras una hiperestimulación ovárica controlada.

Referencias

25

A lo largo de la presente solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

30

Assidi M, Montag M, Van der Ven K, Sirard MA. *Biomarkers of human oocyte developmental competence expressed in cumulus cells before ICSI: a preliminary study.* *J Assist Reprod Genet.* 2011;28(2):173-88.

Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. *Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes.* *Mol Hum Reprod.* 2010;16(8):531-8.

35

Assou S, Haouzi D, Mahmoud K, Aouacheria A, Guillemin Y, Pantesco V, Rème T, Dechaud H, De Vos J, Hamamah S. *A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study.* *Mol Hum Reprod.* 2008;14(12):711-9.

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, 871-879.

40

Diaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Alamá P, Pellicer A, Simon C, 2011. *A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature.* *Fertil. Steril.* 95(1), 50-60, 60.e1-15.

Dominguez F, Garrido-Gómez T, López JA, Camafeita E, Quinonero A, Pellicer A, Simon C, 2009. *Proteomic analysis of the human receptive versus non-receptive endometrium using differential in-gel electrophoresis and MALDI-MS unveils stathmin 1 and annexin A2 as differentially regulated.* *Hum. Reprod.* 24, 2607-2617.

45

Gebhardt KM, Feil DK, Dunning KR, Lane M, Russell DL. *Human cumulus cell gene expression as a biomarker of pregnancy outcome after single embryo transfer.* *Fertil Steril.* 2011;96(1):47-52.e2.

Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A, Sirard MA. *Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes.* *Hum Reprod.* 2008;23(5):1118-27.

50

Hamel M, Dufort I, Robert C, Léveillé MC, Leader A, Sirard MA. *Genomic assessment of follicular marker gene as pregnancy predictors for human IVF.* *Mol Hum Reprod.* 2010;16(2):87-96.

Haouzi D, Dechaud H, Assou S, Monzo C, de Vos J, Hamamah S. *Transcriptome analysis reveals dialogues between human trophectoderm and endometrial cells during the implantation period.* *Hum Reprod.*

- 2011;26(6):1440-9.
- Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, Rème T, Dewailly D, Hamamah S, 2009. Identification of *new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle*. *Hum. Reprod.* 24, 198-205.
- 5 Li J, Tan Z, Li MT, Liu YL, Liu Q, Gu XF, Zhou JZ, Zhuang GL, 2006. [Study of altered expression of *annexin IV and human endometrial receptivity*]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 41, 803-805.
- 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, 2104-2117.
- 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, 253-264.
- 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, 1097-1121.
- 15 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2001;98;5116-5121.

REIVINDICACIONES

1. Un método de evaluación de la receptividad endometrial de una paciente tras una hiperestimulación ovárica controlada, que comprende una etapa que consiste en medir el nivel de expresión de quince genes en una muestra de biopsia endometrial obtenida a partir de dicha paciente en el que dichos genes son FGFBP1, MUC20, TMPRSS3, PRUNE2, HES2, MGST1, ERFFI1, EDN1, SLC17A7, MET, CPT1B, DCDC2, LRR39, IL18RAP y FOXP1.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra de biopsia endometrial con una muestra de control, en el que la detección de una diferencia en el nivel de expresión de los genes entre la muestra de biopsia endometrial y la muestra de control es indicativa de si el endometrio es receptivo o no.
3. Uso de un kit para realizar el método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho kit comprende medios para medir específicamente los niveles de expresión de FGFBP1, MUC20, TMPRSS3, PRUNE2, HES2, MGST1, ERFFI1, EDN1, SLC17A7, MET, CPT1B, DCDC2, LRR39, IL18RAP y FOXP1.
4. Un kit que comprende medios para medir específicamente los niveles de expresión de FGFBP1, MUC20, TMPRSS3, PRUNE2, HES2, MGST1, ERFFI1, EDN1, SLC17A7, MET, CPT1B, DCDC2, LRR39, IL18RAP y FOXP1, en el que dichos medios son cebadores o anticuerpos.

