(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 717 787**

(21) Número de solicitud: 201731461

(51) Int. CI.:

A61P 15/00 (2006.01)
A61K 33/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

22.12.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

25.06.2019

(71) Solicitantes:

CENTRO MÉDICO GINFER, S.L.P. (100.0%)
CORONA DE ARAGÓN 40
50009 ZARAGOZA ES

(72) Inventor/es:

FERNÁNDEZ SAINZ, Ana Pilar

(74) Agente/Representante:

AZAGRA SAEZ, María Pilar

(54) Título: **USO DE OZONO PARA AUMENTAR LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN EL ENDOMETRIO HUMANO**

(57) Resumen:

Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, dirigido a mujeres que van a realizar una transferencia de embriones en diferido, que comprende las siguientes fases:

- Fase 1: inclusión, recogida y aplicación, consistente en una toma de muestra biológica de la mujer receptora.
- Fase 2: estudio de la muestra:
- Fase 2.1: estudio previo a la aplicación del ozono, de las células del sistema inmune y la fase plasmática,
- Fase 2.2: preparación de la transferencia a la mujer receptora de embriones mediante la aplicación de ozono medicinal,
- Fase 2.3: en caso de que la prueba de embarazo sea negativa, recogida de flujo menstrual post tratamiento con ozono de la mujer receptora, y análisis de los parámetros estudiados antes de la ozonización.
- Fase 2.4: estudio posterior a la aplicación de ozono de la donante.

ES 2 717 787 A1

DESCRIPCIÓN

Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano

Objeto de la invención

El objetivo del presente uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano que se propugna, es conseguir una mayor tasa de implantación mediante la acción moduladora del ozono en el sistema inmune en mujeres con fallos de implantación y abortos repetidos, mediante el control y regulación de las células uNK (uterine Natural Killers – asesinas naturales uterinas) y las citoquinas deciduales del útero.

El presente uso del ozono se encuadra en el campo técnico destinado a incrementar la fertilidad en mujeres con fallos de implantación.

Antecedentes de la invención

El reconocimiento de la infertilidad como un problema de salud mundial está latente cada día, por ello el número de parejas que buscan asesoría médica y tratamiento aumenta considerablemente. Cada vez son más habituales los casos en los cuales después de un tratamiento de reproducción asistida, la mujer no logra el embarazo después de varios intentos fallidos o logra el embarazo sin llegar a término.

Las causas que pueden conllevar a estas elevadas estadísticas son múltiples y muy variadas. Aproximadamente en un 40 % de los casos la causa es de etiología masculina y en otro 40 % femenina, y el 20 % restante, a pesar de los más recientes avances obtenidos en el diagnóstico y seguimiento de la infertilidad, no puede identificarse dentro de ninguna etiología (Boivin J et al., 2007). Estas incógnitas en el estudio de la infertilidad representan un reto para las ciencias médicas.

Tipo de infertilidad de causa desconocida y pérdidas post-embarazo.

INFERTILIDAD DE ORIGEN DESCONOCIDO	PROBLEMAS POST EMBARAZO
Intentos fallidos de técnicas de reproducción	Abortos recurrentes
Antecedentes hematológicos	Partos prematuros
Causas inmunológicas	Muerte fetal
Fallos de implantación	Preeclampsia

Se sabe que las células del sistema inmune participan en esta dinámica de regulación reproductiva. La evidencia experimental señala una comunicación tridireccional (eje neuro-inmuno-endocrino) a través de mediadores solubles inmunológicos, hormonales y neuromoduladores. La complejidad de esta relación de acción y control a múltiples niveles del aparato reproductor humano, está siendo foco actualmente de diversas investigaciones, pero continúan sin aclararse numerosas incógnitas. Muchos mecanismos de regulación neuroinmunoendocrina, así como la influencia de otros factores exógenos o disruptores endocrinos, permanecen sin ser precisados.

En los seres humanos, la mayoría de las pérdidas de embarazo, ocurren antes o durante el proceso de implantación del pre-embrión, puesto que el factor primordial para el éxito de RNV (Recién Nacido Vivo) sigue siendo la implantación de los pre-embriones (Lédée N et al., 2016).

