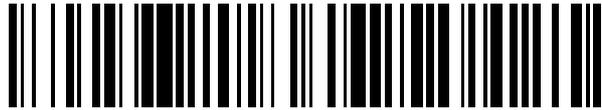


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 644**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2013 PCT/IB2013/060334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195771**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2013 E 13820948 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 3004874**

54 Título: **Procedimiento de detección de sustancias químicas en muestras de material que pueden recogerse de un sujeto, en particular, para detectar factores embriotóxicos**

30 Prioridad:

04.06.2013 IT MI20130916

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

07.05.2018

73 Titular/es:

**INNOVITAS VITAE S.R.L. (100.0%)
Viale Duca degli Abruzzi 163
25124 Brescia, IT**

72 Inventor/es:

**MANGANINI, MASSIMILIANO;
COLOGNATO, RENATO;
MARIOTTI, MASSIMO y
SCOZZESI, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 666 644 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

Procedimiento de detección de sustancias químicas en muestras de material que pueden recogerse de un sujeto, en particular, para detectar factores embriotóxicos

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar, en muestras de material que pueden recogerse de un sujeto (que puede ser, por ejemplo, una mujer en edad fértil), una o más sustancias químicas que pueden ejercer distintos efectos, tal como un efecto dañino en el crecimiento o mantenimiento de la viabilidad de un embrión.

10 Tal y como se sabe a partir de las estadísticas clínicas disponibles hoy en día, aproximadamente el 40 % de pacientes afectados por el fenómeno de aborto recurrente sin una causa determinada están caracterizados por la presencia de los denominados "factores embriotóxicos" (abreviado con el acrónimo FET) en su sangre: estos factores son un conjunto de moléculas correlacionado con un mecanismo biológico mediante el cual durante la fase de implante o durante las fases más tempranas del embarazo, el embrión es considerado de forma errónea como un objeto extraño en el cuerpo de la futura madre, lo que desarrolla una respuesta inmune específica con el objeto de eliminarlo.

15 También se conoce a partir de estudios recientes la correlación entre la presencia de FET en el cuerpo de la madre y una cantidad significativa de casos de infertilidad idiopática (o incluso casos de esterilidad atribuidos de forma errónea a la denominada endometriosis) y esto es indicativo del papel central de los FET como "marcadores" de diversas situaciones clínicas de riesgo.

20 En otras palabras, resulta fundamentalmente importante implementar sistemas para diagnosticar FET, con el fin de ser capaces de predecir dificultades en la implantación del embrión y/o la aparición de abortos o cualquier otro evento con anterioridad: a este respecto, la anterior técnica disponible hoy en día (aún considerada a una fase experimental) prevé el uso de embriones de ratón o cultivos celulares vivos.

25 Independientemente del tipo de medio de ensayo utilizable, los procedimientos conocidos usan una muestra de sangre de un paciente, del cual se extraen los glóbulos blancos y a continuación se cultivan en presencia de factores embriónicos que aseguren su activación (o, en otras palabras, simulen una respuesta inmune) y, posteriormente, el denominado "medio condicionado" (abreviado en la jerga de laboratorio como MC) obtenido a partir de la extracción/activación de glóbulos blancos sanguíneos, se pone en contacto con las sustancias orgánicas usadas para el análisis (por ejemplo, si se usan embriones de ratón, los últimos se observan durante tres días después de ser incubados con el MC).

30 Después de esta exposición, si los embriones mueren, se deduce que hay sustancias tóxicas presentes en el suero del paciente (estas recaen en general dentro de la definición de FET), mientras que sí, por el contrario, los embriones se desarrollan normalmente, la prueba es negativa.

