

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 298**

51 Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)

A61P 15/16 (2006.01)

A61P 15/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2010 PCT/EP2010/053815**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010 WO10108942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2010 E 10709849 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2411041**

54 Título: **Compuestos para la modulación de la fertilización y procedimiento para su implementación**

30 Prioridad:

24.03.2009 EP 09305261

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

19.09.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER (33.3%)
621 Avenue Centrale Domaine Universitaire B.P.
53
38041 Grenoble Cedex 09, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ARNOULT, CHRISTOPHE;
DE WAARD, MICHEL y
LAMBEAU, GÉRARD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 682 298 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

Compuestos para la modulación de la fertilización y procedimiento para su implementación

Esta invención se refiere a compuestos para la modulación de la fertilización y a un procedimiento para su implementación.

5 Las fosfolipasas A2 secretadas (sPLA2) se describieron por primera vez en los venenos animales. En los venenos de serpiente, las sPLA2 suelen ser el compuesto más importante en peso y un veneno de serpiente puede contener hasta 15 sPLA2 diferentes. Estas enzimas desempeñan un papel crucial en la toxicidad del veneno y son responsables de una amplia gama de efectos tóxicos como efectos neurotóxicos, cardiotoxicos o citotóxicos. Ninguna de las sPLA2 presentes en un veneno muestra las mismas propiedades enzimáticas y cada sPLA2
10 presenta un patrón específico de toxicidad. Por homología de secuencia, muchas sPLA2 se han clonado en Mamíferos (Valentin y Lambeau, 2000; What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of Mammalian secreted phospholipases A(2)? *Biochimie*. 82:815-831). La fosfolipasa A2 (PLA2) es ahora una gran familia de enzimas y se ha dividido en cuatro grupos, dependiendo de la sensibilidad al calcio y la localización celular: la PLA2 secretada (sPLA2), la PLA2 celular (cPLA2), ambas dependientes de calcio y dos grupos independientes del calcio (iPLA2 y PAF acetilhidrolasa).

Al centrarse en las PLA2 secretadas, hasta ahora se han descrito diez genes diferentes en el ratón, correspondientes a los grupos de IB-, IIA-, IIC-, IID-, IIE-, IIF-, III-, V-, X- y XIIA-sPLA2. A modo de comparación, las sPLA2 de veneno pertenecen al grupo I (serpientes elápidos e hidrófidos) o al grupo II (serpientes víperidos y crotálicos). En cuanto a la actividad enzimática, la familia sPLA2 se caracteriza por su capacidad de hidrolizar el éster *sn*-2 de glicerofosfolípidos de la cara extracelular de la membrana plasmática en dos componentes, un ácido graso (FA) y un lisofosfolípido (LysoPL). Ambos compuestos tienen la capacidad de abandonar la membrana plasmática. Debido a que los FA se equilibran rápidamente entre ambas caras de la bicapa de la membrana, se difunden al citoplasma y controlan diferentes rutas de señalización celular como segundos mensajeros. Por el contrario, los LysoPL se acumulan en la cara externa.

25 Sin embargo, el lisofosfolípido contiene un grupo de cabeza polar glicerofosfato y un grupo ácido graso más lipófilo (en la posición 1 en el glicerol). Dependiendo de la naturaleza del ácido graso, el lisofosfolípido se repartirá entre la membrana plasmática y la fase acuosa y puede actuar como un metabolito bioactivo en diferentes vías extracelulares en un modo autocrino o paracrino.

Los estudios han demostrado que las enzimas sPLA2 de Mamíferos se expresan ampliamente en numerosos tejidos y órganos, pero sus funciones celulares en la fisiología celular siguen siendo en gran parte desconocidas (Lambeau y Gelb, 2008, *Biochemistry and physiology of Mammalian secreted phospholipases A2. Annu. Rev. Biochem.* 77: 495-520. What can venom phospholipases A(2) tell us about the functional diversity of Mammalian secreted phospholipases A(2)? *Biochimie*. 82:815-831).

35 En los órganos reproductivos masculinos, se ha descrito una amplia gama de diferentes tipos de sPLA2. Los espermatozoides maduros, el epidídimo, el conducto deferente y la vesícula seminal expresan IIC-, IID-, IIE-, IIF-, V- y X-sPLA2; la próstata expresa IIC-, IID-, IIE- y IIF-sPLA2 (Masuda, Murakami, Matsumoto, Eguchi, Urade, Lambeau, Gelb, Ishikawa, Ishii y Kudo, 2004, *Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. Biochim. Biophys. Acta.* 1686:61-76). Las razones de tal diversidad de expresión de las sPLA2 en los diferentes compartimentos de los órganos genitales masculinos y sus funciones celulares específicas son desconocidas hasta ahora.

La presencia de sPLA2 en el epidídimo, la vesícula seminal y la próstata puede explicar la presencia de actividad de PLA2 en el plasma seminal de los espermatozoides eyaculados (Kallajoki, Alanen, Nevalainen y Nevalainen, 1998, *Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumours. Prostate.* 35:263-272). Actualmente, las funciones de sPLA2 en el plasma seminal no se conocen bien: estas enzimas pueden participar en la defensa del anfitrión de los tractos masculinos debido a una fuerte actividad antibacteriana de algunas sPLA2. Sin embargo, las PLA2 secretadas liberadas por los diferentes tipos de células de los órganos reproductivos masculinos también pueden controlar diferentes eventos clave de la fisiología de los espermatozoides en el tracto femenino, como la capacitación, la motilidad espermática o la reacción acrosómica (RA).

Finalmente, la presencia de fuertes inhibidores de la actividad enzimática de sPLA2 en el mismo plasma seminal (Manjunath, Soubeyrand, Chandonnet y Roberts, 1994; *Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. Biochem. J.* 303:121-128; Upreti, Hall, Koppens, Oliver, and Vishwanath, 1999, *Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. Anim. Reprod. Sci.* 56:107-121) descifra un poco más la presencia de estas enzimas y sus funciones fisiológicas en el plasma seminal.

55 En la célula espermática, el metabolismo de los lípidos es fundamental para la fisiología del espermatozoide. Las modificaciones de fosfolípidos por fosfolipasas (PL) pertenecientes a diferentes familias están involucradas en diferentes etapas cruciales de la fisiología del espermatozoide (revisado por (Roldan y Shi, 2007, *Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. Front Biosci.* 12:89-104). Por ejemplo, la composición de la membrana plasmática lipídica juega papeles críticos en la fisiología de los espermatozoides. La composición lipídica cambia

durante la capacitación de los espermatozoides y el evento principal que caracteriza esta evolución es un flujo de salida de colesterol activado por la afluencia de calcio y bicarbonato (Visconti, Ning, Fornes, Álvarez, Stein, Connors y Kopf, 1999, Cholesterol efflux-mediated signal transduction in Mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev. Biol.* 214:429-443). La disminución de la concentración de colesterol en la membrana plasmática es, por lo tanto, una etapa de cebado necesaria para la reacción acrosómica. La RA también está controlada por el metabolismo de los fosfolípidos: por ejemplo, la fosfolipasa C (PLC) desempeña un papel crucial en la señalización de calcio de este evento excitotico (O'Toole, Arnout, Darszon, Steinhardt y Florman, 2000, Ca(2+) entry through store-operated channels in mouse sperm is initiated by egg ZP3 and drives the acrosome reaction. *Mol. Biol. Cell* 11:1571-1584). Con respecto a sPLA2, el grupo IIE, V y X se han localizado de manera interesante en la zona acrosómica de las espermátidas (Masuda, Murakami, Matsumoto, Eguchi, Urade, Lambeau, Gelb, Ishikawa, Ishii y Kudo, 2004, Localization of various secretory phospholipase A2 enzymes in male reproductive organs. *Biochim. Biophys. Acta.* 1686:61-76).

Aunque no hay datos que relacionen sPLA2 y RA, varias observaciones sugieren fuertemente que una PLA2 no caracterizada y endógena juega un papel importante en el evento excitotico.

De hecho, hay varias pruebas indirectas para la participación de sPLA2 durante este evento excitotico. Por ejemplo, los inhibidores de PLA2, como la mepacrina o el bromuro de 4-bromofenacilo (BPB) bloquean la reacción acrosómica inducida por ionóforo de calcio (Roldan y Fragio, 1993, Phospholipase A2 activation and subsequent exocytosis in the Ca²⁺/ionophore-induced acrosome reaction of ram spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 268:13962-13970; Llanos, Morales, and Riffo, 1993, Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J. Exp. Zool.* 267:209-216).

Además, los dos productos de la actividad enzimática de sPLA2 (lisofosfolípidos y/o ácidos grasos) aceleran o promueven la exocitosis (Fleming y Yanagimachi, 1984, Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 229:485-489; Llanos, Morales, and Riffo, 1993, Studies of lysophospholipids related to the hamster sperm acrosome reaction in vitro. *J. Exp. Zool.* 267:209-216).

Finalmente, la reacción acrosómica inducida por la zona pelúcida conduce a una liberación concomitante de metabolitos lipídicos, un indicio de activación de PLA2 (Yuan, Chen, Shi, Mao, Yu, Fang y Roldan, 2003, Zona pellucida induces activation of phospholipase A2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *Biol. Reprod.* 68:904-913). En este contexto, ¿qué roles desempeñan las diferentes sPLA2 presentes en el entorno del espermatozoide, incluso posiblemente localizadas dentro de la célula espermática en el acrosoma? Esta pregunta todavía es un tema de debate y solo se propusieron hipótesis. Por ejemplo, la PLA2 de los espermatozoides puede actuar de forma paracrina o exocrina para controlar la fisiología de los espermatozoides.

Para comprender mejor los roles específicos de todas estas enzimas, se han producido diferentes genes nulos modificados genéticamente para los genes de sPLA2 del grupo V de ratón (mGV) y del grupo X de ratón (mGX) (Henderson, Jr., Chi, Bollinger, Tien, Ye, Castelli, Rubtsov, Singer, Chiang, Nevalainen, Rudensky y Gelb, 2007, Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J. Exp. Med.* 204:865-877; Satake, Diaz, Balestrieri, Lam, Kanaoka, Grusby, and Arm, 2004, Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J. Biol. Chem.* 279:16488-16494). Además, en los ratones de la cepa C57BL/6, la mGIIA-sPLA2 se rompe naturalmente (Kennedy, Payette, Mudgett, Vadas, Pruzanski, Kwan, Tang, Rancourt, y Cromlish, 1995, A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J. Biol. Chem.* 270:22378-22385). Hasta ahora no se han descrito defectos reproductivos masculinos importantes en todas estas cepas y, por lo tanto, estas cepas de ratones transgénicos no proporcionaron indicaciones o información sobre las funciones específicas de estas tres enzimas en la fisiología de los espermatozoides, que aún deben analizarse mediante experimentos más especializados. La presencia de diferentes sPLA2, posiblemente actuando como enzimas redundantes, puede explicar la falta de fenotipos.

Además de su capacidad para hidrolizar fosfolípidos, las sPLA2 también son ligandos para diferentes tipos de receptores de membrana. Hasta ahora, se han caracterizado dos receptores diferentes utilizando sPLA2 de veneno de serpiente como ligandos: el receptor M en los músculos esqueléticos y el receptor N en las neuronas. La afinidad de sPLA2 por estos receptores es notablemente alta, y algunas sPLA2 de serpiente se unen a estos dos receptores con afinidades inferiores a 10 pM. Algunas sPLA2 de Mamíferos se unen también con una afinidad muy alta a estos receptores. Sin embargo, la relevancia fisiológica de tal unión todavía no se entiende en el contexto de la fisiología celular. Curiosamente, el receptor de tipo M pertenece a la superfamilia de lectina de tipo C, proteínas de unión a azúcar. Se sabe que las lectinas desempeñan un papel peculiar en la fisiología de los espermatozoides dado que la reacción acrosómica espermático depende del radical carbohidrato específico de la especie de ZP3, una glicoproteína conocida por ser fundamental en el evento de unión espermatozoide-oocito.

La fertilización es una etapa esencial para la reproducción y debe mejorarse en algunos casos.

La promoción o mejora de la fertilización se utiliza, por ejemplo, para la reproducción de variedades animales, en particular durante la tecnología de reproducción asistida (TRA) para mejorar las variedades de bovino, ovino o

caprino.

El tratamiento de la esterilidad de los Mamíferos, en particular la esterilidad humana, se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro* y en particular durante la tecnología de reproducción asistida (TRA).

5 La tecnología de reproducción asistida en Mamíferos se basa en particular en la mezcla de espermatozoos y oocitos que conducen por fusión a embriones. Los embriones se transfieren a continuación al tracto femenino. La tasa de éxito es de 50% de los embriones obtenidos en comparación con el número de oocitos cosechados (datos obtenidos para la FIV en seres humanos, Francia 2005). Después de la transferencia de los embriones al útero, la tasa de éxito disminuye mucho y solo uno de cada diez embriones transferidos conducirá al nacimiento.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar la tasa de fertilización final, promoviendo el rendimiento de embriones viables.

Además, la modulación de la fertilización y, en particular, la tecnología de reproducción asistida están asociadas con un mayor riesgo de defectos de nacimiento.

15 Uno de los objetivos de la invención es proporcionar compuestos y derivados de los mismos y su uso para el tratamiento de la esterilidad o para promover o mejorar la fertilización, en particular durante la tecnología de reproducción asistida que permita obtener una maduración de espermatozoides mejorada y una tasa de fertilización mejorada y promover la embriogénesis, en particular la embriogénesis viable y sin presentar anomalías genéticas.

Otro objetivo de la invención es proporcionar compuestos y derivados de los mismos y su uso para la prevención de la fertilización.

20 Otro objetivo más es proporcionar composiciones farmacéuticas para la promoción y/o la mejora de la fertilización o la prevención de la fertilización.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para el tratamiento de la esterilidad o para promover o mejorar la fertilización.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento de selección de espermatozoos.

Otro objetivo más de la invención es proporcionar un procedimiento para diagnosticar la infertilidad en un Mamífero.

25 Otro objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento anticonceptivo.

La presente solicitud también describe el uso de fosfolipasa A2 secretada (sPLA2) y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ susceptible de modular la fertilización, para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de una embriogénesis viable que promueva o mejore el fármaco, o de un fármaco anticonceptivo.

30 La presente invención se refiere al uso de fosfolipasa A2 secretada (sPLA2) y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ susceptibles de modular la fertilización, para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de un fármaco que promueva o mejore la embriogénesis viable, o de un fármaco anticonceptivo, en donde dicho al menos un metabolito se selecciona del lista que consiste en ácido araquidónico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido α -linolénico, 35 ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidato.