La receptividad endometrial es un factor limitante clave para lograr la implantación, y que puede llevar a un fracaso después de la realización de TRA (Técnicas de Reproducción Asistida), o causa de abortos recurrentes (Fox et al., 2016). El sistema inmune es esencial para establecer una correcta receptividad endometrial e iniciar el embarazo, orquestando una serie de modificaciones uterinas (Van Mourik et al., 2009; Sarah A. et al., 2016):

- Modulación de la respuesta de las células inmunitarias
- Acceso y fijación del pre-embrión
- Invasión del trofoblasto para comenzar la morfogénesis placentaria
- Adaptación vascular
- Tolerancia inmunitaria
- Equilibrio de citoquinas

Por otro lado, las células uNK son las células inmunes dominantes en la mucosa uterina y representan el 30% de las células del estroma en el endometrio en fase de secreción tardía en humanos (Bulmer and Lash, 2005) y hasta el 70% de los leucocitos en el endometrio secretor durante el primer trimestre del embarazo. Existe una fuerte evidencia de que el papel primario de las uNK consiste en regular la placentación temprana, ya que se diferencian y proliferan durante la ventana de implantación poblando la decidua inmediatamente adyacente al

EVT (Trofoblasto Extravagante Infiltrante) y alrededor de las arteriolas espirales durante el comienzo del embarazo (Xiong et al., 2013 ; Scott J. Morin et al., 2016).

A su vez segregan una serie de factores que intervienen en la remodelación vascular y la angiogénesis al encontrarse con el EVT invasor poco después de la implantación. Estas células no solo se expresan al comienzo del embarazo, sino que son predominantes en el endometrio no embarazado, aumentando y cambiando su morfología durante la fase secretora del ciclo menstrual. La prolactina y la IL-15 derivada del endometrio promueven la estimulación y diferenciación de las células uNK.

Además, la presencia de edema, la profundidad del epitelio superficial y la localización en el útero pueden afectar a los valores de uNK. Incluso sin estos problemas, no hay razón para correlacionar los números de uNK presentes antes del embarazo con ninguna función perjudicial o benéfica.

El reconocimiento inmunológico del embarazo es imprescindible para el mantenimiento de la gestación y también para la modulación de trastornos comunes del embarazo. La homeostasis de los tejidos que forman parte del tracto genital femenino se ve afectada por la infección, el daño, la inflamación etc. producidos durante el proceso de implantación durante los ciclos reproductivos. La intensidad de dicha respuesta inflamatoria refleja el equilibrio existente entre el peligro generado y el sistema inmune (Sheldon et al., 2016).

La citoquina principal que regula la maduración de las uNK es la IL-15. Es una interleucina caracterizada como factor de crecimiento de células T. La síntesis de IL-15 se ha detectado en la zona útero-placental (Barber et al., 2003), requiriéndose de ella para el desarrollo, activación y maduración de las uNK. Cuando el pre-embrión se pone en contacto con el endometrio, las células endometriales segregan IL-15 que transforma las NK (Natural Killer – asesinas naturales) endometriales en NK deciduales, estas cambian haciéndose menos tóxicas y segregando citoquinas y otras sustancias que son las que contribuyen a la implantación y el mantenimiento del embarazo, ya que su función es la formación de nuevos vasos gracias a la liberación de la interleucina IL-8, encargada de migrar al lugar de la infección y atraer a otras células, como los neutrófilos que ayudan a eliminar gran parte de la Infección (Barber et al., 2003), pero no es suficiente, ya que tienen una vida media muy corta y solo evita la toxicidad del tejido (Guleri et al., 2001), el factor vascular de crecimiento, el factor-1 derivado de células del estroma e IFN-γ, inductor de proteína-10.

Es más que conocido tanto el mecanismo como la morfología de las NK en sangre, sin embargo esta información sigue siendo escasa en el caso de las uNK. Diferentes autores investigan referente al problema del desconocimiento de un buen perfil inmunológico uterino, ya que contar con pre-embriones de buena calidad es una necesidad absoluta para lograr un RNV, sin embargo no es suficiente, también es esencial un útero receptivo durante su transferencia y para ello es necesario un tratamiento personalizado que permita un efecto positivo en el lado uterino a través de la normalización del perfil inmunológico (Lédée N et al., 2016).

Son muchos y muy variados los argumentos que se rebaten respecto a qué efecto puede desencadenar el fallo inmunológico. Se ha planteado una posible desregulación en el número de NK uterinas, tanto un déficit como un exceso. El porcentaje de células NK CD56 + en sangre en individuos sanos varía enormemente y los valores se fijan arbitrariamente, a ello hay que añadir que las células uNK difieren de las células NK sanguíneas y cualquier parámetro medido a partir de un análisis de sangre no puede reflejar sus capacidades funcionales (Seshadri and Sunkara, 2014). Al ser incorrecto establecer una relación con NK sanguíneas, algunos estudios se centran más en la expresión de la IL-15, ya que está implicada en la maduración de las uNK y en un aumento de la concentración de las mismas después de la ovulación debido a la proliferación desencadenada por la inducción de IL-15 mediada por progesterona en las células estromales (Wilkens et al., 2013).