35 Como alternativa, el MC se incuba con un cultivo celular de tipo JEG-3 y el nivel de mortalidad celular se evalúa después de tres días (este nivel se considera indicativo de la presencia de FET). El documento WO 94/28425 A1 desvela la detección de factor embriotóxico mediante, por ejemplo, ensayos de células de embrión de ratón. Los procedimientos para verificar la presencia de FET resumidos anteriormente tienen varias desventajas sustanciales, particularmente en términos de cortes de operativos, velocidad de ejecución del protocolo y, por lo tanto, la producción de resultados, poca "firmeza" estadística y flexibilidad operativa: en particular, la elección de un "material biológico" (embriones de ratón o células JEG-3) con el que hacer reaccionar el medio de cultivo implica complicaciones operativas, tanto desde un punto de vista económico y en términos de crecimiento/cultivo/desarrollo del material orgánico de prueba mismo.

45 Además, el uso de "modelos animales" en los conocidos procedimientos de ensayo puede llevar a un problema de tipo ético, dado que la creciente atención/aversión de los medios y opinión pública precisamente hacia el uso de modelos animales en procedimientos de ensayos clínicos: en el caso de ensayos para identificar FET (ensayos que tienen evidentes fines diagnósticos), una posible limitación/abolición "por ley" de modelos de animal en ese tipo de ensayo también podría conducir, de hecho, a un casi completa imposibilidad de llevarlos a cabo, también dado que dichos ensayos para identificar FET no pueden considerarse como ensayos realizados en condiciones de ensayo clínico (en los que el uso de modelos animales puede y debe continuar permitiéndose), puesto que son auténticas pruebas diagnósticas.

50 El objeto de la presente invención es, por lo tanto, concebir un procedimiento para detectar sustancias y, en particular, sustancias tóxicas, tal como, por ejemplo, unas ligadas a la definición de FET, que supere las desventajas de la técnica anterior.

55 En particular, es un objeto de la presente invención implementar un procedimiento que minimice los costes operativos, proporcione una gran cantidad de material para exponer a la posible presencia de FET y por lo tanto, haga que sea posible llevar a cabo una gran cantidad de ensayos (posiblemente también de un tipo recurrente o paralelo en muestras recogidas del mismo sujeto) con una excelente fiabilidad cualitativa y cuantitativa en términos de resultados.

Estos y otros objetos de la invención se consiguen con un procedimiento que se ilustra a continuación en el presente documento, en un ejemplo no limitante de una realización del mismo, así como en una o más de las reivindicaciones adjuntas.

5 El procedimiento comprende sustancialmente las etapas típicas de un procedimiento de ensayo de laboratorio, concretamente:

- preparar una muestra de una sustancia (que puede normalmente comprender fluidos orgánicos y/o partes de tejidos procedentes del cuerpo de un donante);
- asociar con la muestra de una sustancia un elemento de control adecuado para verificar la presencia de al menos un agente activo en la muestra de la sustancia; y
- 10 - verificar la presencia o ausencia del agente activo basándose en un cambio en el estado (físico, químico o biológico) en el elemento de control.

15 Ventajosamente, el presente procedimiento prevé que el elemento de control comprenda al menos un organismo vivo que tenga la capacidad de nutrirse a sí mismo de forma autónoma mediante órganos temporales asociados con el organismo vivo mismo y sea capaz de suministrar sustancias nutritivas a este último, es decir, sin tomarlas de un entorno externo.

20 La definición particular de esta propiedad del elemento de control de acuerdo con la presente invención hace que sea posible usar un organismo con un grado suficiente de desarrollo tisular y sistémico, de modo que a partir de un punto de vista regulatorio el material no se considera "animal", sino solo un "material biológico" y, por lo tanto, no entra dentro del área (el de experimentación) que queda regulado por legislación sobre ensayos con animales: esto se explicará mejor a continuación en la presente descripción.

Entrando en detalle, uno puede observar cómo el organismo vivo seleccionable según el presente procedimiento puede comprender al menos un pez que pertenece a la clase Actinopterygii y normalmente a la clase denominada *Danio rerio* (también conocida por el nombre común de "pez cebra"): incluso con más detalle, uno puede elegir un *Danio rerio* que pertenezca a la cepa genotípica del tipo "AB".