40 La presente invención se debe a la puntualización de una función inesperada de la propia sPLA2 o de sus metabolitos que permite elegir como diana espermatozoos ineficaces (con respecto a la fertilización) y posiblemente descartarlos, sin impacto negativo sobre los espermatozoos eficaces, estando implicada dicha función de la propia sPLA2 o de sus metabolitos en la reacción acrosómica (RA) de los espermatozoides, incluso en ausencia de oocitos, y antes de que se produzca la RA normal.

El tratamiento con la propia sPLA2 o con sus metabolitos desencadena de este modo una RA temprana en ausencia de oocitos, es decir, una RA dirigida, sobre una población concreta de espermatozoides, en particular sobre espermatozoides ineficaces, lo que permite seleccionar espermatozoides eficaces de espermatozoides ineficaces.

45 La RA es la reacción que ocurre en el acrosoma de los espermatozoides ya que se une a la capa de recubrimiento del óvulo que es la zona pelúcida del óvulo. La RA es un evento exocitótico que permite la liberación de las enzimas necesarias para destruir localmente las proteínas de la zona pelúcida.

Por el término "metabolito", debe entenderse el producto formado por la hidrólisis del éster sn-2 de glicerofosfolípidos con sPLA₂.

50 Los metabolitos producidos por la hidrólisis del éster sn-2 de glicerofosfolípidos pueden ser ácido araquidónico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido α -linolénico, ácido

eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol o lisofosfatidato.

El término "modular" significa ajustar o adaptar a una cierta proporción; o regular o estimular.

- 5 De acuerdo con la Cambridge Advanced Learner's Dictionary, (3ª Edición, Cambridge University Press), el término "fertilizar" significa: "hacer que un óvulo o semilla comience a desarrollarse en un nuevo animal o planta joven al unirlo con una célula masculina"

- 10 Por lo tanto, el término "fertilización" en esta memoria descriptiva significa el procedimiento por el cual las células óvulo de un Mamífero se unen con espermatozoides, es decir, de la recolección de espermatozoides con oocitos en un mismo medio para la recuperación de embriones multicelulares antes de la implantación, que comprende la fusión de un óvulo con un espermatozoide, y la obtención de un embrión en la fase de "dos células".

Por lo tanto, la expresión "modular la fertilización" significa que la fertilización en un Mamífero puede aumentarse:

- en comparación con la de un Mamífero sano, o
- en comparación con el propio nivel de fertilización de dicho Mamífero, es decir, se ha aumentado la tasa de rendimiento del Mamífero.

- 15 El aumento de la fertilización se puede demostrar con una prueba de FIV tal como la utilizada en el ejemplo 7 (L. Fraser, (1993) In vitro capacitation and fertilization pág. 239-263 in Methods in Enzymology, vol 225).

En el resto de esta memoria descriptiva, los términos espermatozoo o espermatozoos, espermatozoide o espermatozoides y espermatozoide o espermatozoides se utilizarán de forma independiente y tendrán el mismo significado.

- 20 La esterilidad en un ser humano y, por lo tanto, en un Mamífero, y en particular en una mujer (también denominada infertilidad) a menudo se define como la imposibilidad de quedar embarazada después de intentarlo durante un año. Por lo tanto, una de las ventajas de la invención es proporcionar un fármaco que trata la esterilidad y de este modo ayuda a un Mamífero a quedar embarazado. En este caso, la modulación de la fertilización es un aumento de la fertilización.

- 25 Por "fármaco promotor de la fertilización", debe entenderse un fármaco que permita la fertilización en casos en los que sería imposible. Por lo tanto, otra ventaja de la invención es proporcionar un fármaco capaz de obtener embriones viables, es decir, obtener un nivel de fertilización de un Mamífero, en particular un humano cercano al de un Mamífero sano.

En este caso, la modulación de la fertilización es también un aumento de la fertilización.

- 30 Por "fármaco que mejora la fertilización", debe entenderse un fármaco capaz de mejorar, potenciar, aumentar o reforzar la fertilización. Por lo tanto, otra ventaja de la invención es proporcionar un fármaco capaz de obtener un nivel de fertilización de un Mamífero superior al de un Mamífero sano.

En este caso, la modulación de la fertilización es también un aumento de la fertilización.

- 35 Por "fármaco promotor de la embriogénesis viable" debe entenderse un fármaco capaz no solo de promover la fertilización sino también de conducir a un embrión viable, al menos constituido por dos células.

Por "fármaco que mejora la embriogénesis viable" debe entenderse un fármaco capaz no solo de mejorar la fertilización sino también de conducir a uno o más embriones viables, al menos constituidos por dos células, y que permite obtener ventajosamente un nuevo Mamífero nacido sano capaz de desarrollarse a Mamífero saludable.

- 40 Un embrión viable se define por un embrión que tiene un desarrollo normal hasta la fase de blastocito antes de la implantación y hasta la fase de recién nacido después de la implantación (Method in enzymology, vol 255).

Debe especificarse que la modulación de la fertilización tiene que ver:

con una población humana en donde se aumenta la tasa de fertilización,

un individuo humano en donde se hace posible la fertilización

- 45 o un animal en donde se requiere un aumento de la reproducción para aumentar, por ejemplo, pero sin limitarse a, el número de animales, la proporción de carne, la calidad de la carne, la producción de leche....

La expresión "modulación de la fertilización" también significa también que la fertilización en un Mamífero se puede reducir o incluso inhibir.

Por "fármaco anticonceptivo" se debe entender un fármaco capaz de disminuir, rebajar, reducir o incluso evitar o

detener la fertilización con el fin de conducir a un fármaco para el control de la natalidad.

Para modular la fertilización, se debe tener en cuenta que la sPLA₂ utilizada debe ser activa, es decir, capaz de hidrolizar el éster sn-2 de glicerofosfolípidos de la cara extracelular de la membrana plasmática (Singer et al. (2002) Interfacial Kinetic and Binding Properties of the Complete Set of Human and Mouse Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A₂, Journal of Biological Chemistry, 277, 48535-48549).

5 En una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de fosfolipasa A₂ secretada (sPLA₂) y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ como se definió anteriormente, susceptible de aumentar dicha fertilización para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de un fármaco que promueva o mejore una embriogénesis viable.

10 Por lo tanto, en esta realización, la modulación de la fertilización es un aumento de la fertilización.

15 En una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de fosfolipasa A₂ secretada (sPLA₂) y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ como se definió anteriormente, para un Mamífero hembra sometido a fertilización *in vitro* (FIV), procedimiento de transferencia intrafalopiana de gametos (TIFG), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE) o inseminación terapéutica de donantes (ITD), durante las tecnologías de reproducción asistida (TRA).

Las tecnologías de reproducción asistida (TRA) incluyen todos los tratamientos de fertilidad en los que se manipulan tanto los óvulos como los espermatozoides. En general, los procedimientos de TRA implican la extirpación quirúrgica de óvulos de los ovarios o del tracto femenino de un Mamífero, combinándolos con los espermatozoides en el laboratorio y transfiriéndolos al cuerpo del Mamífero o donándolos a otro Mamífero.

20 Los ejemplos de TRA comprenden:

- fertilización *in vitro* (FIV) que consiste en la fertilización de un óvulo de un Mamífero por esperma fuera del útero, permitiendo que los espermatozoides fertilicen el óvulo en un medio fluido y transfiriendo el óvulo fertilizado al tracto femenino del Mamífero.

25 - procedimiento de transferencia intrafalopiana de gametos (TIFG), en donde se coloca una mezcla de espermatozoides y óvulos directamente en las trompas de Falopio de un Mamífero mediante laparoscopia después de la extracción de un óvulo transvaginal.

- inyección intracitoplásmica de espermatozoides (IICE), en donde se inyecta cuidadosamente un solo espermatozoide en el centro de un óvulo utilizando una microaguja,

30 - inseminación terapéutica de donantes (ITD), en donde se lleva a cabo la inseminación artificial utilizando espermatozoides de donante o, más comúnmente, inseminación de donante.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de fosfolipasa A₂ secretada (sPLA₂) y al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ susceptible de modular la fertilización, para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de un fármaco que promueva o mejore una embriogénesis viable, o de un fármaco anticonceptivo.

35 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de fosfolipasa A₂ secretada (sPLA₂) susceptible de modular la fertilización, para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de un fármaco que promueva o mejore una embriogénesis viable, o de un fármaco anticonceptivo.

40 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ susceptible de modular la fertilización, para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de un fármaco que promueva o mejore una embriogénesis viable, o de un fármaco anticonceptivo.

45 En una realización ventajosa, la sPLA₂ utilizada anteriormente presenta la propiedad de hidrolizar el éster sn-2 de uno o más glicerofosfolípidos con una actividad específica comprendida entre aproximadamente 1 µmol/min/mg y aproximadamente 50 µmoles/min/mg, en particular entre aproximadamente 1 µmol/min/mg y aproximadamente 25 µmoles/min/mg en glicerofosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos.

La "actividad específica" de una enzima es la cantidad de producto formado por la reacción de un sustrato con una enzima en un período de tiempo bajo condiciones dadas por miligramo de enzima, y por lo tanto una medida de la actividad enzimática.

50 La sPLA₂ tiene varios glicerofosfolípidos como sustratos y la actividad específica de sPLA hacia los glicerofosfolípidos se puede determinar como en Singer et al. (Interfacial Kinetic and Binding Properties of the Complete Set of Human and Mouse Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A₂, Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, Núm. 50, Edición del 13 de diciembre, pág. 48535-48549, 2002).

Como ya se discutió anteriormente, en las células espermáticas, el metabolismo de los lípidos es fundamental para la fisiología de los espermatozoides. La modificación de fosfolípidos por las fosfolipasas (PL) pertenecientes a diferentes familias está involucrada en diferentes etapas cruciales de la fisiología de los espermatozoides.

5 La expresión "fosfolípidos aniónicos" representa, por ejemplo, la cardiolipina, la fosfatidilserina, el ácido fosfatídico, el fosfatidilinositol, el fosfatidilglicerol.

La expresión "fosfolípidos zwitteriónicos" representa, por ejemplo, la fosfatidilcolina, la esfingomielina y la fosfatidil etanolamina.

10 Por lo tanto, de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, solamente una parte de los glicero-fosfolípidos presentes en un espermatozoide se hidroliza, lo que conduce a espermatozoos capaces de proporcionar una tasa de fertilización mayor que la de los espermatozoos no tratados.

Por debajo de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, la actividad específica es demasiado baja para obtener una hidrólisis de fosfolípidos y, por lo tanto, la sPLA2 no puede participar en dichas etapas cruciales de la fisiología de los espermatozoides.

15 Por encima de 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, la actividad específica es demasiado alta, lo que lleva a un nivel demasiado alto de hidrólisis de los glicero-fosfolípidos presentes en un espermatozoide y, por lo tanto, a la destrucción de las células espermáticas.

Preferiblemente, en la presente invención, "la actividad específica de sPLA2 está comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ " es frente a uno, dos, tres, cuatro o cinco glicerosfosfolípidos, y más preferiblemente frente a uno, dos o tres glicero-fosfolípidos.

20 En particular, "la actividad específica de sPLA2 comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ " es frente a un glicero-fosfolípido.

25 Más particularmente, "la actividad específica de sPLA2 comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ " es frente a dos glicero-fosfolípidos.

30 En esta realización, la actividad específica de sPLA2 puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a un primer glicero-fosfolípido y de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a un segundo glicero-fosfolípido, pero también puede ser de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a ambos glicero-fosfolípidos o de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a ambos glicerosfosfolípidos.

En particular, "la actividad específica de sPLA2 comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ " es frente a tres glicero-fosfolípidos.

En esta realización, la actividad específica de sPLA2 puede estar comprendida:

35 • entre aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a tres glicero-fosfolípidos o,

• entre aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a un glicero-fosfolípido y entre aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a otros dos glicero-fosfolípidos, o

40 • entre aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a dos glicero-fosfolípidos y entre aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a un tercer glicero-fosfolípido o, también puede ser de aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a tres glicero-fosfolípidos.

45 En una realización ventajosa, la sPLA2 utilizada anteriormente es una proteína de origen Mamífero, en particular seleccionada entre los Grupos IIA, IIF, III, V o X de sPLA2, más concretamente GX de ratón o GV humana o GX humana, o de origen procariótico tal como de origen bacteriano, de origen vegetal o de otros orígenes incluyendo, por ejemplo, venenos de animales, en particular seleccionados entre venenos de artrópodos o serpientes, más concretamente Apis spp, Oxyuranus spp y Daboia spp., o una proteína homóloga de los mismos producida como una proteína recombinante.