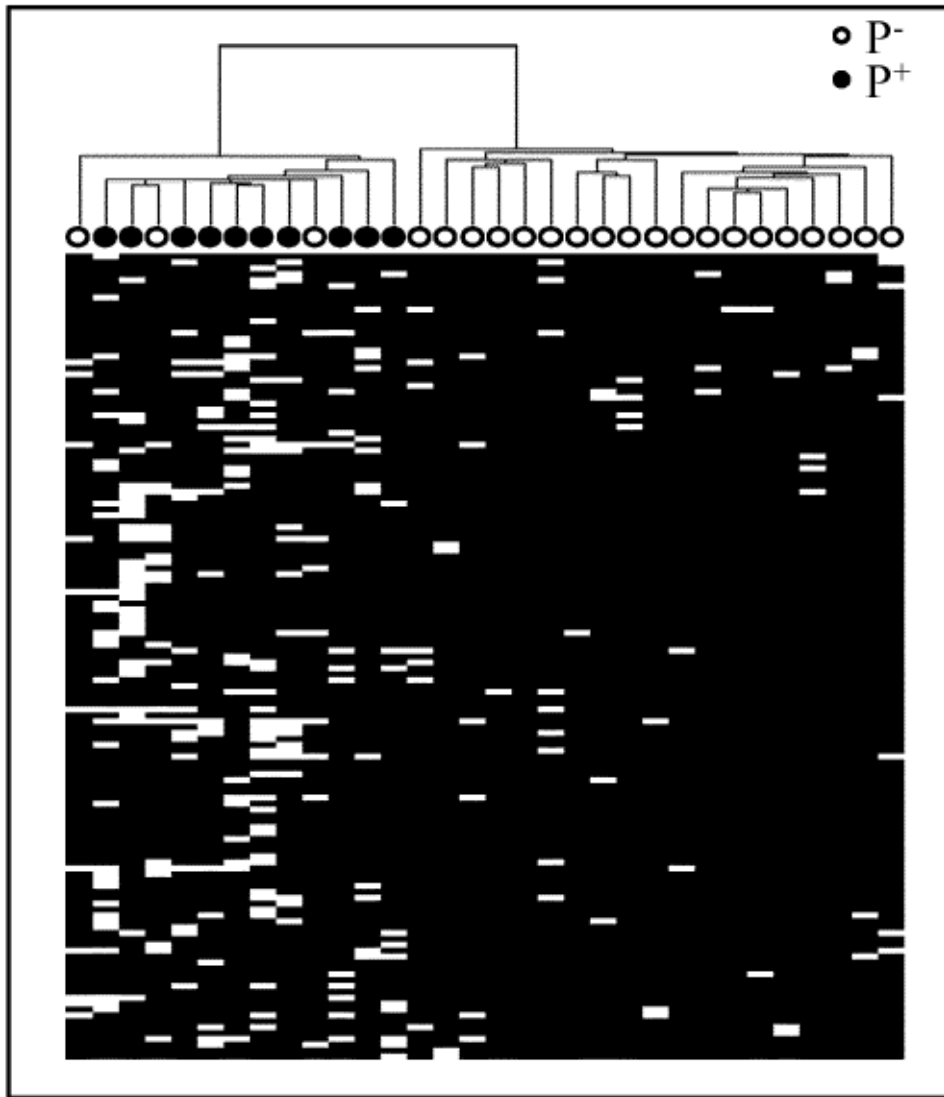


Figura 1

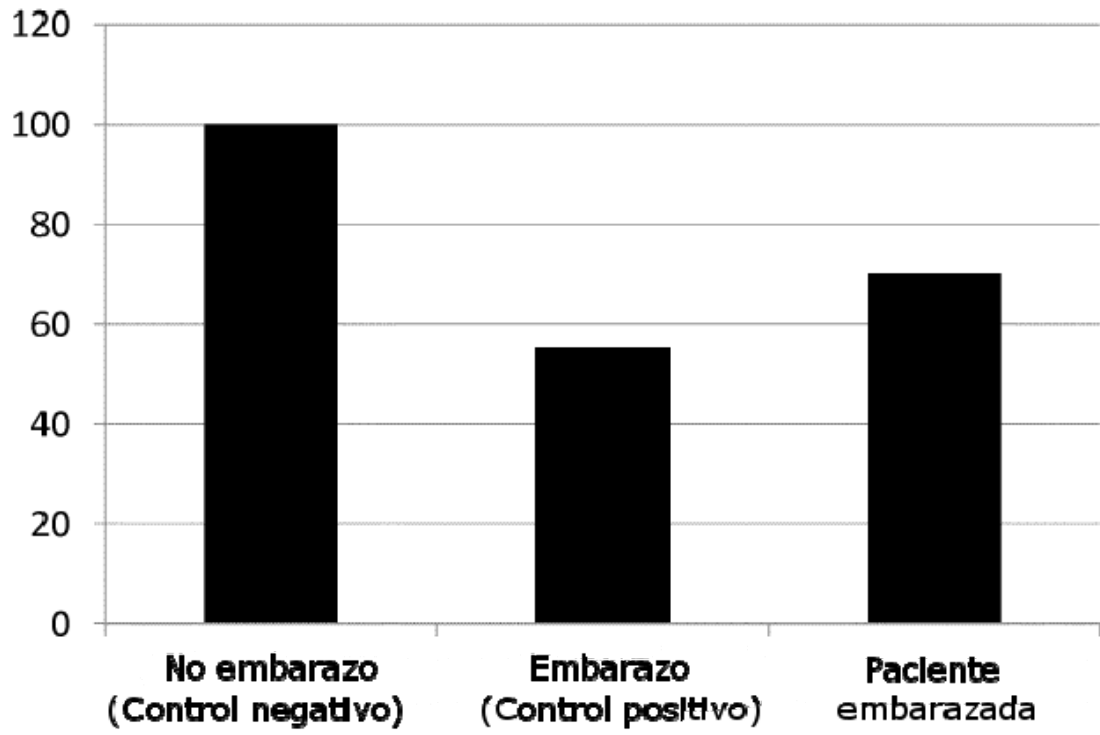