25 Como alternativa, el presente procedimiento puede implementarse mediante la elección de un pez de la especie *Oryzias latipes* (también conocido por el nombre común de "pez-arroz japonés" o por el nombre de "medaka") como el organismo vivo para realizar los ensayos y análisis.

O, como una alternativa a los modelos descritos anteriormente, la clase de anfibios que incluyen el género *Xenopus*.

30 De acuerdo con una característica particular de la presente invención, los organismos posible (tales como, por ejemplo, los dos peces y el anfibio presentados anteriormente) se usarán en su forma biológica en la que son capaces de nutrirse a sí mismos de forma autónoma por medio de un órgano temporal al cual se hace referencia en la jerga como "saco vitelino" (denominado de otro modo simplemente vitelo según la actual terminología científica inglesa) u órganos temporales similares que se han desarrollado íntegramente con el organismo vivo mismo: si se usa el pez de la especie *Danio rerio*, esto es posible hasta que el organismo vivo alcance un tiempo de vida inferior o igual a 120 horas de desarrollo después de la fertilización (a una temperatura estándar), mientras que en el caso en el cual se usa el pez de la especie *Oryzias latipes*, esto es posible hasta que el organismo alcanza un tiempo de vida inferior o igual a 288 horas de desarrollo después de la fertilización. En el caso de *Xenopus*, la etapa larval es acuática y el vitelo se conserva durante hasta aproximadamente 96 horas de desarrollo después de la fertilización. Después de esta etapa toma el alimento del exterior. El *Xenopus* es considerado por la UE como un modelo animal experimental oficial.

45 En este punto cabe destacar que cuando se supera este umbral de tiempo, el embrión de *Danio rerio* (o *Oryzias latipes* o *Xenopus*, dependiendo de los casos) usa todos los nutrientes presentes en su saco vitelino y se vuelve dependiente del entorno externo desde un punto de vista nutricional: a partir de este momento se le considera un animal desde un punto de vista regulatorio y queda, por consiguiente, sujeto a la legislación sobre experimentación animal (que supone un aumento considerable en costes operativos y en costes de ejecutar ensayos de laboratorio a gran escala).

Desde un punto de vista práctico, la etapa de asociación de un elemento de control con la muestra de una sustancia comprende las siguientes sub-etapas:

- 50 - en primer lugar, un número predeterminado de organismos vivos se expone a la muestra de la sustancia tomada (por ejemplo, uno puede considerar al menos 20 embriones de *Danio rerio* que tengan un tiempo de desarrollo de no más de 72 horas después de la fertilización);
- grupos iguales de embriones (de *Danio rerio* (o *Oryzias latipes* o *Xenopus*, por ejemplo, dos grupos de 10) se colocan en un medio de cultivo específico en recipientes de verificación adecuados, que pueden ser, por ejemplo, dos pocillos adyacentes de una placa de cultivo (que puede a su vez comprender 24 pocillos); y
- 55 - muestra de la sustancia, que puede ser normalmente un suero de sangre tomado de un sujeto donante, se añade al medio de cultivo recién mencionado en una concentración adecuada.

En cuanto a la ejecución de la etapa de verificación de la presencia/ausencia del agente activo, cabe destacar que esto puede diseñarse de forma conveniente para verificar la ausencia/presencia de los denominados "factores embriotóxicos (FET)" y comprender las siguientes sub-etapas:

- 5 - se mantiene una interacción ambiental, normalmente en los pocillos de la placa de cultivo, entre los embriones y la muestra de la sustancia durante un periodo de interacción definido como doce horas (o en cualquier caso múltiples de doce horas, hasta un máximo de 48 horas);
- un número de embriones fallecidos se recuenta después de que las recién mencionadas doce horas y/o anteriormente definidos múltiples de doce horas hayan transcurrido; y
- 10 - se atribuye un nivel de toxicidad, que es proporcional y cuantitativamente correlacionado con un nivel de actividad química de los factores embriotóxicos (FET) presentes en la muestra de la sustancia.