50 Por "Orígenes de Mamíferos" se entiende una clase de animales vertebrados (Mamíferos) que dan a luz a crías vivas.

Los Mamíferos se dividen en dos subclases, *Prototheria*, y *Theria*, que incluye los Marsupiales y Placentarios

- vivíparos. La mayoría de los Mamíferos, incluidos los seis órdenes más grandes, pertenecen al grupo de los placentarios. Los tres órdenes más grandes, en orden descendente, son Rodentia (ratones, ratas y otros Mamíferos pequeños que roen), Chiroptera (murciélagos) y Soricomorpha (musarañas, topos y solenodontes). Los siguientes tres órdenes más grandes incluyen Carnivora (perros, gatos, comadrejas, osos, focas y sus parientes), Cetartiodactyla (que incluyen los Mamíferos ungulados con pezuñas hendidas y las ballenas) y Primates a los que pertenece la especie Humana.
- 5 Por "origen procariótico" se entiende un grupo de organismos que carecen de un núcleo celular (karyon) u otros orgánulos unidos a la membrana.
- Los Procariotas se dividen en dos dominios: Bacteria y Archaea.
- 10 Se pueden encontrar ejemplos de orígenes vegetales, pero sin limitación, en Mansfeld J, Ulbrich-Hofmann R. (2007) Secretary phospholipase A2-alpha from Arabidopsis thaliana: functional parameters and substrate preference. Chem Phys Lipids. 150:156-66 and Fujikawa R, Fujikawa Y, Iijima N, Esaka M. (2005) Molecular cloning, expression, and characterization of secretory phospholipase A2 in tobacco. Lipids. 40:901-8.
- 15 En la presente memoria descriptiva, se debe observar que los términos "GX" y "GV" designan sPLA2 de los grupos X y V, respectivamente.
- Las sPLA2 de los grupos I, II, V y X son definidas por Singer et al. (Interfacial Kinetic and Binding Properties of the Complete Set of Human and Mouse Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A2, Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, Núm. 50, Edición del 13 de diciembre, pág. 48535-48549, 2002).
- 20 Las sPLA2 del grupo III son definidas por Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka G, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M.(2008) and Mounier CM, Wendum D, Greenspan E, Fléjou JF, Rosenberg DW, Lambeau G. (2008) Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate. Br J Cancer. 98:587-95.
- 25 Los análisis de ratones transgénicos para fosfolipasa A2 secretada del grupo III revelan la participación potencial de esta enzima en la modificación de las lipoproteínas plasmáticas, la formación de células espumosas de macrófagos y la aterosclerosis. J Biol Chem. 283: 33483-97.
- También se pueden utilizar en la presente invención isoformas de sPLA2 activa de sPLA2 de diversos orígenes anteriormente definidos.
- Hay varios tipos de venenos de animales, en particular:
- 30 • *neurotoxinas* que actúan sobre el sistema nervioso de la víctima, causando excitación (cólicos, vómitos, convulsiones) o depresión (parálisis, depresión o paro respiratorio o cardíaco),
- *hemotoxinas* que descomponen los tejidos de la víctima, generalmente por un ácido o una toxina que previene o provoca la coagulación de la sangre, o destruye los glóbulos rojos o blancos.
- El veneno generalmente contiene ambos tipos, pero uno de ellos domina.
- 35 Las enzimas son otro componente importante en los venenos de los animales.
- Los artrópodos son animales pertenecientes al Phylum Arthropoda e incluyen los insectos, arácnidos, crustáceos y otros.
- Muchos grupos principales de animales contienen especies venenosas, incluidos varios insectos, peces, lagartos, escorpiones, serpientes y arañas.
- 40 Apis spp son insectos de la familia Apidae.
- Oxyuranus spp son serpientes de la familia Elapidae encontradas en Australia.
- Daboia spp son serpientes de la familia Viperidae encontradas en particular en el Sudeste Asiático.
- En una realización ventajosa, la sPLA2 definida anteriormente se purifica a partir de diferentes organismos.
- En otra realización preferida, la sPLA2 se utiliza sin purificación.
- 45 Se prefieren las sPLA2 de Mamíferos, Bacterias o vegetales en comparación con las que tienen su origen en el veneno de un animal para aumentar la fertilización, pero también se puede utilizar una sPLA2 modificada de veneno animal para aumentar la fertilización.
- En una realización ventajosa, los glicerosfolípidos hidrolizados por la sPLA2 definida anteriormente se seleccionan

de la lista que consiste en: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (POPS).

Los glicerol-fosfolípidos definidos anteriormente son constituyentes de la membrana del espermatozoide, cuyas proporciones pueden diferir entre los sujetos.

5 En otra realización ventajosa, la actividad específica de sPLA2 definida anteriormente frente a POPC está comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, particularmente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, más concretamente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular aproximadamente 7 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$,

10 y/o la actividad específica de sPLA2 frente a POPG está comprendida entre 1 y 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, particularmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, más concretamente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 35 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular 30 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$,

15 y/o la actividad específica de sPLA2 frente a POPS está comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, particularmente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, más concretamente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular aproximadamente 20 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$.

La actividad específica de sPLA2 frente a POPG, POPS y POPC se puede encontrar en Singer et al. (Interfacial Kinetic and Binding Properties of the Complete Set of Human and Mouse Groups I, II, V, X, and XII Secreted Phospholipases A2, Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, Núm. 50, Edición de 13 de diciembre, pág. 48535-48549, 2002).

20 En otra realización ventajosa, la sPLA2 definida anteriormente se utiliza a una concentración de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 200 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 20 nM, más preferiblemente de 0,2 a 2 nM, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 200 nM, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 20 nM, más preferiblemente de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 200 nM, en particular aproximadamente 200 nM.

25 Como se muestra en el ejemplo 5 (a y b) y en las figuras 2A y 2C, las sPLA2 desencadenan, tanto en espermatozoides capacitados como no capacitados, la RA, desde una dosis muy baja tal como 0,2 nM para mGX (figura 2B), en ausencia de oocitos.

Un espermatozoide que ha efectuado la RA se denomina espermatozoide que ha efectuado la reacción acrosómica.

30 Los espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica no pueden participar por lo tanto en el proceso de fertilización ya que no pueden cruzar la zona pelúcida.

La capacitación es el proceso de maduración (o activación) de los espermatozoides; sin capacitación, el espermatozoide no puede fertilizar el óvulo.

Por lo tanto, una ventaja de la invención es la selección de espermatozoides que hayan tenido una capacitación, o maduración eficaz, entre los espermatozoides que hayan tenido una capacitación ineficaz o nula.

35 Por debajo de 0,2 nM, la sPLA2 ya no desencadena la RA.

Por encima de 200 nM, la RA no aumenta más.

Se debe observar que una concentración 100 nM de sPLA2 es equivalente a 1 mg/L de sPLA2.

Por lo tanto, otra ventaja de la invención es que las sPLA2 pueden modular eventos clave de la fisiología de los espermatozoides.

40 También se debe tener en cuenta que, como se describe en el ejemplo 3, el espermatozoide también libera una mGX endógena durante la RA. Por lo tanto, en el caso en el que se utiliza mGX para desencadenar la RA, y así modular la fertilización, la concentración arriba definida corresponde a mGX endógena y mGX exógena.

45 La concentración de mGX endógeno es inferior a 0,1 nM, lo que significa que a concentraciones más altas tales como las citadas anteriormente, la concentración endógena es insignificante en comparación con la sPLA2 exógena utilizada.

La concentración 0,2 nM representa menos de 50% de la sPLA2 endógena y más de 50% de la sPLA2 exógena.

En una realización ventajosa, la sPLA2 utilizada anteriormente a una concentración de 0,2 nM a menos de 2 nM está constituida por sPLA2 endógena y sPLA2 exógena.

50 En una realización ventajosa, la sPLA2 utilizada anteriormente a una concentración de 2 nM a 200 nM está constituida por sPLA2 exógena, siendo insignificante la cantidad de sPLA2 endógena.

En una realización ventajosa, la presente invención se refiere al uso de sPLA₂ anteriormente definido, en donde dicha fertilización, en particular la fertilización de los oocitos *in vitro* se incrementa con una tasa de rendimiento superior a 40%.

5 Con los espermatozoides obtenidos de los machos OF1, la tasa de embriones de dos células obtenida a las 24 horas depende de la dosis y aumenta de 45% con espermaticos de control a 65% con los espermatozoides tratados con mGX a 200 nM.

10 El Ejemplo 8 y las Figuras 5A muestran los resultados obtenidos en la FIV con una cepa de ratón OF1 (cepa sin problemas de fertilidad). Con los espermatozoides obtenidos de machos C57B1/6 (cepa de ratón con problemas de fertilidad), la tasa de embriones de dos células obtenida a las 24 horas depende de la dosis y aumenta de 8,2% con espermatozoides de control a 19,9% con espermatozoides tratados con mGX a 200 nM. Por lo tanto, en la cepa C57B1/6, la tasa de fertilización, puntuada como la tasa de embriones de 2 células obtenida a las 24 horas, aumenta de 142% con espermaticos tratados con mGX en comparación con los espermaticos no tratados.

Por lo tanto, con el uso de sPLA₂ de la presente invención, la maduración de los espermatozoides no solo se modifica sino que también la fertilización y la embriogénesis viable también mejoran en dos cepas diferentes.

15 En una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de fosfolipasa secretada y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ en donde dicho al menos un metabolito se selecciona de la lista que consiste en ácidos grasos o lisofosfolípidos, en particular de ácido araquidónico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido α -linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, 20 lisofosfatidato.

En una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de fosfolipasa secretada y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ en donde dichos metabolitos son ácido araquidónico y lisofosfatidilcolina.

En una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ en donde dichos metabolitos son ácido araquidónico y lisofosfatidilcolina.

25 En una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de fosfolipasa secretada y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂, en donde dicho metabolito está en una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 50 μ M, preferiblemente entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 50 μ M, más preferiblemente entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 10 μ M, en particular aproximadamente 10 μ M.

30 En una realización ventajosa, la invención se refiere al uso de fosfolipasa A2 secretada (sPLA₂) como se define anteriormente, que puede evitar dicha fertilización para la fabricación de un fármaco anticonceptivo.

Por la expresión "prevenir la fertilización", se debe entender la ausencia de fertilización.

Por "fármaco anticonceptivo" se entiende un fármaco que conduce a la ausencia de fertilización.

35 En una realización ventajosa, la sPLA₂ definida anteriormente presenta la propiedad de hidrolizar el éster *sn*-2 de uno o más glicero-fosfolípidos con una actividad específica superior a aproximadamente 25 μ moles/min/mg, en particular superior a aproximadamente 50 μ moles/min/mg sobre fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos.

Por lo tanto, en esta realización, la actividad específica de la sPLA₂ debe ser la opuesta a la descrita para aumentar la fertilización y, por lo tanto, la sPLA₂ utilizada evita la fertilización de los Mamíferos.

40 Preferiblemente, en la presente invención, "la actividad específica de sPLA₂ mayor de aproximadamente 25 μ moles/min/mg, en particular mayor de aproximadamente 50 μ moles/min/mg" es frente a uno, dos, tres, cuatro o cinco glicero-fosfolípidos, y más preferiblemente frente a uno, dos o tres glicero-fosfolípidos.

En particular, "la actividad específica de sPLA₂ mayor de aproximadamente 25 μ moles/min/mg, en particular mayor de aproximadamente 50 μ moles/min/mg" es frente a un glicero-fosfolípido.

45 Más particularmente, "la actividad específica de sPLA₂ mayor de aproximadamente 25 μ moles/min/mg, en particular mayor de aproximadamente 50 μ moles/min/mg" es frente a dos glicero-fosfolípidos.

En esta realización, la actividad específica de sPLA₂ puede ser superior a aproximadamente 50 μ moles/min/mg con respecto a un primer glicero-fosfolípido y superior a aproximadamente 25 μ moles/min/mg frente a un segundo glicero-fosfolípido, pero también puede ser mayor de aproximadamente 25 μ moles/min/mg frente a ambos glicero-fosfolípidos o mayor de aproximadamente 50 μ moles/min/mg frente a ambos glicero-fosfolípidos.

50 En particular, "la actividad específica de sPLA₂ mayor de aproximadamente 25 μ moles/min/mg, en particular mayor de aproximadamente 50 μ moles/min/mg" es frente a tres glicero-fosfolípidos.

En esta realización, la actividad específica de sPLA2 puede ser:

- superior a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a tres glicero-fosfolípidos o,

- superior a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a un primer glicero-fosfolípido y superior a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a otros dos glicero-fosfolípidos, o

5 - superior a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a dos glicero-fosfolípidos y superior a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a un tercer glicero-fosfolípido o,

También puede ser superior a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ frente a tres glicero-fosfolípidos.

10 Se debe observar que en el caso en el que la actividad específica de una sPLA2 frente a un glicero-fosfolípido para obtener un aumento de la fertilización está comprendida entre aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, la actividad específica necesaria de sPLA2 frente al mismo glicero-fosfolípido para evitar la fertilización debe ser superior a aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$.

15 En el caso en el que la actividad específica frente a un glicero-fosfolípido para obtener un aumento de la fertilización está comprendida entre aproximadamente 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ y aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, la actividad específica necesaria frente al mismo glicero-fosfolípido para evitar la fertilización debe ser superior a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$.

En una realización ventajosa, los glicero-fosfolípidos hidrolizados por la sPLA2 definida anteriormente se seleccionan de la lista que consiste en: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoserina (POPS).

20 En una realización ventajosa, la actividad específica de sPLA2 frente a POPC es mayor de aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular mayor o igual a 30 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$.

25 La actividad específica de sPLA2 frente a POPC es la más importante para evitar dicha fertilización en comparación con la de POPG y/o POPS. Por ejemplo, la sPLA2 tóxica recombinante de taipán OS2 (descrita como en "Lambeau G, Barhanin J, Schweitz H, Qar J, Lazdunski M. (1989) Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. J Biol Chem. 264:11503-10) que tiene la siguiente actividad específica (determinada como en Rouault et al. 2006 Biochemistry 2006, 45, 5800): POPC: 59 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$, POPG: 471 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ y POPS: 23 $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$) disminuye el número de embriones viables de 2 células mientras aumenta el número de embriones muertos como se muestra en la figura 6.

En una realización ventajosa, la actividad específica de sPLA2 definida anteriormente frente a POPC es mayor de aproximadamente 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular 30 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$,

30 y/o la actividad específica de sPLA2 frente a POPG es superior a aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular > 250 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$,

y/o la actividad específica de sPLA2 frente a POPS es mayor de aproximadamente 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular > 250 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$.

35 En otra realización preferida, la sPLA2 definida anteriormente se utiliza a una concentración de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 200 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 20 nM, más preferiblemente de 0,2 a 2 nM, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 200 nM, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 20 nM, más preferiblemente de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 200 nM, en particular aproximadamente 200 nM.

40 En una realización ventajosa, la sPLA2 utilizada para evitar la fertilización es una sPLA2 que tiene su origen en un veneno animal, en particular seleccionado entre venenos de artrópodos o serpientes, más concretamente *Apis* spp, *Oxyuranus* spp y *Daboia* spp., o una proteína homóloga de los mismos producida como proteína recombinante.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende sPLA2 definida anteriormente como una sustancia activa, asociada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En esta realización, la composición farmacéutica puede aumentar o disminuir (o prevenir) la fertilización dependiendo de la dosificación de sPLA2.

La composición farmacéutica puede estar bajo diversas formas galénicas, en particular, forma sólida tal como polvo, o forma semisólida, tal como crema o gel, o forma líquida, tal como loción o solución.

50 La composición farmacéutica se puede administrar, *in vitro*, en forma de polvo o en forma de solución al medio en donde se lleva a cabo la fertilización, la capacitación o la clasificación de los espermatozoos, para aumentar la fertilización o en forma de jalea vaginal (gel), películas, esponja o espuma para disminuir la fertilización.

Para promover el uso de fertilización, se podría utilizar sPLA2 susceptible de aumentar dicha fertilización (por ejemplo mGX), de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,2 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, en particular 2 µg/ml, de medio de incubación de espermatozoides.

- 5 Para su uso como anticonceptivo, se podría utilizar sPLA2 susceptible de disminuir dicha fertilización (por ejemplo OS2), de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,5 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, en particular 5 µg/ml, de gel o espuma vaginal.