Una desregularización de la expresión de la interleucina IL-15 está siendo una posible causa en aquellos casos de infertilidad (Kitaya et al., 2005, Costanza et al., 2016) ya que las uNK requieren de IL-15 para su desarrollo (Barber et al., 2003). Otros estudios incluyen en el estudio una batería de citoquinas como las responsables, la IL-12, IL-15 e IL-18, ya que la expresión desregulada de las mismas presenta niveles anómalos de células uNK en el endometrio de mujeres con fallos de implantación recurrentes, reportando que una desregulación inmune puede afectar al proceso de implantación en más del 80% de los casos (Lédée N et al., 2016; Lédée N et al., 2017). Dicha investigación no solo analiza la expresión de dichas citoquinas, sino que profundiza en su comportamiento y cómo ello puede modificar el ambiente uterino.

En diversos estudios se ha demostrado un incremento de células NK CD56 (brillante) CD16+ en pacientes con aborto recurrente de causa desconocida (Makida R et al., 1991; Keelan et al., 2003; Rai R et al., 2005). El origen de las células NK CD56 (brillante) CD16+, se piensa que provienen de la sangre materna; sin embargo, independientemente de su origen, se sabe que su existencia en el endometrio es indeseable y nociva para la implantación pre-embrionaria, ya que estas células normalmente no se observan en úteros de mujeres fértiles (López Navarrete et al., 2013), por lo tanto, la presencia de estas células en la placenta pretérmino podría ser uno de los iniciadores del parto prematuro (Gomaa et al., 2016).

Según lo publicado por diferentes grupos de investigación, en función del fenotipo de las uNK queda plasmada su actividad dentro de la decidua uterina:

- Se encuentran activas en forma CD56 (brillante) CD16-, sin presentar actividad citotóxica y en la concentración adecuada, por lo que se prevé conducirán a desenlace positivo y con un embarazo a término.
- Se encuentran activas en forma CD56 (brillante) CD16-, pero no en la concentración adecuada como consecuencia en un desequilibrio en la IL-15 y por ello un agotamiento en la uNK dando lugar células endoteliales hinchadas y lúmenes estrechos, decidua con células acelulares, edema y por lo tanto fallo en la implantación (Barber et al., 2003).
- Se encuentran activas en forma CD56 (brillante) CD16+, presentando una activación del antígeno de superficie CD16 posibilitando la destrucción de las células placentarias y de las células fetales, ya que generan grandes cantidades de TNF- α, y es frecuente que estén elevadas en mujeres con infertilidad y aborto recurrente (Ntrivalas E et al., 2001).

Con todo lo expuesto anteriormente, es más que evidente que las células del sistema inmune son claves en el proceso reproductivo para establecer una correcta receptividad endometrial e iniciar el embarazo (van Mourik et al., 2009; Sarah A. et al., 2016). El número de células NK alteradas y la actividad mediada por citoquinas se ha asociado con una variedad de condiciones clínicas tales como endometriosis, abortos recurrentes y preeclampsia entre otros (Mikael E et al., 2016).

La única propuesta aportada hasta el momento por diferentes autores es la utilización de corticoides en caso de tener un problema de fertilidad de causa desconocida posiblemente atribuible a una causa inmunológica, sin embargo la justificación para utilizar corticosteroides en las mujeres sin disfunción inmune específica es dudosa. Hasta la fecha, no hay ninguna clínica bien controlada (Sarah A. et al., 2016), incluso existe preocupación por los posibles efectos adversos en el desarrollo fetal (Motteram et al., 2015).

Es evidente que la inflamación residual y las infecciones pueden tener consecuencias devastadoras para la fertilidad de la mujer. Muchas alternativas terapéuticas se han esbozado con mediano éxito para la erradicación del patógeno y del ambiente inflamatorio que se genera de manera secundaria.

Por otro lado, en el uso médico se utiliza una mezcla de oxígeno y ozono (O3), también denominada ozono médico. En el ozono médico, el ozono se encuentra presente en concentraciones (1 a 50 µg/mililitro de oxígeno) 30 veces inferiores al usado industrialmente. Las concentraciones superiores a 2 µg/l. son tóxicas por vía inhalatoria. La poca efectividad sistémica de las concentraciones menores de esta cifra y el alto riesgo de complicaciones llevó al desuso de la vía inhalatoria. Las concentraciones superiores a 100 µg/ml. son tóxicas por vía parenteral, aumentando las posibles complicaciones según aumenta la concentración.