De acuerdo con el presente procedimiento, puede definirse una clasificación de la muestra de una sustancia según la siguiente parametrización:

- el nivel de toxicidad de la muestra de una sustancia se define como "tóxico" cuando el número de embriones muertos supera el 50 % del número total de embriones colocados en los recipientes de verificación;
- 15 - el nivel de toxicidad de la muestra de una sustancia se define como "moderadamente tóxico" cuando el número de embriones muertos varía entre el 50 % y el 30 % del número total de embriones colocados en los recipientes de verificación; o "no tóxico" cuando el número de embriones muertos es inferior o igual al 20 % del número total de embriones colocados en los recipientes de verificación.

20 Después un puesto de vista de las posibilidades operativas disponibles después de la etapa de ensayo y determinación cualitativa/cuantitativa del nivel de toxicidad, es posible actuar en el sujeto donante basándose en el resultado de la etapa de verificación de la presencia/ausencia de factores embriotóxicos (FET): convenientemente, las posibles acciones en el sujeto donante pueden consistir en la exposición del sujeto donante a agentes supresores del sistema inmune, por ejemplo, por medio de:

- infusiones de inmunoglobulinas y/o supresores de la producción de citocinas (normalmente por vía intravenosa);
- 25 - aplicaciones tópicas de progesterona y/o aceite de progesterona en el sujeto donante o sobre un medio de cultivo adecuado para hospedar procedimientos de fertilización artificial con el sujeto donante; y/o
- administración de vitamina o no vitamina o compuestos nutracéuticos o principios activos naturales y/o fitoterapeúticos así como otros suplementos alimenticios.

30 La invención consigue diversas ventajas, sobretodo en términos de optimización de la relación entre costes operativos y calidad de los resultados obtenidos mediante los ensayos.

En particular, la posibilidad de desarrollar grandes cantidades de "material biológico", considerado tal según la invención, hace que sea posible tener, en tiempos más cortos y con espacios de cultivo económicamente reducidos, un "ensayo de campo" fabricado con una cantidad muy grande de especímenes que pueden actuar como "material biológico" y asegurar, por consiguiente, unos tiempos de ejecución más rápidos (así como una mayor fiabilidad de los ensayos toxicológicos).

40 Además, el uso del denominado "material biológico" según con la definición formal aplicada hoy en día en prácticas de laboratorio biológicas (en lugar del uso de embriones como se ha clasificado legalmente según la legislación vigente) permite a uno evitar ser sometido a las complejas y restrictivas normas de la experimentación animal, haciendo que el procedimiento completo será más rápido y más eficaz y aumentando tanto la productividad del laboratorio como la posibilidad de llevar a cabo una mayor cantidad de ensayos.

El procedimiento según la presente invención se lleva a cabo, de este modo, en embriones de pez cebrá que se han desarrollado durante no más de 120 horas después de su fertilización (o, como alternativa, embriones de medaka que se han desarrollado durante no más de 288 horas después de su fertilización o embriones de *Xenopus* que no se han desarrollado durante más de 96 horas después de su fertilización) y que dentro de este límite de tiempo no se pueden clasificar como "animal" según la legislación vigente: al mismo tiempo, al usar organismos que pertenecen a la clase *Danio rerio* (o especie similares, tal como las descritas anteriormente) es posible de forma conveniente exponer los órganos/sistemas vivos que experimentan la formación a la posible presencia de FET, obteniendo, de este modo, solo una retroalimentación completa mediante una respuesta precisa y realista (que se obtiene normalmente mediante un modelo "in vivo").