- 10 En una realización ventajosa, la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica definida anteriormente, en donde dicha sPLA2 es una proteína purificada de origen Mamífero, en particular seleccionada entre los Grupos IIA, IIF, III, V o X de sPLA2, más concretamente GX de ratón o GV de ser humano o GX de ser humano, o de origen procariótico tal como origen bacteriano, origen vegetal o de otros orígenes, incluyendo, por ejemplo, venenos animales, en particular seleccionados entre venenos de artrópodos o de serpientes, más concretamente Apis spp, Oxyuranus spp y Daboia spp., o una proteína homóloga de los mismos producida como una proteína recombinante.

- 15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a sPLA2 como se definió anteriormente, para el tratamiento de la esterilidad o para promover o mejorar la fertilización o para promover o mejorar la embriogénesis viable de un Mamífero, en particular un Mamífero hembra sometido a fertilización *in vitro* (FIV), a un procedimiento de transferencia intrafalopiana de gametos (TIFG), a inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE) o a inseminación terapéutica de donantes (ITD) durante las tecnologías de reproducción asistida (TRA).

- 20 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a sPLA2 como se definió anteriormente, para la anticoncepción en Mamíferos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de selección *in vitro* de espermatozoides que comprende las siguientes etapas:

- 25 a. tratar espermatozoides a una concentración de 1 millón de células/ml, previamente recolectados, con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5-2% o cualquier compuesto que se una a colesterol para obtener espermatozoides capacitados,

- 30 b. incubar los espermatozoides capacitados a una concentración de 1 millón de células/ml con sPLA2 que tiene una actividad específica como se definió anteriormente, a una concentración de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 200 nM, preferiblemente de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 20 nM, más preferiblemente de 0,2 a 2 nM, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 200 nM, más preferiblemente de aproximadamente 2 nM a aproximadamente 20 nM, más preferiblemente de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 200 nM, en particular a aproximadamente 200 nM, y/o metabolitos de sPLA, como se definió anteriormente, a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 µM y aproximadamente 50 µM, preferiblemente entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 50 µM, más preferiblemente entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 10 µM, en particular aproximadamente 10 µM, para obtener una mezcla de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica y espermatozoides que no han efectuado la reacción acrosómica,

- 35 c. aislar los espermatozoides que no han efectuado la reacción acrosómica después del lavado y centrifugar y descartar los espermatozoides que no han efectuado la reacción acrosómica.

La etapa a. es necesaria para la capacitación de los espermatozoides.

La incubación en la etapa b. se debe llevar a cabo con una sPLA2 que tenga una actividad específica comprendida entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 µmoles/min/mg, en particular de aproximadamente 1 µmol/min/mg a aproximadamente 25 µmoles/min/mg con respecto a uno o más glicero-fosfolípidos.

- 45 El tiempo de incubación de los espermatozoides capacitados con sPLA2 puede estar comprendido entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 2 horas, preferiblemente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora, preferiblemente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 15 minutos, en particular aproximadamente 10 minutos. Un tiempo de 10 minutos corresponde al parámetro cinético que permite obtener la máxima reacción acrosómica.

50

Por encima de 2 horas, el ADN estará fragmentado y, por lo tanto, será deficiente.

Por debajo de 0.1 minuto, el tiempo de incubación es demasiado bajo para desencadenar una reacción acrosómica.

El tiempo de incubación de los espermatozoides capacitados con metabolitos de sPLA puede estar comprendido entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 2 horas, preferiblemente entre aproximadamente 1 minuto y

aproximadamente 1 hora, preferiblemente entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 1 hora, más preferiblemente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 45 minutos, en particular aproximadamente 45 minutos.

Un tiempo de 45 minutos corresponde al parámetro cinético que permite obtener la máxima reacción acrosómica.

5 El tiempo de incubación de los espermatozoides capacitados con sPLA2 y metabolitos de sPLA puede estar comprendido entre aproximadamente 0,1 minutos y aproximadamente 2 horas, preferiblemente entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 1 hora, preferiblemente entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 1 hora, más preferiblemente entre aproximadamente 30 y aproximadamente 45 minutos, en particular aproximadamente 45 minutos.

10 Los metabolitos de sPLA2 también se pueden introducir cuando los espermatozoides y los oocitos se mezclan, lo que se corresponde con el procedimiento de fertilización (figura 7). Los metabolitos de sPLA2 están presentes en el medio de fertilización hasta el primer lavado de espermatozoides (4 horas).

15 Al comienzo de la etapa b, es decir, después de la capacitación de los espermatozoides y antes de la incubación con la sPLA2 y/o los metabolitos de sPLA, los espermatozoides capacitados comprenden una mezcla de espermatozoides de calidad eficaz y espermatozoides de calidad deficiente, que tienen en particular un ADN fragmentado y una modificación de la composición de lípidos de la membrana plasmática.

Se ha observado que cuando la calidad del ADN del espermatozoide es baja, hay un aumento de los fosfolípidos en la membrana del espermatozoide y, en particular, de POPS, que se eliminará por lo tanto mediante la etapa de incubación, lo que conducirá a un aumento de la calidad del esperma.

20 La etapa c. elimina los espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica deficiente y conduce a la obtención de espermatozoides concentrados con una alta calidad.

25 Otra ventaja de la invención es que la incubación de dicha mezcla con sPLA2 provoca la hidrólisis de espermatozoos deficientes que conduce a una selección de espermatozoos eficaces, que podrían utilizarse adicionalmente, en particular en las TRA, para mejorar la tasa de fertilización, la tasa de embriones viables y por lo tanto, reducir el riesgo de defectos de nacimiento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de fertilización *in vitro* que comprende las siguientes etapas:

30 a. tratar los espermatozoides a la concentración de 1 millón de células/ml, previamente recogidas, con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5-2% o cualquier compuesto que se una a colesterol para obtener espermatozoides capacitados,

35 b. incubar los espermatozoides capacitados a la concentración de 1 millón de células/ml con sPLA2 que tiene una actividad específica como se definió anteriormente, a una concentración entre aproximadamente 0,2 nM y aproximadamente 200 nM, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 nM y aproximadamente 20 nM, más preferiblemente entre 0,2 y 2 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 200 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 20 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 200 nM, en particular aproximadamente 200 nM, y/o metabolitos de sPLA, como se definió anteriormente, a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 μ M y aproximadamente 50 μ M, preferiblemente entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 50 μ M, más preferiblemente entre aproximadamente 1 μ M y aproximadamente 10 μ M, en particular aproximadamente 10 μ M, para obtener una mezcla de espermatozoides que han efectuado una reacción acrosómica y espermatozoides que no han efectuado la reacción acrosómica,

40 c. poner en contacto dichos espermatozoides que no han efectuado la reacción acrosómica a una concentración de 50000 μ g/ml, después del lavado y la centrifugación, con 20 a 100 oocitos recogidos previamente.

45 Las etapas a y b son similares al procedimiento definido anteriormente que conduce a mejorar los espermatozoides maduros.

La etapa c. consiste en poner en contacto los espermatozoides maduros y que no han efectuado la reacción acrosómica con oocitos para llevar a cabo la fertilización con una mejor tasa y una mejor embriogénesis.

Por lo tanto, la presente invención puede tratar la infertilidad masculina.

50 De hecho, en el caso de la infertilidad masculina, el tratamiento de los espermatozoides conduce a una selección de espermatozoos eficaces y, por lo tanto, es posible tener espermatozoides tratados enriquecidos con espermatozoos maduros que pueden ser introducidos en un organismo humano femenino para llevar a cabo la fertilización y la embriogénesis o en contacto con oocitos previamente recogidos para llevar a cabo la fertilización *in vitro* y la embriogénesis y así obtener embriones viables y sanos.

En una realización ventajosa, el procedimiento definido anteriormente aumenta la tasa de fertilización.

La incubación de espermatozoides capacitados con sPLA2 y/o metabolitos de sPLA permite descartar la mayor parte de los espermatozoos deficientes y, por lo tanto, mejora la tasa de fertilización y así aumenta la cantidad de embriones sanos y viables obtenidos después de la etapa de fertilización.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de predicción de la fertilidad en un Mamífero que comprende las siguientes etapas:

a. tratar los espermatozoides a la concentración de 1 millón de células/ml, previamente recogidos, con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5-2% o cualquier compuesto que se una al colesterol para obtener espermatozoides capacitados.

10 b. incubar los espermatozoides capacitados a la concentración de 1 millón de células/ml con sPLA2 que tiene una actividad específica como se definió anteriormente, a una concentración entre aproximadamente 0,2 nM y aproximadamente 200 nM, preferiblemente entre aproximadamente 0,2 nM y aproximadamente 20 nM, más preferiblemente entre 0,2 y 2 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 200 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 2 nM y aproximadamente 20 nM, más preferiblemente entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 200 nM, en particular aproximadamente 200 nM, y/o metabolitos de sPLA, como se definieron anteriormente, a una concentración comprendida entre aproximadamente 0,1 μM y aproximadamente 50 μM, preferiblemente entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 50 μM, más preferiblemente entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 10 μM, en particular aproximadamente 10 μM, para obtener una mezcla de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica y espermatozoides que no han efectuado la reacción acrosómica,

c. determinar la cantidad de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica y compararla con la cantidad de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica obtenidos con un Mamífero de control,

d. pronosticar que el Mamífero es infértil si la cantidad de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica determinada en la etapa c. es mayor que la cantidad obtenida con dicho Mamífero de control.

25 Las etapas a y b son similares al procedimiento definido anteriormente.

Como ya se discutió, los espermatozoides capacitados comprenden una mezcla de espermatozoides de calidad eficaz y espermatozoides de calidad deficiente, que tienen en particular un ADN fragmentado y una modificación de la composición de lípidos de la membrana plasmática.

30 Por lo tanto, en el caso en el que un Mamífero sea infértil, el nivel de espermatozoides deficientes es mayor en comparación con el control y, por lo tanto, el tratamiento de los espermatozoides con sPLA2 y/o metabolitos de sPLA que pueden aumentar dicha fertilización, conduce a una mayor cantidad de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica con respecto al control.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de anticoncepción que comprende una etapa en la que se ponen en contacto espermatozoides de Mamíferos con sPLA2 que tiene una actividad específica como se definió anteriormente, siempre que se excluya la implementación de dicho procedimiento en la esfera privada de los seres humanos.

La actividad específica es la misma que la definida anteriormente para la fertilización.

La anticoncepción se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la aplicación vaginal de un gel, una película, una espuma o una esponja que contenga sPLA2.

40 **Descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra que mGX se libera durante la reacción acrosómica y, por lo tanto, se localiza en el acrosoma del espermatozoide

45 **A.** mGX se mide con inmunoanálisis de fluorescencia con resolución temporal (TRFIA) en el medio de capacitación que contiene albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en diferentes momentos de capacitación: 0, 45 y 90 minutos y a los 90 minutos en presencia del ionóforo de calcio A23187 durante los últimos 30 minutos de capacitación. A23187 produce un aumento de dos veces del nivel de mGX en el medio de capacitación.

El eje x corresponde al tiempo de capacitación (0, 45 y 90 minutos y 90 minutos en presencia de A23187 en las columnas de izquierda a derecha).

El eje y corresponde a la concentración de mGX (ng)

50 **B.** Las actividades de sPLA2 se miden utilizando membranas de E. coli radiomarcadas como sustrato. Los espermatozoides se sometieron a centrifugación después de una duración variable de capacitación y se midieron las

actividades de sPLA2 en el sedimento con espermatozoides y en el sobrenadante a los 0, 45 y 90 minutos y a los 90 minutos en presencia del ionóforo de calcio A23187 durante los últimos 30 minutos de capacitación.

El eje x representa el tiempo de capacitación:

5 0, 45, 90 minutos, 90 minutos más A23187 durante los últimos 30 minutos, para las cuatro primeras columnas de sobrenadante de color negro

0, 45, 90 minutos, 90 minutos más A23187 durante los últimos 30 minutos, para las cuatro últimas columnas de sedimento de color negro;

El eje y representa la actividad total en DPM.

La Figura 2 muestra que las sPLA2 son potentes activadores de la reacción acrosómica

10 **A.** Tres diferentes sPLA2 pertenecientes a 3 grupos diferentes (grupo IIA, grupo V y grupo X) desencadenan la reacción acrosómica. Los espermatozoides se incubaron 10 minutos con 200 nM de sPLA2 y posteriormente se fijaron y se tiñeron con azul de Coomassie. Se contaron al menos 200 espermatozoides por portaobjetos.

El eje x representa el control, mGIIA, mGV, mGX de las columnas de izquierda a derecha.

El eje y representa el porcentaje de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica (RA).

15 **B.** Curvas dosis-respuesta de la reacción acrosómica activada por sPLA2. sPLA2 mGIIA (●) y mGX (○). Los datos se expresan como el porcentaje de reacción acrosómica inducida por sPLA2 (obtenida después de restar la RA espontánea a la RA total) en función de la concentración de sPLA2, que oscila entre 0,2 nM y 500 nM. mGX es un activador altamente potente de RA ya que dosis bajas como 0,2 nM inducen 15% de RA.

El eje x representa la concentración de sPLA2 (nM).

20 El eje y representa el porcentaje de acrosoma reaccionado (RA) obtenido por encima de la RA espontánea.

C. mGX es capaz de desencadenar una reacción acrosómica de espermatozoides no capacitados (10 min) y de espermatozoides capacitados (55 y 90 min). Los espermatozoides se incubaron con BSA al 2% en una cámara con CO₂ al 5% a 37°C. La reacción acrosómica desencadenada por sPLA2 se ha comparado con la reacción acrosómica espontánea a 10, 55 y 90 minutos de capacitación.

25 El eje x representa de izquierda a derecha:

Primera columna: espermatozoides no capacitados incubados 10 min sin mGX.

Segunda columna: espermatozoides no capacitados incubados 10 min con mGX.

Tercera columna: espermatozoides capacitados incubados 55 min sin mGX.

Cuarta columna: espermatozoides capacitados incubados 55 min con mGX.

30 Quinta columna: espermatozoides capacitados incubados 90 min sin mGX.

Sexta columna: espermatozoides capacitados incubados 90 minutos con mGX.

El eje y representa el porcentaje de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica (RA).

La Figura 3 muestra que se requiere la actividad enzimática de mGX para desencadenar la reacción acrosómica.

35 **A.** La mutación del sitio catalítico de mGX (H48Q) anula su capacidad de desencadenar la reacción con el acrosoma de los espermatozoides (□). Pro-mGX, la proenzima inactiva de mGX tampoco puede desencadenar la reacción con el acrosoma de los espermatozoides (Δ) en comparación con el control de mGX (●).

El eje x representa la concentración de sPLA2 (nM).

El eje y representa el % de RA inducida por sPLA2.