Hasta el momento, en el campo ginecológico, el ozono es utilizado como ayuda en el tratamiento de infecciones del trato urinario ya que puede inactivar bacterias, virus, hongos, levaduras y protozoos. Es cada vez más común el uso en pacientes con diversas infecciones genito-urinarias con combinaciones de clamidiasis, micoplasmosis, ureaplasmosis, gardnerellesis, toxoplasmosis, herpes simple e infecciones por citomegalovirus. En más del 90% de los casos, la ozonoterapia en las concentraciones adecuadas, tiene un buen efecto curativo sobre las bacterias, Chlamydia, Micoplasma, Ureaplasma, Gardnerella y el efecto parcial sobre los virus y toxoplasmosis. Los síntomas de vaginitis se eliminan, así como es coadyuvante en los dolores pre-menstruales (Rajani, 2011) sin ningún tipo de efectos secundarios.

Dentro del estado de la técnica, se sitúa la patente ES2345571 por Ensayo y dispositivo para predecir el éxito de un implante en fertilización asistida, donde se prevé para determinar el potencial de implantación de una pluralidad de embriones, cada uno obtenido o que va a obtenerse por fecundación asistida de un oocito, que comprende medir los niveles de G-CSF en el líquido folicular presente en el folículo del que deriva cada oocito y determinar el potencial de implantación de cada embrión a partir del nivel de G-CSF del líquido folicular. El oocito del folículo con el nivel mayor de G-CSF en el líquido folicular da lugar a un embrión con el mayor potencial de implantación.

Al igual que, en la patente ES2485847 por Método de diagnóstico para la receptividad endometrial, se prevé proporcionar un biomarcador específico (prostaglandina E2 (PGE2)) y fiable para la detección de la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una mujer, o para evaluar si está en condiciones adecuadas para la recepción y la Implantación de un embrión, o para vigilar la maduración endometrial, o un método de fertilización in vitro.

En ninguno de los dos últimos documentos de patente citados se menciona como elemento de uso para el ensayo y aplicación el ozono (O3).

Descripción detallada de la invención

El reconocimiento inmunológico del embarazo es imprescindible para el mantenimiento de la gestación y también para la modulación de trastornos comunes del embarazo.

La homeostasis de los tejidos que forman parte del tracto genital femenino se ve afectada por la infección, el daño, la inflamación etc. producidos durante el proceso de implantación durante los ciclos reproductivos. La intensidad de dicha respuesta inflamatoria refleja el equilibrio existente entre el peligro generado y el sistema inmune.

La citoquina principal que liberan las NK es el IFN-y (inteferón gamma), que activa al macrófago y produce la liberación por parte de este de IL-12. La interleucina IL-12 activa las células Th1 (Células T colaboradoras de tipo 1) y estimula la producción y citotoxicidad de las células T citotóxicas y de las células NK.

A su vez, la IL-12 y el TNF- (Factor de necrosis tumoral) provocan que las NK secreten grandes cantidades de IFN-y, con lo que se mantienen controlados a ciertos patógenos intracelulares hasta que se activen las células T.

La secreción de IL-12 por parte del macrófago y de IFN-y por las NK crea un sistema de retroalimentación positiva que aumenta el grado de activación de ambos tipos de células, dentro de un tejido infectado.

En la búsqueda por aportar una solución o al menos ayudar a esclarecer donde está la correlación entre sistema inmune e infertilidad, el nuevo uso del ozono objeto de la actual invención, emplea una nueva técnica no invasiva y rápida. Para ello, se presenta el desarrollo de una molécula que disminuye el entorno inflamatorio, que puede aplicarse de forma directa en el útero sin afectar al resto de tejidos, tiene una acción rápida, indolora y que es capaz de modificar el ambiente uterino modulando la acción de las citoquinas que actúan en la regulación de las uNK.

Para poder alcanzar cada uno de los puntos citados anteriormente, el uso del ozono que se propugna evalúa la acción del ozono en el útero de mujeres con problemas desconocidos de fertilidad causados por fallos en el sistema inmunológico.

En estos casos existe un factor de inflamación, y el ozono es capaz de generar una serie de mensajeros capaces de suprimir dicha inflamación. Optimiza el mecanismo de regeneración del tejido, y estimula la producción de granulación y epitelización por lo que mejora el metabolismo local.

Para comprender mejor el objeto de la invención y su aplicación, se define a continuación los procesos seguidos desde el diseño de estudio y las diferentes fases de las que consta su uso:

Diseño del Estudio

A. Población y Criterios de Selección:

El presente uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio femenino humano, está dirigido en particular a mujeres que acuden a la unidad de reproducción que previamente se han sometido a, al menos a un ciclo de FIV (Fecundación In Vitro) con ovocitos propios o con donación de ovocitos, sin lograr RNV y van a realizar una transferencia en diferido, bien de embriones vitrificados propios o de embriones donados.