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento in vitro para detectar factores embriotóxicos en muestras de material recogido de un sujeto humano o un animal, que comprende las etapas siguientes:
- 5 - preparar una muestra de una sustancia, comprendiendo dicha muestra de una sustancia preferentemente fluidos orgánicos y/o partes de tejidos que proceden de un organismo donante; y
 - asociar con dicha muestra de una sustancia un elemento de control adecuado para verificar la presencia de al menos un agente activo en dicha muestra de una sustancia; y
 - verificar la presencia o ausencia de dicho agente activo basándose en un cambio en el estado en dicho elemento de control,
- 10 comprendiendo dicho elemento de control al menos un organismo vivo que tenga la capacidad de nutrirse a sí mismo de forma autónoma mediante órganos temporales asociados con el propio organismo vivo y sea capaz de suministrar sustancias nutritivas a este último sin tomar dichas sustancias nutritivas de un entorno externo, **caracterizado porque** dicha etapa de verificación de la presencia o ausencia de dicho agente activo está diseñada para verificar la ausencia o presencia de factores embriotóxicos (FET) y comprende las siguientes sub-etapas:
- 15 - mantener una interacción ambiental, preferentemente en recipientes de verificación de una placa de cultivo, entre los embriones y la muestra de una sustancia durante un periodo definido de interacción que varía de doce horas o, preferentemente, múltiples de doce horas, hasta un máximo de 48 horas;
 - contar un número de embriones fallecidos después de que dicho periodo de interacción haya transcurrido; y
 - 20 - atribuir a la muestra de una sustancia un nivel de toxicidad que sea proporcional y cuantitativamente correlacionado con una presente cuantitativa o un nivel de actividad química de dichos factores embriotóxicos (FET).
2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho organismo vivo comprende al menos un pez que pertenece a la clase de *Actinopterygii* y el género *Xenopus* de la clase de anfibios.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho pez es de la especie *Danio rerio* o "pez cebra" y es preferentemente un *Danio rerio* que pertenece a la cepa del genotipo "AB", dicho pez tiene incluso más preferentemente un tiempo de vida inferior o igual a 120 horas de desarrollo y/o multiplicación celular después de la fertilización.
4. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho pez es de la especie *Oryzias Latipes* o "medaka", dicho pez tiene preferentemente tiempo de vida inferior o igual a 288 horas de desarrollo y/o multiplicación celular después de la fertilización.
5. El procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho anfibio es del género *Xenopus*, dicho anfibio tiene preferentemente tiempo de vida inferior o igual a 96 horas de desarrollo y/o multiplicación celular después de la fertilización.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho organismo vivo es capaz de alimentarse a sí mismo de forma autónoma a través de un órgano temporal tipo del "saco vitelino" o similar, habiéndose desarrollado dicho órgano temporal íntegramente con el organismo vivo.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha etapa de asociación de un elemento de control con dicha muestra de una sustancia comprende las siguientes sub-etapas:
- 40 - exponer un número predeterminado de organismos vivos a dicha muestra, siendo dicho número predeterminado de organismos vivos preferentemente al menos 20 embriones de *Danio rerio* que tienen un tiempo de desarrollo y/o de multiplicación celular no superior a 72 horas después de su fertilización;
 - colocar grupos iguales de dichos embriones de *Danio rerio*, preferentemente en un número igual a 10, en recipientes de verificación respectivos;
 - 45 - añadir la muestra de una sustancia a dichos recipientes de verificación, comprendiendo dicha muestra de una sustancia suero sanguíneo y/o plasma tomado de un sujeto donante.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en los que dichos recipientes de verificación comprenden al menos dos pocillos adyacentes de una placa de cultivo, comprendiendo dicha placa de cultivo preferentemente un total de 24 pocillos.
9. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho nivel de toxicidad se define como "tóxico" cuando el número de embriones muertos supera el 50 % del número total de embriones colocados en dichos recipientes de verificación de la placa de cultivo, definiéndose de forma alternativa dicho nivel de toxicidad como "moderadamente tóxico" cuando el número de embriones muertos varía entre el 50 % y el 30 % del número total de embriones colocados en dichos recipientes de verificación de la placa de cultivo y definiéndose de forma alternativa dicho nivel de toxicidad como "no tóxico" cuando el número de embriones muertos es inferior o igual al 20 % del número total de embriones colocados en dichos recipientes de verificación de la placa de cultivo.