40 **B.** El inhibidor específico de sPLA2 LY329722 bloquea la capacidad de mGX para desencadenar la reacción con el acrosoma. La tasa de RA de los espermatozoides capacitados incubados transitoriamente 10 min con el inhibidor de mGX LY329722 (barra de color blanco de la izquierda) es similar a la de los espermatozoides no tratados (barra de color negro), lo que demuestra que LY329722 en sí mismo no modifica la RA. Por otro lado, Ly329722 1 μM bloquea la RA inducida por mGX 200 nM (barra de color blanco de la derecha frente a barras de color gris).

45 El eje x representa en las columnas de izquierda a derecha:

Barra de color negro: espermatozoides no tratados.

Barra de color blanco: espermatozoides + LY329722.

Barra de color gris: espermatozoides + mGX (200 nM).

Barra de color blanco: espermatozoides + mGX (200 nM) + LY329722.

5 El eje y representa el % de espermatozoides que han efectuado la reacción acrosómica.

C. La eliminación del calcio externo ($n = 3$) o adición de Ni^{2+} 2 mM ($n = 3$) en el baño bloquean la capacidad de mGX para desencadenar la reacción acrosómica.

El eje x representa en columnas de izquierda a derecha:

Barra de color negro: espermatozoides no tratados.

10 Barra de color gris: espermatozoides + mGX (200 nM)

Barra de color blanco izquierda: espermatozoides + mGX (200 nM) sin Ca^{++} .

Barra de color blanco derecha: espermatozoides + mGX (200 nM) con Ni^{2+} 2 mM.

El eje y representa el % de espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica.

15 **La Figura 4 muestra** fotografías de las diferentes fases alcanzadas por los oocitos a las 24 h después de la fertilización (de izquierda a derecha):

- "Ovulo no fertilizado" (UF) corresponde a los oocitos con un cuerpo polar

- "Embriones de dos células" corresponde al desarrollo normal del embrión

- "Embriones muertos" corresponde a oocitos que presentan cuerpos polares pero no división celular o divisiones múltiples e incontroladas.

20 **La Figura 5 muestra que mGX exógeno promueve la fertilización con espermatozoides permitiendo un mejor desarrollo del embrión.**

A. Rendimiento de FIV realizada con espermatozoides de machos OF1 (barras de color negro, $n = 13$) y espermatozoides tratados con mGX 200 nM (barras de color blanco, $n = 13$). Antes de mezclarse con oocitos, los espermatozoides se capacitaron 35 minutos en M16-BSA al 2%. A los 35 min, las células espermáticas se incubaron durante 10 min con medio de control o mGX 200 nM, en medio de cultivo M16. Para cada experimento ($n = 13$ machos diferentes), el número de oocitos utilizados fue entre 20 y 58 oocitos.

25

El eje x representa el conjunto de barras de izquierda a derecha:

Primer conjunto:

30 Sin fertilizar (UF): espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con mGX (200 nM) (barra de color blanco).

Segundo conjunto:

Embriones de 2 células: espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con mGX (200 nM) (barra de color blanco).

Tercer conjunto:

35 Embriones muertos: espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con mGX (200 nM) (barra de color blanco).

El eje y representa el % de oocitos que alcanzan las fases correspondientes.

B. El efecto exógeno de mGX está bloqueado por el inhibidor de sPLA2 LY329722. El rendimiento de FIV obtenido con espermatozoides de machos OF1 (barras de color negro, $n = 6$), espermatozoides tratados con 1 μ M del inhibidor de sPLA2 LY329722 (barras de color gris oscuro), espermatozoides tratados con mGX 200 nM (barras de color gris claro) y espermatozoides tratados con mGX 200 nM preincubados con 1 μ M de LY329722 (barras de color blanco). Para cada experimento ($n = 6$ machos diferentes), el número de oocitos utilizados fue entre 20 y 58 oocitos.

40

El eje x representa el conjunto de barras de izquierda a derecha:

Primer conjunto:

No fertilizado (UF): espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con LY329722 (1 μ M) (barra de color gris oscuro), espermatozoides tratados con mGX (200 nM) (barra de color gris claro) y espermatozoides tratados con una mezcla de LY329722 (1 μ M) y mGX (200 nM).

Segundo conjunto:

- 5 Embriones de 2 células: espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con LY329722 (1 μ M) (barra de color gris oscuro), espermatozoides tratados con mGX (200 nM) (barra de color gris claro) y espermatozoides tratados con una mezcla de LY329722 (1 μ M) y mGX (200 nM).

Tercer conjunto:

- 10 Embriones muertos: espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con LY329722 (1 μ M) (barra de color gris oscuro), espermatozoides tratados con mGX (200 nM) (barra de color gris claro) y espermatozoides tratados con una mezcla de LY329722 (1 μ M) y mGX (200 nM).

El eje y representa el % de oocitos que alcanzan las fases correspondientes.

- 15 Antes de mezclarse con oocitos, los espermatozoides se capacitaron durante 35 minutos en M16- BSA al 2%. A los 35 min, las células espermáticas se incubaron durante 10 min con medio de control o mGX 200 nM, en medio de cultivo M16. Después del tratamiento, los fármacos se eliminaron por centrifugación y lavado para eliminar el fármaco no unido y los metabolitos lipídicos producidos durante la incubación con sPLA2. Los espermatozoides de control se sometieron al mismo protocolo de lavado a los 35 minutos de capacitación. Después del lavado del fármaco, se estimó que la concentración del fármaco restante era 1 nM. Para verificar que esta concentración de sPLA2 no inducía efectos de artefacto sobre la fusión espermatozoide-oocito (Riffo, M. S. y M. Parraga. 1997. Role of phospholipase A2 in Mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. J. Exp. Zool. 279:81-88), los autores de la presente invención realizaron experimentos de FIV de control donde los espermatozoides y los oocitos se incubaron con mGX 1 nM: no se observó ninguna diferencia (datos no mostrados).
- 20

La Figura 6 muestra que la sPLA2 tóxica de taipán OS2 inhibe la FIV.

- 25 Rendimiento de la FIV realizada con espermatozoides de machos OF1 (barras de color negro), espermatozoides tratados con OS2 20 nM (barras de color gris) y espermatozoides tratados con OS2 200 nM (barras de color blanco). Para cada experimento (n = 8 machos diferentes), el número de oocitos utilizados fue entre 20 y 60 oocitos.

El eje x representa el conjunto de barras de izquierda a derecha:

Primer conjunto:

- 30 Sin fecundar (UF): espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con OS2 (20 nM) (barra de color gris), espermatozoides tratados con OS2 (200 nM) (barra de color blanco).

Segundo conjunto:

- Fase 1 (una célula o célula fertilizada): espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con OS2 (20 nM) (barra de color gris),
35 espermatozoides tratados con OS2 (200 nM) (barra de color blanco).

Tercer conjunto:

Embriones de 2 células: espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con OS2 (20 nM) (barra de color gris), espermatozoides tratados con OS2 (200 nM) (barra de color blanco).

Cuarto conjunto:

- 40 Embriones muertos: espermatozoides (barra de color negro), espermatozoides tratados con OS2 (20 nM) (barra de color gris), espermatozoides tratados con OS2 (200 nM) (barra de color blanco).

El eje y representa el % de oocitos que alcanzan las fases correspondientes.

La Figura 7 muestra la mejora de la fertilización mediante el uso de sPLA2 (mGX) o tanto ácido araquidónico como lisofosfolina.

- 45 La sPLA2 a 200 nM, o sus metabolitos a una concentración de 10 μ M, mejoran el resultado de la fertilización. Se introdujeron ácido araquidónico (AA) y lisofosfolina (LPC, de los óvulos) durante el procedimiento de capacitación durante 45 minutos o después de la mezcla de gametos, durante el procedimiento de fertilización durante 4 horas.

Eje X: de izquierda a derecha: control, mGX (200 nM), LPC-AA (10 μ M) durante la capacitación, LPC-AA durante la

fertilización.

Eje Y: porcentaje de embrión de 2 células a las 24 h de la fertilización

La Figura 8 muestra el rescate de la fertilización con lisofosfolina LPC a 1 μ M después de bloquear sPLA2 mGX endógena con LY329722.

- 5 El bloqueo de sPLA2 mGX endógena liberada durante la reacción acrosómica espontánea que se produce durante la capacitación por un inhibidor de sPLA2 específico (LY329722) disminuyó el resultado de la fertilización. Esta disminución se rescató añadiendo durante el procedimiento de capacitación LPC a una concentración 1 μ M.

Eje X: de izquierda a derecha: control, LY329722 (2 μ M), LY329722 (2 μ M) + LPC (1 μ M) durante la capacitación.

Eje Y: porcentaje de embrión de 2 células a las 24 h de la fertilización

10 Ejemplos

Ejemplo 1: análisis de la reacción acrosómica

- 15 Se permitió que las células espermáticas de la cola del epidídimo nadaran en medio M2 durante 10 minutos. A continuación, los espermatozoides se incubaron, si era necesario, con diferentes sPLA2 en medio M16 a 37°C durante 10 min. Las células se transfirieron a una solución de PBS y a continuación se fijaron con una solución de PFA al 4% durante 2 minutos. Los espermatozoides se lavaron con acetato de amonio 100 mM durante 2 min y se montaron en mojado sobre portaobjetos y se dejó que se secaran al aire. Los portaobjetos se enjuagaron a continuación con agua y se tiñeron con azul de Coomassie (0,22%) durante 2 minutos y finalmente se enjuagaron con agua. Los portaobjetos se contaron inmediatamente y se anotaron al menos 150 células espermáticas.

Ejemplo 2: Microscopía electrónica

- 20 Las células espermáticas se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón de cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las células se lavaron con tampón y se fijaron posteriormente con Tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón durante 1 hora a 4°C. Después de un lavado extenso con agua, las células se tiñeron con acetato de uranilo al 0,5%, pH 4, durante la noche a 4°C. Las células se deshidrataron a continuación por medio de alcohol graduado (30%-60%-90%-100%-100%-100%) y se infiltraron con una mezcla de Epon/alcohol del 100% 1/1 durante 1 hora antes de varios baños de Epon de nueva aportación (Flukka) durante 3 horas. Finalmente, las células se centrifugaron y se sumergieron en Epon de nueva aportación y se polimerizaron durante 3 días a 60°C. Las secciones ultrafinas del sedimento celular se cortaron con un ultramicrotomo (Leica). Las secciones se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo al 4% y citrato de plomo al 1% antes de observarse en un microscopio electrónico a 80 kV (JEOL 1200EX).

30 Resultados: sPLA2 indujo una reacción acrosómica morfológicamente normal

- 35 Era importante comprobar por medio de microscopía electrónica (EM) que la sPLA2 inducía una reacción acrosómica morfológicamente normal. Los criterios morfológicos por los cuales una reacción acrosómica se evalúa como normal son relativamente limitados: en primer lugar, la membrana acrosomal externa debe presentar vesiculación; en segundo lugar, la membrana plasmática debe fusionarse con la membrana acrosomal externa y presentar una forma de doble horquilla característica en la base del acrosoma (Green, D.P. (1978) The induction of the acrosome reaction in guinea-pig sperm by the divalent metal cation ionophore A23187. J. Cell Sci., 32:137-51:137-151).

- 40 Para estos experimentos, se utilizaron espermatozoides no capacitados para reducir la contribución de la RA espontánea y sPLA2 200 nM para obtener la RA máxima inducida por sPLA2. Los espermatozoides se incubaron 10 minutos con sPLA2 mGX o el ionóforo de calcio A23187 y a continuación se fijaron. En presencia de A23187, todos los espermatozoides que habían efectuado reacción acrosómica presentaron una RA completa, con los 3 criterios morfológicos, como se describió anteriormente.

En presencia de sPLA2, se observaron fases muy tempranas de RA como la cavitación de la matriz acrosomal.

- 45 Los espermatozoides con RA completa inducida por sPLA2 también se evaluaron como normales en base a los criterios morfológicos.

Este resultado sugiere que la RA inducida por sPLA2 presenta una característica morfológica normal pero con una cinética más lenta que las observadas con el ionóforo de calcio A23187.

Ejemplo 3: Detección de sPLA2 mGX en células espermáticas

- 50 Se permitió que las células espermáticas de 4 colas de epidídimo de ratones con sPLA2 mGX nadaran durante 15 min a 37°C en 2,5 ml de medio M2. Se diluyeron a continuación alícuotas de 500 μ l de células espermáticas en 4,5 ml de medio M16 que contenía BSA libre de ácido graso al 2% y se incubaron adicionalmente a 37°C durante 0, 45 y

90 min. En algunos análisis, se añadió el ionóforo de Ca²⁺ A23187 (5 µM) después de los primeros 60 minutos de incubación y las células espermáticas se incubaron durante 30 minutos adicionales. Después de la incubación, las células espermáticas se centrifugaron durante 8 minutos a 1.200 rpm, y los sobrenadantes y los sedimentos celulares se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La expresión de la proteína sPLA2 mGX y la actividad enzimática se analizaron en sobrenadantes celulares brutos y sedimentos celulares después de la resuspensión en 500 µl de medio M16 que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (conjunto completo de inhibidores, Roche Biochemicals) y lisis con un disgregador Branson 350 Sonifier Cell. Se realizaron fluoroinmunoanálisis resueltos en el tiempo (TR-FIA) para sPLA2 mGX como se ha descrito con pequeñas modificaciones (Eerola, L. I., Surrel, F., Nevalainen, T. J., Gelb, M.H., Lambeau, G., y Laine, V. J. (2006) Analysis of expression of secreted phospholipases A2 in mouse tissues at protein and mRNA levels. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1761:745-756). En resumen, se diluyeron de 1 a 5 µl de muestra de proteína en 100 µl de tampón de análisis Delfia (solución de NaCl tamponada con Tris-HCl, pH 7,8, que contenía Na₃N, BSA, gamma globulinas bovinas, Tween 40, DTPA y colorante rojo inerte, Perkin Elmer Wallac, Turku, Finlandia) y se añadieron a pocillos de microtitulación recubiertos con IgG de sPLA2 mGX previamente lavados dos veces con solución de lavado TR-FIA (Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, que contenía NaCl al 0,9%, Na₃N al 0,04% y Tween 20 al 0,02%). Después de la incubación a temperatura ambiente con agitación constante a 200 ciclos/min durante 30 min, los pocillos se lavaron cuatro veces con solución de lavado TR-FIA, se incubaron con 100 µl de trazador IgG de mGX marcado con Eu (0,5 µg/ml diluido en Delfia Assay Buffer), y se lavaron de nuevo cuatro veces como antes. Después del lavado, se añadieron 100 µl de solución de mejora Delfia a los pocillos, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos con agitación a 200 ciclos/min y después durante 10 minutos sin agitación. La fluorescencia resuelta en el tiempo se midió utilizando un lector de placas Wallac Envision Perkin Elmer y módulos ópticos optimizados para análisis DELFIA. La actividad enzimática de sPLA2 se midió utilizando membranas de *E. coli* radiomarcadas como sustrato (Rouault, M., Le Calvez, C., Boilard, E., Surrel, F., Singer, A., Ghomashchi, F., Bezzine, S., Scarzello, S., Bollinger, J., Gelb, M.H., y Lambeau, G. (2007) Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry.*, 46:1647-1662). En resumen, se incubaron de 5 a 50 µl de productos lisados celulares o sobrenadantes durante 60 min en 300 µl de tampón de actividad sPLA2 (Tris 0,1 M, pH 8,0, CaCl₂ 10 mM y de albúmina de suero bovino al 0,1% que contenía 100.000 DPM de membranas de *E. coli* radiomarcadas con [³H]oleato. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 300 µl de tampón de parada (EDTA 0,1 M pH 8,0 y albúmina de suero bovino libre de ácidos grasos al 0,1%); las mezclas se centrifugaron a 10.000 g durante 5 minutos y se sometieron a recuento los sobrenadantes que contenían [³H]oleato liberado.