- Edad comprendida entre 18 y 40 años
- IMC (Índice de Masa Corporal) <18 o >32 kg/m2
- Serologías vigentes (realizadas con menos de 6 meses de antelación) con batería de análisis completa
- Analítica inmunológica previa al tratamiento, cuantificación de NK en sangre, IL-12, IL-15 e IL-18

En el/los ciclo/s anteriores la mujer ha sufrido

- Fallos repetidos de implantación (al menos dos transferencias o criotransferencias fallidas)
- Sospecha de factor uterino comprometido
- Abortos repetidos (al menos dos abortos)
- Embarazos bioquímicos (al menos dos pruebas de embarazo entre 10-20 mUI/ml en sangre)

Se excluyeron las parejas con antecedentes genéticos

Donantes de ovocitos en la unidad de reproducción

- Edad comprendida entre 18 y 35 años y disponer de plena capacidad para obrar
- IMC <18 o >32 kg/m2
- Valoración psicológica y ginecológica positiva

- Serologías vigentes (realizadas con menos de 6 meses de antelación) con batería de análisis completa.
- Sin antecedentes familiares hereditarios, psicológicos/psiquiátricos
- Reserva ovárica normal, RFA (Recuento de Folículos Antrales) entre los dos ovarios ≥10
- Hayan dado embarazo en ciclos de ovodonación

B. Grupos de estudio

Se analizaron dos grupos de estudio:

Grupo problema: formado por las mujeres receptoras que cumplen los criterios de selección indicados en el apartado de población.

Mujeres receptoras sobre las que se van a realizar la criotransferencia con embriones propios, (a partir de ahora denominadas grupo A), con tratamiento y control en:

1. Estimulación ovárica de la mujer para ciclo de ICSI (Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides)
2. Vitrificación de los embriones en D+3 o D+5
3. Menstruación (ciclo de preparación para la transferencia)
4. Recolección de la muestra de estudio
5. Preparación del endometrio para la transferencia de embriones
6. Controles ecográficos y medida de crecimiento endometrial
7. Ozonización
8. Transferencia embrionaria

Mujeres receptoras sobre las se que van a realizar la criotransferencia con embriones donados, (a partir de ahora denominadas grupo B) con tratamiento y control en:

1. Menstruación
2. Recolección de la muestra de estudio
3. Preparación del endometrio para la transferencia de embriones
4. Controles ecográficos y medida de crecimiento endometrial
5. Ozonización
6. Transferencia embrionaria

Grupo control: formado por donantes que previamente han dado embarazo en ciclos de ovodonación. Las donantes al no finalizar el proceso con una transferencia embrionaria, únicamente se aplica ozono sin pauta de medicación, sin embargo se obtendrá muestra de flujo menstrual post ozono, con tratamiento y control en:

1. Menstruación
2. Recolección de la muestra de estudio
3. Controles ecográficos y medida de crecimiento endometrial
4. Ozonización
5. Recolección de la muestra de estudio post ozono

C. Recogida de muestras biológicas

Se toma muestra de sangre menstrual tanto de mujeres receptoras del grupo A como del B, como de donantes para el estudio del grupo problema y del grupo control que será recogida durante, los primeros días de ciclo tras la menstruación, por ejemplo el 2º o 3º día, utilizando cualquier medio conocido como una copa menstrual. Las muestras se recogerán de la menstruación previa al uso del ozono (O3) y post uso con ozono (únicamente en el grupo control y en las mujeres con prueba Bhcg -Hormona Gonadotropina Coriónica- negativa).

Diferentes estudios muestran como la sangre menstrual es una grandísima fuente de MenSCs (células madre mesenquimales endometriales), dichas células pueden aislarse basándose en sus fuertes propiedades de adherencia.

La sangre menstrual una vez obtenida, se lleva a un centro de reproducción donde se transfiere a un bote esterilizado con PBS (Solución salina tamponada con fosfato) para su posterior procesado.

D. Metodología. Fases del proyecto

Se parte de una muestra biológica, siendo esta muestra biológica flujo menstrual

Fase 1: Inclusión, recogida y tratamiento de la muestra

Fase 2: Estudio de la muestra

FASE 2.1: Estudio pre aplicación del ozono de las mujeres receptoras del grupo A, B y donantes
FASE 2.2: Preparación de la transferencia a las mujeres receptoras del grupo A y B,
FASE 2.3: Estudio post aplicación del ozono de las mujeres receptoras del grupo A y B (Bhcg -),

FASE 2.4: Estudio post aplicación del ozono de la donante.

Donde,

Fase 1.
Inclusión en el proyecto, recogida y tratamiento de la muestra.

Se recoge una muestra al 2º o 3º día de ciclo tras la menstruación tal y como se indica en el apartado de "recogida de muestra biológicas". Una vez recogida la muestra, sin exceder en 24h su recepción en laboratorio, se procederá a separar las diferentes fases (entendiéndose por estas fases como los diferentes componentes en la solución química de la muestra biológica) de interés dentro del flujo menstrual mediante la técnica de Ficoll (técnica de centrifugación por gradientes de densidad para separar los diferentes tipos celulares).