Figura 2

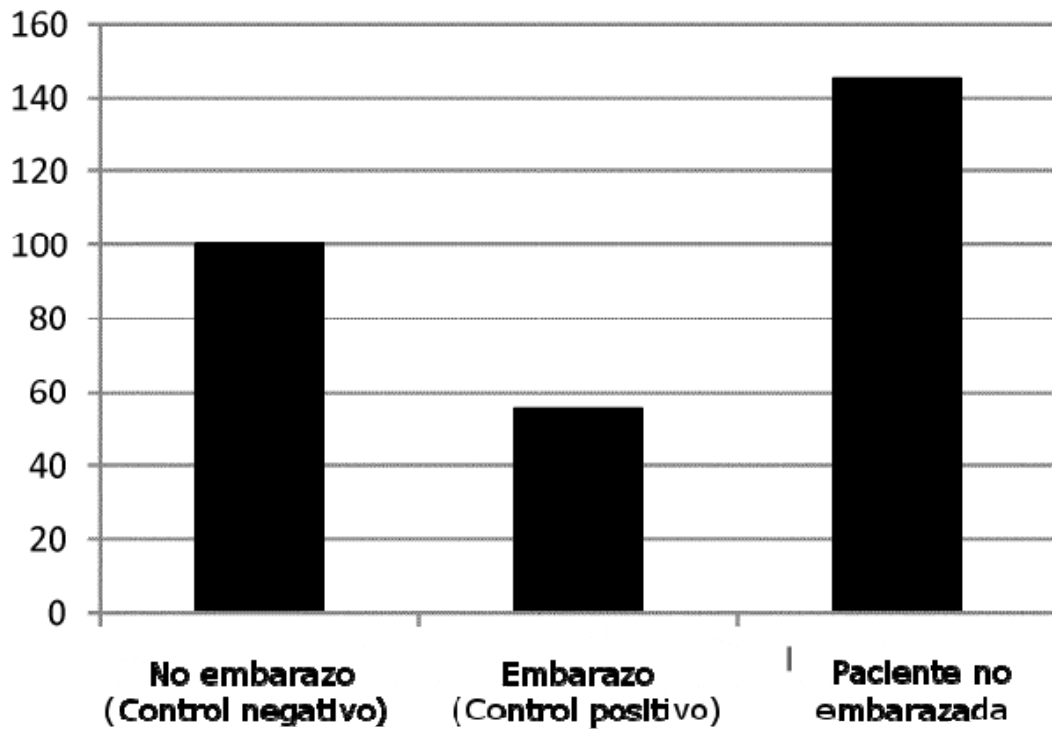


Figura 3