Resultados:

El inmunoanálisis de fluorescencia resuelto en el tiempo (TRFIA) se utilizó para investigar la presencia de esta enzima en células espermáticas maduras. Esta técnica es altamente sensible y permite eliminar la fluorescencia endógena no específica. Los autores de la presente invención dosificaron la presencia de mGX en espermatozoides capacitados y no capacitados y en el medio sobrenadante. La Figura 1A muestra que la fluorescencia de mGX específica aumentó en el medio sobrenadante durante la capacitación. En presencia del ionóforo de calcio A23187, un fuerte inductor de RA, el nivel de fluorescencia específica se duplicó. Mientras tanto, la actividad disminuyó en las células espermáticas. Los autores de la presente invención midieron también la actividad enzimática de sPLA2 total en células espermáticas y en el medio incubado circundante (sobrenadante) durante la capacitación (figura 1B). Los autores de la presente invención encontraron que la actividad enzimática de sPLA2 aumentó en el sobrenadante, de una manera similar a la fluorescencia específica de mGX medida por TRFIA. Estos resultados mostraron que mGX era un componente activo de la maquinaria celular y se liberaba durante la reacción acrosómica en el medio sobrenadante.

45 Ejemplo 4: Producción de sPLA2 recombinantes

Las sPLA2 de ratón recombinantes del grupo IIA, IID, IIE, V y X y el mutante de sPLA2 mGX H48Q se produjeron como se describió previamente (Rouault, M., Le Calvez, C., Boilard, E., Surrel, F., Singer, A., Ghomashchi, F., Bezzine, S., Scarzello, S., Bollinger, J., Gelb, MH, y Lambeau, G. (2007) Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry.*, 46:1647-1662). Se produjo sPLA2 Pro-mGX como sPLA2 mGX madura utilizando el vector pAB3 en el que el ADNc completo que codifica Pro-mGX se insertó en marco con la proteína ΔGST y el sitio de escisión del factor Xa, que se eliminaron de sPLA2 Pro-mGX mediante el uso de la proteasa del factor Xa (Rouault, M., Le Calvez, C., Boilard, E., Surrel, F., Singer, A., Ghomashchi, F., Bezzine, S., Scarzello, S., Bollinger, J., Gelb, MH, y Lambeau, G. (2007) Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry.*, 46:1647-1662).

Ejemplo 5: Efecto de sPLA2 sobre la reacción acrosómica

Se ha evaluado el efecto de sPLA2 sobre la reacción acrosómica (RA). Este punto fue peculiarmente importante ya que se ha planteado el papel de una PLA2 endógena durante la RA a partir de varios argumentos (véase la introducción y revisión de Roldan, E.R. y Q.X. Shi. 2007. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front Biosci.* 12:89-104.:89-104). Sin embargo, la capacidad de las diferentes sPLA2 de Mamífero para desencadenar la RA cuando se añaden al medio de cultivo no se ha sometido a ensayo hasta el momento.

Se han sometido a ensayo diversas sPLA2 que se sabe que están presentes en los fluidos biológicos que rodean las células espermáticas.

a) sPLA2 es capaz de desencadenar la RA en espermatozoides incapacitados.

5 mGIIA y mGX y, en menor medida, mGV, fueron capaces de desencadenar la RA en los espermatozoides incapacitados. (figura 2A).

Tasa de incremento de RA de 20%, correspondiente a espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica espontánea, al 60% en presencia de sPLA2 activa 200 nM. Con el fin de caracterizar mejor la potencia de tales compuestos para desencadenar la RA, se realizaron curvas de dosis-respuesta para mGX y mGIIA (Figura 2B).

10 Se ha trazado la "tasa desencadenada" de RA correspondiente a la tasa total restada de la RA espontánea. sPLA2 mGX fue un activador altamente potente de RA ya que concentraciones tan bajas como 0,2 nM indujeron alrededor de 20% de RA por encima del nivel basal espontáneo de RA. mGIIA también fue un activador muy potente de RA ya que 2 nM de enzima indujeron alrededor de 20% de RA. Las sPLA2 mGIIA y mGX fueron capaces de ese modo de inducir RA en espermatozoides incapacitados. Es importante observar que el aumento de la concentración de sPLA2 de 20 a 200 nM no produjo un aumento significativo de la tasa de espermatozoides que efectuaron reacción acrosómica. Una pequeña parte de los espermatozoides parece ser reacia a la RA inducida por sPLA2 (figura 2B).

b) sPLA2 también pudo desencadenar la RA en espermatozoides capacitados.

20 Los espermatozoides se capacitaron con BSA al 2% en medio M16, en una incubadora con CO2 al 5% a 37°C. A los 45 y 80 minutos, se introdujeron 200 nM de mGX en el medio de capacitación y los espermatozoides se fijaron 10 minutos más tarde. Las tasas de espermatozoides que efectuaron reacción acrosómica observadas en presencia de sPLA2 se compararon con los espermatozoides de control capacitados durante 55 o 90 minutos en el medio de capacitación (figura 2C). En presencia de sPLA2, la tasa total de espermatozoides que efectuaron reacción acrosómica aumentó en todas las duraciones de capacitación en comparación con las condiciones de control. Además, la diferencia entre RA espontánea y tasa total, correspondiente a la fracción inducida por sPLA2, fue estable durante el progreso de la capacitación: $\approx 39\%$, $\approx 36\%$ y $\approx 35\%$ a 10, 55 y 90 min, respectivamente. Es importante observar que una pequeña fracción de espermatozoides de alrededor de 20% era reacia a RA espontánea o RA inducida por sPLA2 incluso en presencia de un alto nivel de RA espontánea.

Ejemplo 6: Determinación del modo de acción de sPLA2

Era esencial determinar qué modo de acción de sPLA2, enzimática o mediante activación de un receptor, estaba implicado en la RA inducida por sPLA2.

30 En primer lugar, se sometió a ensayo la mGX mutada, con una sustitución de un aminoácido en el bolsillo enzimático, H48Q.

La Figura 3 muestra que la mGX mutada no fue capaz desencadenar la RA de espermatozoides incapacitados (figura 3A).

35 A continuación se sometió a ensayo Pro-mGX, la molécula precursora inactiva. A una concentración de 200 nM, pro-mGX tampoco fue capaz de desencadenar la RA en los espermatozoides incapacitados (figura 3A).

El inhibidor específico de sPLA2 LY329722 a una dosis de 1 μM bloquea la capacidad de mGX para desencadenar una reacción acrosómica (figura 3B).

Estos resultados sugieren que la actividad enzimática desempeña un papel crucial en la RA inducida por sPLA2.

40 sPLA2 son enzimas dependientes de calcio y son completamente inactivas en ausencia de calcio (Lambeau y Gelb, 2008) o en presencia de cationes divalentes inhibidores como Ni^{2+} (Yu, B. Z., J. Rogers, G. R. Nicol, K. H. Theopold, K. Seshadri, S. Vishweshwara y M. K. Jain. 1998. Catalytic significance of the specificity of divalent cations as KS^* and kcat^* cofactors for secreted phospholipase A2. *Biochemistry*. 37:12576-12587).

45 El calcio se eliminó del medio de cultivo de espermatozoides, y sPLA2, incubada a 200 nM durante 10 minutos no fue capaz de inducir RA, a diferencia de un experimento de control con Ca^{2+} 2 mM en el medio de cultivo (Figura 3C). Se obtuvo un resultado idéntico en presencia de Ni^{2+} 2 mM en el medio de cultivo (Figura 3C).

50 Los metabolitos obtenidos después de la activación de sPLA2, que son lisofosfolípidos y ácidos grasos insaturados, fueron conocidos durante décadas por activar la RA (Meizel, S. y K. O. Turner. 1983. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 161:315-318.; Fleming, A. D. and R. Yanagimachi. 1984. Evidence suggesting the importance of fatty acids and the fatty acid moieties of sperm membrane phospholipids in the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 229:485-489). A partir de los estudios realizados, la RA inducida por metabolitos de sPLA2 requirió: i) 1 o 4 horas de incubación para lisofosfolípidos y ácidos grasos insaturados respectivamente, ii) concentraciones bastante altas de metabolitos en torno a 100 μM , iii) espermatozoides capacitados para la activación por ácidos grasos.

Debido a que mGX promovió la RA a concentraciones subnanomolares en 10 min de incubación, los autores de la presente invención volvieron a someter a ensayo lisofosfolípidos y ácidos grasos insaturados en diferentes condiciones a las previamente sometidas a ensayo y más próximas a los experimentos de sPLA2: los espermatozoides se incubaron con concentraciones más bajas de alrededor de 10 μ M de lisofosfolípidos y ácidos grasos insaturados (LPC y ácido araquidónico) y durante 45 minutos durante la capacitación o 4 horas después de la mezcla de gametos.

En estas condiciones, el ácido araquidónico (ácido graso) y el LPC (lisofosfolípido) imitan la sPLA2 mGX (figura 7).

Ejemplo 7: Protocolo de fertilización *in vitro* (FIV)

Se permitió que las células espermáticas, obtenidas por trituración manual de colas de epidídimos de ratones macho OF1 nadaran en medio M2 durante 10 minutos. A continuación, las células espermáticas se transfirieron en medio M16 que contenía BSA (albúmina de suero bovino) al 2% y se incubaron durante 35 minutos para la capacitación. Después de la centrifugación, las células se transfirieron a medio M16 y, si era necesario, se incubaron con 20 o 200 nM de sPLA2 mGX durante 10 minutos. Las células espermáticas se centrifugaron (1200 rpm, 5 min) y se resuspendieron en medio M16 para eliminar sPLA2 mGX antes de utilizarlas para el experimento de fertilización *in vitro*. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 37°C. Se recogieron los óvulos de hembras OF1 maduras (6 semanas de vida) sincronizadas con 7,5 unidades de PMSG (gonadotropina de suero de yegua preñada) y 7,5 unidades de hCG (gonadotropina coriónica humana) antes de la recolección.

Se llevaron a cabo las FIV utilizando protocolos convencionales. Los óvulos se incubaron con aproximadamente 10^4 células espermáticas y los espermatozoides no unidos se lavaron después de 4 horas de incubación. Veinticuatro horas después de la fertilización, las fases de embriones de dos células (figura 4) se puntuaron como una indicación de la fertilización satisfactoria (figura 5 y 6).

Ejemplo 8: FIV con espermatozoides tratados con sPLA2 durante 10 minutos

Se realizaron las fertilizaciones *in vitro* (FIV) con espermatozoides capacitados durante 35 min en BSA al 2% y a continuación se trataron durante 10 min con mGX 20 o 200 nM. Antes de que los espermatozoides tratados se introdujeran dentro de los oocitos, los espermatozoides se lavaron y se centrifugaron para eliminar la sPLA2 con el fin de evitar los efectos de artefacto de sPLA2 sobre la fusión espermatozoide-oocito (Riffo y Parraga, 1997). El contaminante de sPLA2 en el medio de FIV estaba por debajo de 1 nM para los espermatozoides tratados a 200 nM.

a) Evaluación del número de espermatozoides con el cromosoma intacto

A mGX 200 nM, entre 70% y 80% de los espermatozoides han perdido su acrosoma.

b) Cálculo de la tasa de FIV con espermatozoides normales y tratados

Se calculó la tasa de FIV con espermatozoides normales y tratados en función del número de oocitos que alcanzaban la fase de embrión de 2 células a las 24 horas. La tasa de FIV aumentó en presencia de sPLA2 mGX de una manera dependiente de la dosis.

La tasa media de FIV aumentó de $44,0 \pm 8,9\%$ en condiciones de control a $65,4 \pm 5,6\%$ para FIV realizada con espermatozoides tratados con sPLA2 200 nM ($n = 13$ machos diferentes). Los experimentos de control y con sPLA2 se han realizado de forma simultánea y un análisis estadístico utilizando la prueba t pareada mostró que la diferencia fue altamente significativa estadísticamente ($p = 0,0002$) (figura 5A).

Ejemplo 9: Anticoncepción inducida por sPLA2 a partir del veneno animal

El uso del protocolo es el mismo que en el ejemplo 7, excepto que el uso de sPLA2 es susceptible de evitar dicha fertilización como se define anteriormente en lugar de una sPLA2 susceptible de aumentar dicha fertilización como se define anteriormente. A 20 nM y 200 nM, la sPLA2 tóxica de taipán OS2 inhibe la FIV. (figura 6).