Las fases de interés de la muestra biológica serán el plasma y la fase de células inmunológicas.

Fase 2.
Se realiza un estudio en paralelo en laboratorio y en los grupos de estudio (mujeres receptoras grupos A y B, y donantes).

En el caso del grupo estudio formado por las mujeres receptoras grupos A y B:

Fase 2.1
En esta fase la mujer receptora no ha recibido la ozonización, es decir, se realiza un estudio previo a la aplicación del ozono. Una vez obtenida las fases de interés previa separación con Ficoll, se analiza por separado la fase que contiene las células del sistema inmune de la fase plasmática.

-En la fase que contiene las células NK (anillo de células inmunológicas):
Se cuantifica mediante citometría de flujo la concentración de NK presentes en la decidua uterina, así como la presencia de CD56 y CD16 en la membrana de las NK uterinas.

-En la fase plasmática:
Se cuantifica las diferentes interleucinas y factores de crecimiento implicados en la regulación de las uNK, mediante la utilización de técnicas inmucitoquímicas como son las técnicas de Elisa o los novedosos paneles multiplex, extremadamente sensibles:

- IL-1 α y IL-1 β
- IL-2
- IL-6
- IL-12
- IL-15
- IL-18
- TGF- α (Factor de crecimiento epidérmico) proliferación de tejidos epiteliales embrionarios
- TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) citoquina importante que modifica la respuesta inmune y que es principalmente por macrófagos activados. Como la IL-1, el TNF-α induce la expresión de otros factores de crecimiento del autócrinos, aumenta sensibilidad celular a factores de crecimiento e induce vías de señalización que llevan a la proliferación celular.
- TNF- β (Factor de necrosis tumoral beta) desarrolla una acción pro-inflamatoria tanto por sí mismo como a través de la regulación de otros mediadores inflamatorios, como las interleucinas 1 y 6.
- IFN- γ (Interferón gamma) citoquina producida por los linfocitos T y NK. Activa a las células dendríticas, los macrófagos y las NK; para inducir mayor secreción de IL-12, la cual promueve más diferenciación a Th1, amplificando fuertemente la reacción.
- IFN- α (Interferón alfa) activa las células inmunes, como los macrófagos y las células NK; incrementan el reconocimiento de células cancerígenas o infecciones al dinamizar la presentación de antígenos a los linfocitos T y, finalmente, incrementan la capacidad de las células sanas para resistir a nuevas infecciones víricas.
- GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos). Importantes reguladores de la respuesta inmune y de la homeostasis tisular.

En el caso de las mujeres receptoras del grupo A, como se dispone de una analítica previa en sangre con valores de concentración de NK y las diferentes citoquinas, se puede correlacionar los niveles en sangre y en flujo menstrual.

De las muestras biológicas, es decir de flujo menstrual, previa a la aplicación del ozono de las mujeres receptoras del grupo A y B, se analizan las fases:

- Células inmunológicas: se cuantifican las uNK y la morfología de las uNK (CD56/CD16)
- Plasmática: el plasma y las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, así como los factores de crecimiento TGF- α.

Fase 2.2

Una vez recogido el flujo menstrual de los sujetos, en el caso de las mujeres receptoras del grupo A y B, se prepara el endometrio para realizar una transferencia diferida de embriones, vitrificados en D+3 o D+5.

Se realizan controles ecográficos a las mujeres receptora, los cuales se registran en una base de datos, mediante la cuantificación del grosor del endometrio en milímetros (mm) mediante el software ecográfico, comprobando de esta manera la expansión del endometrio, tanto de manera positiva como negativa.

Utilizando el protocolo de preparación para criotransferencia estimado para cada mujer receptora, se procede a la transferencia, y se registra el resultado de la prueba de embarazo Bhcg (Hormona Gonadotropina Coriónica).

Durante la preparación del endometrio para la transferencia, a la mujer receptora, tanto del grupo A como del B, se le comienza a aplicar el ozono. El ozono medicinal será producido por un generador de ozono, el cual se aplica a una concentración de 20 µg/ml (se utilizará esta concentración por ser la concentración estandarizada en ginecología en el tratamiento de infecciones). El ozono producido por el generador se toma del orificio de la boquilla con cualquier método conocido; uno de estos medios puede ser una jeringa estéril, y se aplica en la mujer cerrando al máximo para que alcance toda la zona uterina. Se repite el proceso en dos ocasiones.

Es decir, a la mujer receptora a tratar del grupo A ó B, se prepara el endometrio para la transferencia, se aplica el ozono y se realiza la transferencia del embrión.

A lo largo de la preparación endometrial, las mujeres recibirán cada 2-3 días la aplicación con ozono y se irá registrando el crecimiento del endometrio mediante control ecográfico.

Fase 2.3

En caso de que la prueba de embarazo sea negativa, se recoge el flujo menstrual derivado de la regla posterior a la aplicación con ozono de la mujer receptora, y se procede a realizar el análisis de los parámetros estudiados antes de la ozonización.

De las muestras biológicas, es decir de flujo menstrual, posterior a la aplicación del ozono de las mujeres receptoras del grupo A y B, se analizan las fases:

- Células inmunológicas: se cuantifican las uNK y la morfología de las uNK (CD56/CD16)
- Plasmática: el plasma y las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, así como los factores de crecimiento TGF- α.

Fase 2.4

En el caso del grupo control formado por las donantes, se va a poder recoger flujo menstrual tanto previo a la ozonización como posterior a la aplicación con ozono directamente en la zona endometrial de la donante. Donde la aplicación del ozono a la donante se realiza de igual manera que a las mujeres receptoras en la fase 2.2.

De las muestras biológicas, es decir de flujo menstrual, tanto anterior como posteriormente a la aplicación del ozono de las mujeres donantes, se analizan las fases:

- Células inmunológicas: se cuantifican las uNK y la morfología de las uNK (CD56/CD16)
- Plasmática: el plasma y las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, así como los factores de crecimiento TGF- α.

A las concentraciones utilizadas se ha demostrado ausencia de efectos secundarios, ausencia de efectos teratógenos y cancerígenos en animales de experimentación. Sobre los organismos vivos produce unos efectos biológicos que tienen repercusión en la fisiología:

- Acción directa, en la aplicación local, de tipo desinfectante y trófico, ya que es un potente oxidante.
- Efecto sistémico antibacteriano y antiviral debido a la discreta formación de peróxidos.
- Modulación del Sistema Inmunitario.
- Activa las citoquinas.
- Aumento en la flexibilidad de los glóbulos rojos.
- Aumento de la producción, a nivel de glóbulos rojos, del 2-3 difosfoglicerato, responsable de la liberación del O2 (oxígeno) en los tejidos.
- Mejora de la microcirculación por acción vasoreguladora sobre el endotelio.
- Activa la fagocitosis.

En relación a la secuencia de estas fases, indicar que en primer lugar se ejecuta la fase 1, y posteriormente la fase 2. En la fase 2, el orden sería primeramente la fase 2.1: Estudio previo a la aplicación del ozono en los grupos de las mujeres receptoras tanto de embriones propios (grupo A) como donados (grupo B) y de las donantes; después la fase 2.2: Preparación de la transferencia en los grupos de las mujeres receptoras tanto de embriones propios (grupo A) como donados (grupo B); y finalmente de manera simultánea o sucesiva se pueden ejecutar las fases 2.3 y 2.4 en tanto que van referidas a grupos diferentes, a saber: mujeres de los grupos A y B y por otro lado el grupo de donantes.

Las fases 2.3 y 2.4 solo se ejecutan cuando el resultado del test de embarazo en los grupos de mujeres receptoras ha sido negativo, con el fin de valorar y estudiar la diferencia de valores arrojados en el análisis previo en la fase 2.1 y posterior al uso y aplicación del ozono en la fase 2.2, según se ha descrito anteriormente.

Solo cabe añadir, que si bien todo lo mencionado en las diferentes fases se ha descrito para grupos de mujeres, por su contexto de estudio, el presente uso del ozono y su proceso de aplicación es aplicable a una mujer individualmente, tanto en las pertenecientes al grupo A, al grupo B como a las donantes.

REIVINDICACIONES

1.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, dirigido en particular a mujeres que previamente se han sometido a, al menos a un ciclo de FIV (Fecundación In Vitro) con ovocitos propios o con donación de ovocitos, sin lograr RNV (Recién Nacido Vivo) y van a realizar una transferencia en diferido, bien de embriones vitrificados propios o de embriones donados por donantes, **caracterizado** por comprender las siguientes fases:

- Fase 1: inclusión, recogida y aplicación, consistente en una toma de muestra biológica, siendo esta de sangre menstrual tanto de la mujer receptora sobre la que se va a realizar criotransferencia de embriones, como de la donante, que será recogida durante el 2º o 3º día de ciclo tras la menstruación utilizando cualquier medio conocido, muestras que se recogerán de la menstruación previa a la aplicación con ozono y post aplicación con ozono.

- Fase 2: estudio de la muestra, donde las fases de interés son el plasma y la fase de células inmunológicas.

- Fase 2.1: estudio previo a la aplicación del ozono en la mujer receptora sobre la que se va a realizar la criotransferencia de embriones, donde se analiza por separado la fase que contiene las células del sistema inmune de la fase plasmática.