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de fosfolipasa A2 secretada (sPLA₂) y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂, susceptible de modular la fertilización, para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de un fármaco que promueva o mejore una embriogénesis viable, o de un fármaco anticonceptivo, en donde dicho al menos un metabolito se selecciona de la lista que consiste en ácido araquidónico, ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido α -linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidato
- 10 2. El uso de fosfolipasa A2 secretada (sPLA₂) y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ de acuerdo con la reivindicación 1, susceptible de aumentar dicha fertilización para la fabricación de un fármaco antiesterilidad, o de un fármaco que promueva o mejore la fertilización, o de un fármaco que promueva o mejore una embriogénesis viable.
- 15 3. El uso de fosfolipasa A2 secretada (sPLA₂) y/o al menos un metabolito producido por dicha sPLA₂ de acuerdo con la reivindicación 2, para una hembra de Mamífero sometida a fertilización *in vitro* (FIV), procedimiento de transferencia intrafalopiana de gametos (TIFG), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE) o inseminación terapéutica de donantes (ITD), durante las tecnologías de reproducción asistida (TRA).
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde sPLA₂ presenta la propiedad de hidrolizar el éster *sn*-2 de uno o más glicerofosfolípidos con una actividad específica comprendida entre 1 μ mol/min/mg y 50 μ moles/min/mg, en particular entre 1 μ mol/min/mg y 25 μ moles/min/mg en glicero-fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos.
- 25 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha sPLA₂ es una proteína de origen Mamífero, en particular seleccionada de los grupos IIA, IIF, III, V o X de sPLA₂, más concretamente GX de ratón o GV humana o GX humana, o de origen procariótico tal como de origen bacteriano, origen vegetal o de otros orígenes incluyendo, por ejemplo, venenos de animales, en particular seleccionados entre venenos de artrópodos o serpientes, más concretamente *Apis spp*, *Oxyuranus spp* y *Daboia spp.*, o una proteína homóloga de los mismos producida como una proteína recombinante.
- 30 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en donde dichos glicero-fosfolípidos se seleccionan de la lista que consiste en: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfosserina (POPS).
- 35 7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la actividad específica de sPLA₂ frente a POPG está comprendida entre 1 y 50 μ moles/min/mg, particularmente entre 10 y 40 μ moles/min/mg, más concretamente entre 25 y 35 μ moles/min/mg, en particular 30 μ moles/min/mg,
y/o la actividad específica de sPLA₂ frente a POPC está comprendida entre 1 y 25 μ moles/min/mg, particularmente entre 5 y 15 μ moles/min/mg, más concretamente entre 5 y 10 μ moles/min/mg, en particular 7 μ moles/min/mg,
y/o la actividad específica de sPLA₂ frente a POPS está comprendida entre 1 a 50 μ moles/min/mg, particularmente de 10 a 40 μ moles/min/mg, más concretamente de 15 a 25 μ moles/min/mg, en particular 20 μ moles/min/mg.
- 40 8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha sPLA₂ está a una concentración de 0,2 nM a 200 nM, preferiblemente de 0,2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 0,2 a 2 nM, más preferiblemente de 2 nM a 200 nM, más preferiblemente de 2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 20 nM a 200 nM, en particular 200 nM.
- 45 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho metabolito está a una concentración comprendida entre 0,1 μ M y 50 μ M, preferiblemente entre 1 μ M y 50 μ M, más preferiblemente entre 1 μ M y 10 μ M, en particular 10 μ M.
10. El uso de fosfolipasa A2 secretada (sPLA₂) de acuerdo con la reivindicación 1, susceptibles de evitar dicha fertilización para la fabricación de un fármaco anticonceptivo.
- 50 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde sPLA₂ presenta la propiedad de hidrolizar el éster *sn*-2 de uno o más glicerofosfolípidos con una actividad específica superior a 25 μ moles/min/mg, en particular superior a 50 μ moles/min/mg sobre fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos.
12. El uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde dichos glicerofosfolípidos se seleccionan de la lista que consiste en: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (POPG), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfosserina (POPS).
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la actividad específica frente a POPC es superior a 25 μ moles/min/mg, en particular mayor o igual a 30 μ moles/min/mg.

14. El uso de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la actividad específica frente a POPC es superior a 25 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular 30 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, y/o la actividad específica de sPLA2 frente a POPG es superior a 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular $>250 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, y/o la actividad específica de sPLA2 frente a POPS es superior a 50 $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, en particular $>250 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$.
- 5 15. La sPLA2 como se define en la reivindicación 1 a 9, para su uso en el tratamiento de la esterilidad o para su uso en la promoción o mejora de la fertilización o para su uso en la promoción o mejora de la embriogénesis viable de un Mamífero hembra, en particular un Mamífero sometido a fertilización *in vitro* (FIV), procedimiento de transferencia intrafalopiana de gametos (TIFG), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE) o inseminación terapéutica de donantes (ITD) durante las tecnologías de reproducción asistida (TRA).
- 10 16. La sPLA2 como se define en la reivindicación 1 o 10, para su uso en la anticoncepción de Mamíferos.
17. Un procedimiento de selección *in vitro* de espermatozoos que comprende las siguientes etapas:
- a. tratar los espermatozoides a la concentración de 1 millón de células/ml, previamente recogidos, con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5-2% o cualquier compuesto que se una a colesterol para obtener espermatozoides capacitados,
- 15 b. incubar espermatozoides capacitados a la concentración de 1 millón de células/ml con sPLA2 que tiene una actividad específica como se define en la reivindicación 7, a una concentración de 0,2 nM a 200 nM, preferiblemente de 0,2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 0,2 a 2 nM, más preferiblemente de 2 nM a 200 nM, más preferiblemente de 2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 20 nM a 200 nM, en particular 200 nM, y/o metabolitos de sPLA, como se define en la reivindicación 9 a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 50 μM , preferiblemente de 1 μM a 50 μM , más preferiblemente de 1 μM a 10 μM , en particular 10 μM , para obtener una mezcla de espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica y espermatozoides que no han efectuado reacción acrosómica,
- 20 c. aislar los espermatozoides que no han efectuado reacción acrosómica después de lavar y centrifugar y descartar los espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica.
- 25 18. Un procedimiento fertilización *in vitro* que comprende las siguientes etapas:
- a. tratar los espermatozoides a la concentración de 1 millón de células/ml, previamente recogidos, con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5-2% o cualquier compuesto que se una a colesterol para obtener espermatozoides capacitados,
- 30 b. incubar los espermatozoides capacitados a la concentración de 1 millón de células/ml con sPLA2 que tiene una actividad específica como se define en la reivindicación 7, a una concentración de 0,2 nM a 200 nM, preferiblemente de 0,2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 0,2 a 2 nM, más preferiblemente de 2 nM a 200 nM, más preferiblemente de 2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 20 nM a 200 nM, en particular 200 nM, y/o metabolitos de sPLA, como se define en la reivindicación 9, a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 50 μM , preferiblemente de 1 μM a 50 μM , más preferiblemente de 1 μM a 10 μM , en particular 10 μM , para obtener una mezcla de espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica y espermatozoides que no han efectuado reacción acrosómica,
- 35 c. poner en contacto dichos espermatozoides que no han efectuado reacción acrosómica a una concentración de 50000/ml, después de lavar y centrifugar, con 20 a 100 oocitos recogidos previamente.
19. Un procedimiento de predicción de la fertilidad en un Mamífero que comprende las siguientes etapas:
- 40 a. tratar los espermatozoides a la concentración de 1 millón de células/ml, previamente recogidos, con albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5-2% o cualquier compuesto que se una a colesterol para obtener espermatozoides capacitados,
- 45 b. incubar los espermatozoides capacitados a la concentración de 1 millón de células/ml con sPLA2 que tiene una actividad específica como se define en la reivindicación 7, a una concentración de 0,2 nM a 200 nM, preferiblemente de 0,2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 0,2 a 2 nM, más preferiblemente de 2 nM a 200 nM, más preferiblemente de 2 nM a 20 nM, más preferiblemente de 20 nM a 200 nM, en particular 200 nM, y/o metabolitos de sPLA, como se define en la reivindicación 9, a una concentración comprendida entre 0,1 μM y 50 μM , preferiblemente de 1 μM a 50 μM , más preferiblemente de 1 μM a 10 μM , en particular 10 μM , para obtener una mezcla de espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica y espermatozoides que no han efectuado reacción acrosómica,
- 50 c. determinar la cantidad de espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica y compararla con la cantidad de espermatozoides que efectuaron reacción acrosómica obtenidos con un Mamífero de control,

d. pronosticar que el Mamífero es infértil si la cantidad de espermatozoides que han efectuado reacción acrosómica determinada anteriormente en la etapa c. es mayor que la cantidad obtenida con dicho Mamífero de control.

- 5 20. Un procedimiento de anticoncepción *in vitro* que comprende una etapa en la que se ponen en contacto espermatozoides de Mamífero previamente recogidos con sPLA2 que tiene una actividad específica como se define en la reivindicación 13, siempre que se excluya la implementación de dicho procedimiento en la esfera privada de seres humanos.