- Fase 2.2: preparación de la transferencia a la mujer receptora, donde una vez recogido el flujo menstrual de esta, se prepara el endometrio para realizar una transferencia diferida de embriones, vitrificados en D+3 o D+5, y mediante la utilización del protocolo de preparación para criotransferencia estimado para cada mujer receptora se procede a la transferencia, y se registra el resultado de la prueba de embarazo Bhcg (Hormona Gonadotropina Coriónica) y, durante la preparación del endometrio para la transferencia, a la mujer receptora se aplica ozono en una concentración aceptada para uso medicinal, cuyo ozono es producido por un generador y se toma del orificio de la boquilla con cualquier método conocido y se aplica en la mujer cerrando al máximo para que alcance toda la zona uterina.

- Fase 2.3: en caso de que la prueba de embarazo sea negativa, se recogerá el flujo menstrual derivado de la regla post tratamiento con ozono de la mujer receptora, y se procederá a realizar el análisis de los parámetros estudiados antes de la ozonización.

- Fase 2.4: estudio posterior a la aplicación de ozono de la donante, donde en el caso del grupo control formado por las donantes, se recoge flujo menstrual tanto previo a la ozonización como posterior a la aplicación con ozono directamente en la zona endometrial de la donante y donde la aplicación del ozono a la donante se realiza de igual manera que a las mujeres receptoras en la fase 2.2.

2.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, según reivindicación primera **caracterizado** porque, en la fase 2.1, estudio pre aplicación del ozono, en la fase que contiene las células del sistema inmune NK (anillo de células inmunológicas) se cuantifica mediante citometría de flujo la concentración de NK presentes en la decidua uterina, así como la presencia de CD56 y CD16 en la membrana de las NK uterinas y en la fase plasmática se cuantifica las diferentes interleucinas y factores de crecimiento implicados en la regulación de las uNK, mediante la utilización de técnicas inmucitoquímicas como son las técnicas de Elisa o los paneles multiplex, extremadamente sensibles, como son las interleucinas IL-1 α y IL-1 β, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, y factores de crecimiento TGF- α y TNF- α.

3.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la criotransferencia se realiza sobre la mujer receptora con embriones propios.

4.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, según reivindicación 1 y 2, **caracterizado** porque la criotransferencia se realiza sobre la mujer receptora con embriones donados.

5.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, según reivindicaciones 1, 2 y 3 o 1, 2 y 4, **caracterizado** porque, en la fase 2.2 el proceso de aplicación del ozono tanto en la mujer receptora como en la donante cerrando al máximo para que alcance toda la zona uterina se repite en dos ocasiones.

6.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, según reivindicación anterior, **caracterizado** porque en la fase 2.2 a lo largo de la preparación endometrial, las mujeres recibirán cada 2-3 días la aplicación con ozono y se irá registrando el crecimiento del endometrio mediante control ecográfico.

7.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, según reivindicación anterior**, caracterizado** porque el crecimiento del endometrio se controla mediante su expansión en milímetros.

8.- Uso del ozono para aumentar la implantación embrionaria en el endometrio humano, según reivindicación 6, **caracterizado** porque en la fase 2.2 la concentración de ozono a aplicar es de 20 µg/ml.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201731461

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***A61P15/00*** (2006.01)
A61K33/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	**(56) Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
Y	ZOBEL ROBERT *et al*. Intrauterine ozone administration for improving fertility rate in Simmental cattle. Veterinarski Arhiv JAN-FEB 2014. , 31/12/2013, Vol. 84, Páginas 1-8, ISSN 0372-5480(print) ISSN 1331-8055(electronic), páginas 2 y 3.	1-8
Y	Ozone therapy in infertility. 26/12/2013 Recuperado de Internet [en línea] [recuperado el 25/06/18] http://detoxificationcentre.com/ozone-therapy-in-infertility.html	1-8
A	DURICIC DRAZEN *et al*. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. Animal Reproduction Science AUG 2015. , 31/07/2015, Vol. 159, Páginas 1-7, ISSN 0378-4320(print) ISSN 1873-2232(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.anireprosci.2015.05.017>. Página 3, columna izquierda, último párrafo- columna derecha, primer párrafo.	1-8
A	CALDERON *et al*. The effect of ozonated sterile saline irrigation on the endometrium of fertile women. FERTILITY AND STERILITY, 20070901 ELSEVIER SCIENCE INC, NEW YORK, NY, USA. , 01/09/2007, Vol. 88, Páginas S198 - S199, ISSN 0015-0282, <DOI: doi:10.1016/j.fertnstert.2007.07.681>, página S 198, columna derecha, último párrafo-página S 199, columna izquierda.	1-8

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
26.06.2018	S. González Peñalba	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61P, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, INTERNET