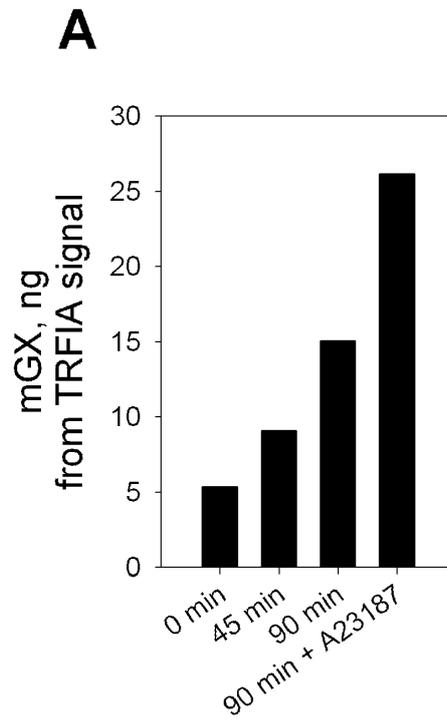


Figura 1

B

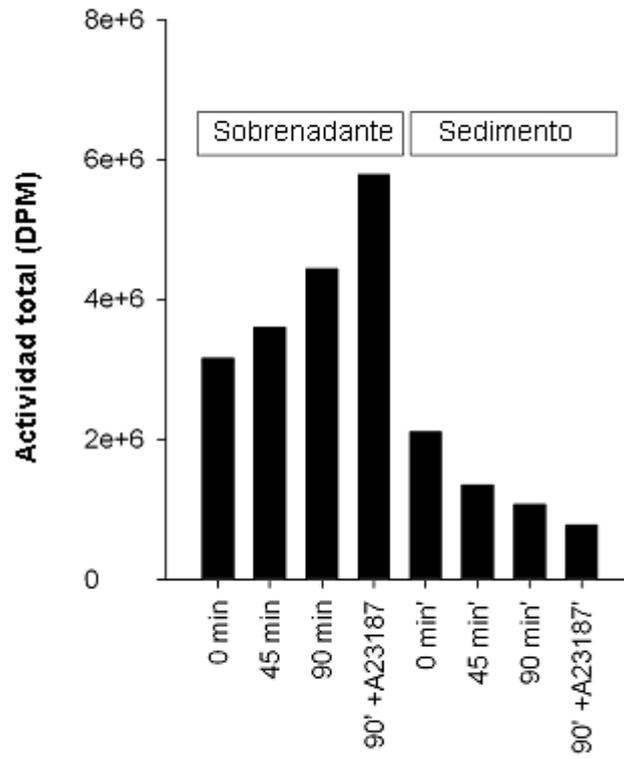


Figura 1 continuación

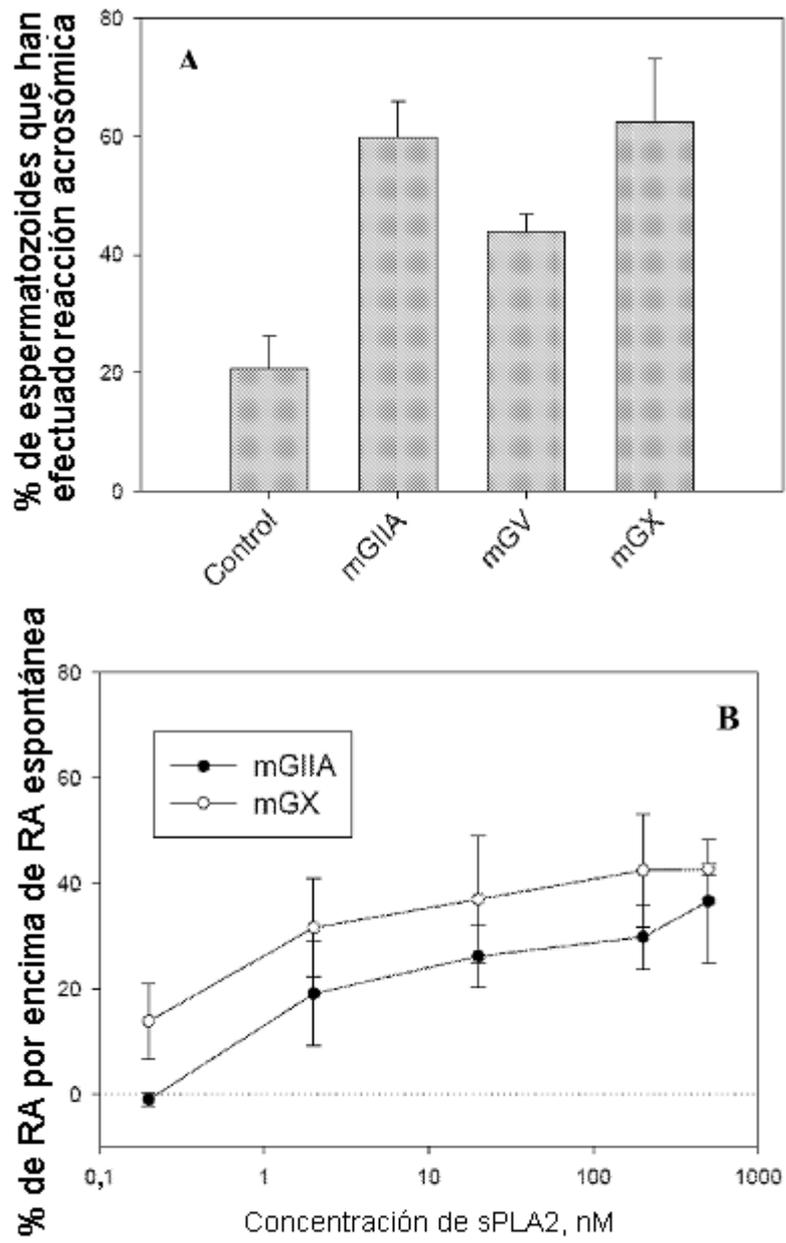


Figura 2

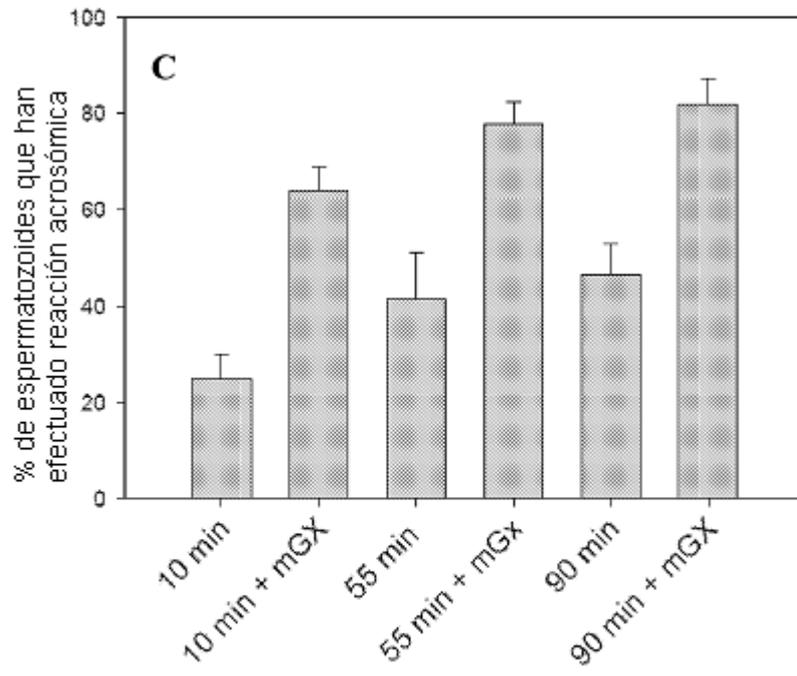


Figura 2 continuación

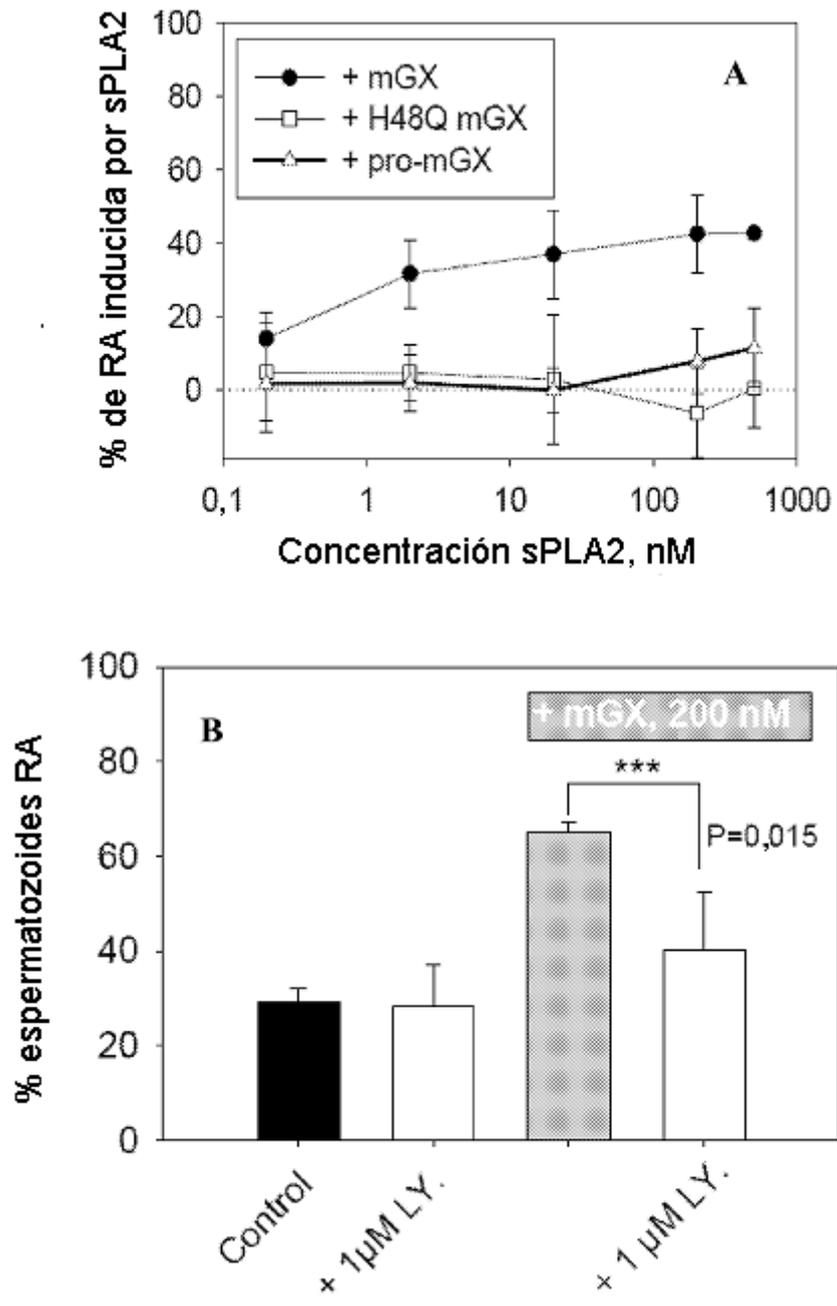


Figura 3

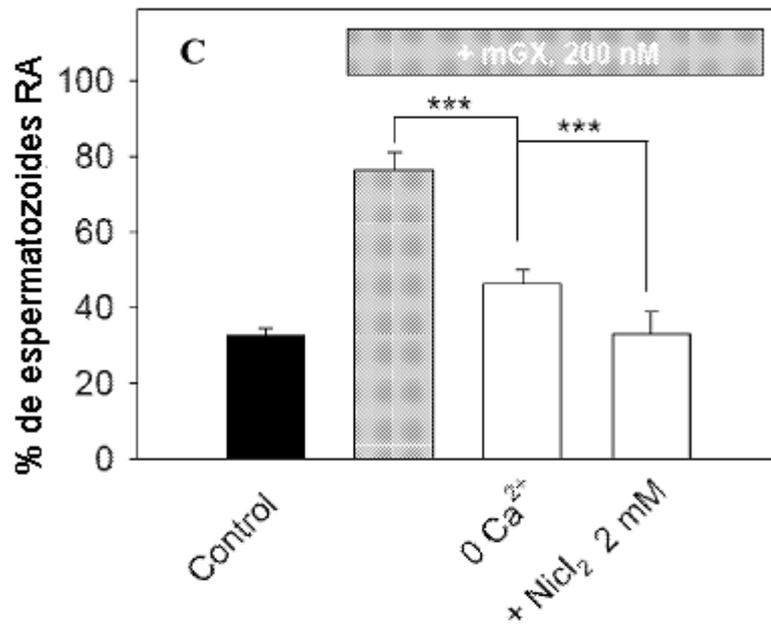
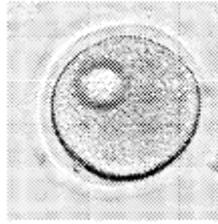
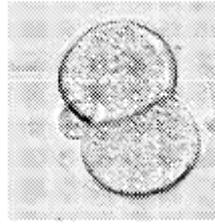


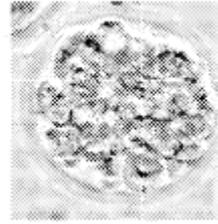
Figura 3 continuación



Óvulo no fertilizado



Embrión de 2 células



Embrión muerto

Figura 4

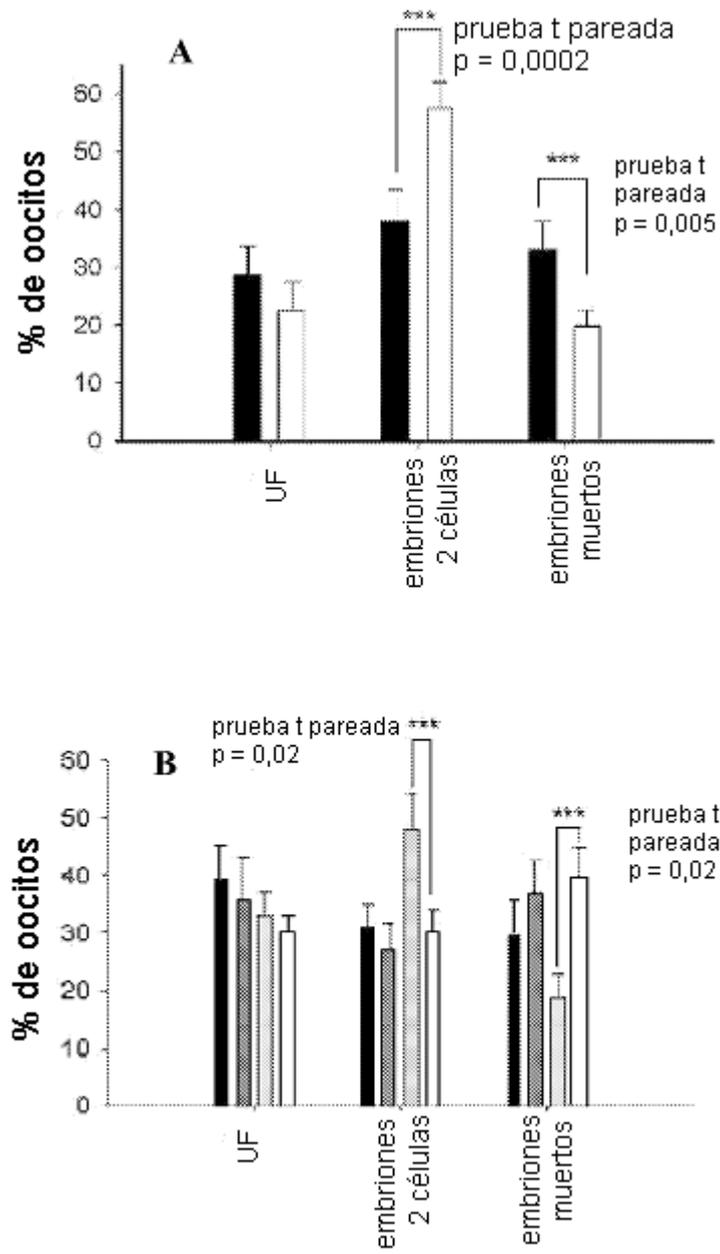


Figura 5

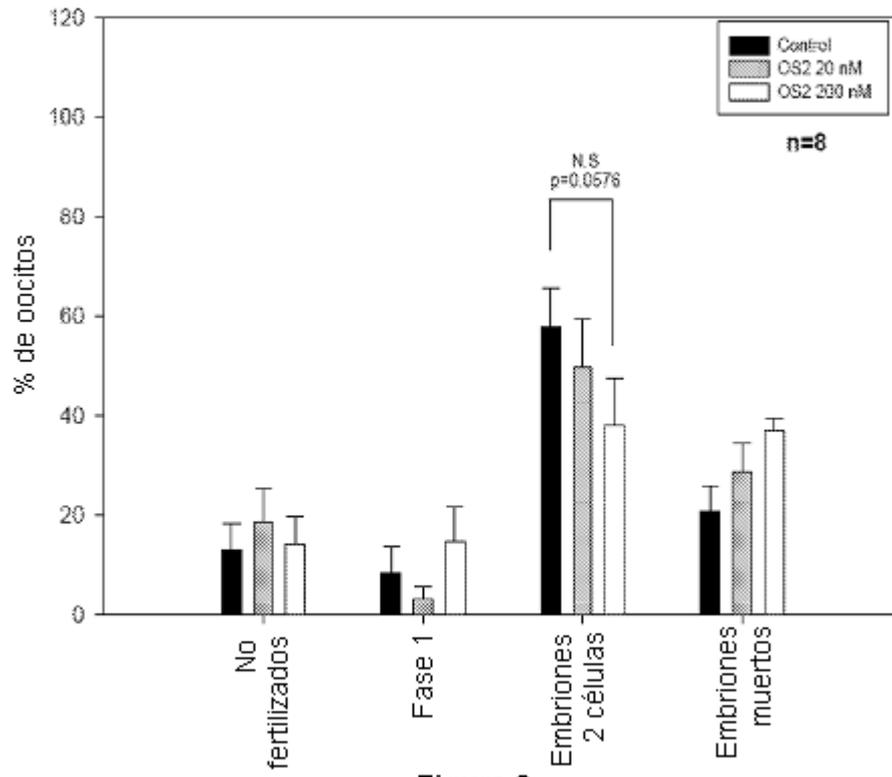


Figura 6

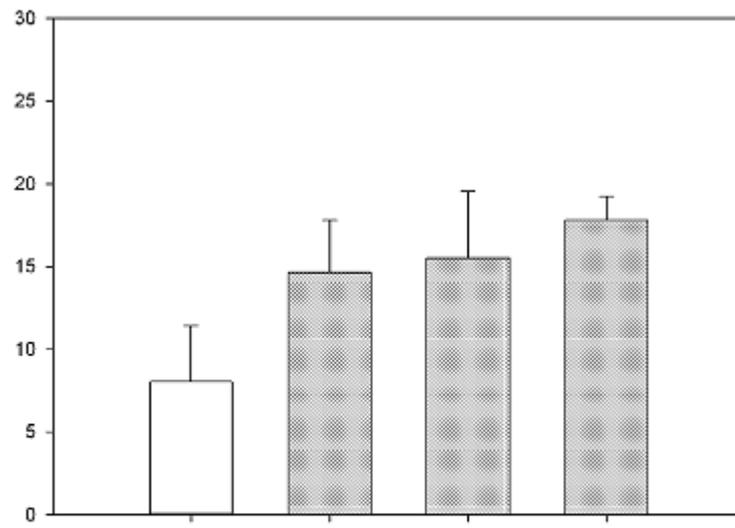


Figura 7

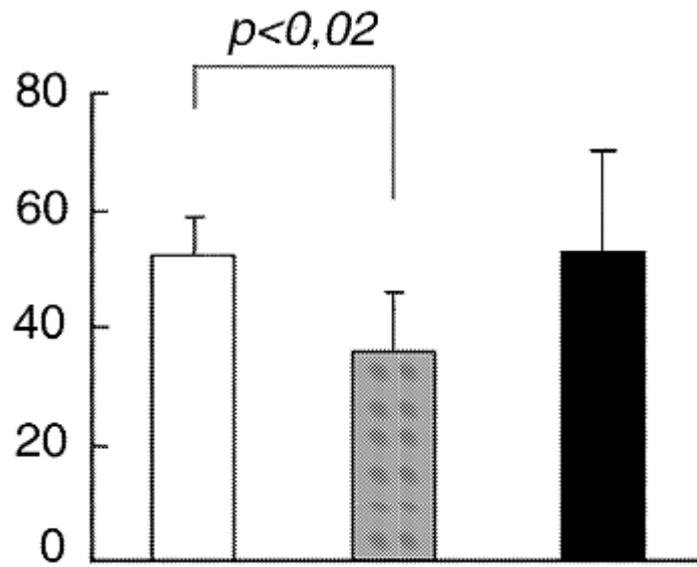


Figura 8