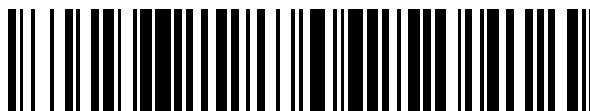


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 854**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2016 PCT/EP2016/058825**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2016 WO16170021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2016 E 16717922 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3286566**

54 Título: **Uso de CD146 soluble como un biomarcador para seleccionar embriones fertilizados in vitro para su implantación en un mamífero**

30 Prioridad:

**21.04.2015 EP 15305596**

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

**12.02.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE (20.0%)  
Jardin du Pharo, 58 Boulevard Charles Livon  
13007 Marseille, FR;  
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET  
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.0%);  
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (20.0%);  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE  
NÎMES (20.0%) y  
ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE  
MARSEILLE (20.0%)**

72 Inventor/es:

**BARDIN, NATHALIE;  
BLOT-CHABAUD, MARCEL;  
BOUVIER, SYLVIE;  
LACROIX, ODILE;  
DIGNAT-GEORGE, FRANÇOISE y  
GRIS, JEAN-CHRISTOPHE, RAYMOND**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 741 854 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

Uso de CD146 soluble como un biomarcador para seleccionar embriones fertilizados *in vitro* para su implantación en un mamífero

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo del tratamiento de la fertilidad humana. De hecho, los inventores en la presente memoria identifican un nuevo biomarcador, CD146 soluble (sCD146), que, cuando se mide en un medio de cultivo de embriones, puede utilizarse para determinar si el embrión se puede seleccionar para la implantación en el útero de un mamífero o no. Los inventores proporcionan así una nueva herramienta y conjuntos de reactivos relacionados para (pre)seleccionar embriones elegibles para la implantación. Los inventores también describen  
10 métodos para promover el embarazo en un ser humano que experimenta transferencia de embriones.

### Antecedentes

A pesar de la mejora tanto de las condiciones de cultivo de embriones como de las técnicas de transferencia en la fertilización *in vitro* (IVF) durante la última década, no se ha logrado una mejora significativa en las tasas de embarazo y parto (Kupka MS et al., Hum Reprod. 2014). Más del 70% de los embriones fallaron en el implante. En  
15 este contexto, se transfiere más de un embrión para aumentar las posibilidades de embarazo. Sin embargo, la transferencia de embriones múltiples induce un riesgo significativo de embarazos múltiples que se sabe que provocan un aumento de la morbilidad y la mortalidad fetal y materna. Para evitar este riesgo, se ha recomendado la transferencia de un solo embrión como estrategia para reducir la frecuencia de los nacimientos múltiples (McLernon et al., BMJ. 2010; Pandian Z et al., Cochrane Database Syst Rev. 2013). Hasta la fecha, la evaluación de la calidad  
20 del embrión se evalúa morfológicamente con varios criterios, incluyendo el tamaño y la simetría de las células, el número de células, la etapa de escisión y los fragmentos de células anucleadas. Sin embargo, la calidad del embrión no está estrictamente correlacionada con la viabilidad del embrión y el potencial de implantación. Por lo tanto, una mejor evaluación del pronóstico de la implantación requiere la búsqueda de marcadores biológicos de implantación para permitir la transferencia de un solo embrión que presente un alto potencial de implantación.

25 El CD146 de membrana se ha probado como expresado por el embrión en etapas tempranas (Wang et al., Journal of Reproduction and Contraception, 2008) y recientemente los inventores identificaron CD146 soluble como un nuevo factor que regula la implantación del embrión en ratas preñadas (Kaspi et al., Angiogenesis, 2013).

El CD146 (o Ag S-Endo 1 / MUC 18 / M-CAM) es una molécula de adhesión que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas que se localiza esencialmente en la unión endotelial (Bardin et al., Blood 2001). Fisiológicamente,  
30 el CD146 se expresa de manera ubicua y constitutiva en el endotelio humano, donde participa en la cohesión de la monocapa endotelial. El CD146 también existe como una forma soluble generada por la proteólisis de la membrana. Se demostró que el CD146 soluble (sCD146) estaba presente tanto en el sobrenadante de células endoteliales en cultivos como en sueros humanos normales y patológicos (Bardin et al., FEBS Lett 1998) (Bardin et al. Thromb Haemost 2003).

35 En obstetricia, el CD146 de membrana se expresa mediante el complejo de cúmulos de ovocitos, el embrión previo a la implantación, el trofoblasto extraveloso y el endometrio (Wang et al., J Reprod Contracept 2008). Además, el uso de un anticuerpo de bloqueo anti CD146 previene la implantación del embrión *in vitro* e *in vivo* en ratones. El anticuerpo AA 98, que bloquea el CD146 de membrana presente en las células endometriales, impide la implantación del blastocisto (Liu et al., J Cell Physiol, 2008). En la pre-eclampsia, la expresión de CD146 está muy reducida o ausente en relación con una disminución de la capacidad invasiva de estos trofoblastos (Liu et al., Lab Invest J Tech Methods Pathol 2004). Con respecto a la forma soluble, se describió una disminución en el sCD146 sérico con la edad gestacional durante el embarazo normal (Kaspi et al., Angiogenesis 2013). Además, los inventores reportaron un sCD146 elevado en mujeres con al menos dos pérdidas fetales inexplicables en comparación con mujeres con al menos un niño vivo (Pasquier et al., Thromb Haemost 2005). También reportaron  
45 diferentes efectos del sCD146 en los trofoblastos extravelosos: i) *in vitro*, donde inhibe la migración, la proliferación y la formación de manera pseudocapilar de la línea celular trofoblástica extravelosa, células HTR/Svneo, ii) en explantes placentarios *ex vivo*, donde disminuye el potencial invasivo y iii) finalmente, en un modelo de rata preñada, donde las inyecciones repetidas de sCD146 disminuyen la tasa de embarazo y el número de embriones por camada. Los estudios histológicos placentarios de la placenta de estas tasas muestran que estos efectos están acompañados por una disminución en la migración de las células de glucógeno, que son similares a los trofoblastos extravelosos  
50 en las mujeres (Kaspi et al., Angiogenesis 2013).

### Compendio de la invención

Los inventores de la presente memoria revelan la presencia de la proteína CD146 soluble (sCD146) en medios de cultivo de embriones gracias a ELISA y experimentos de transferencia de Western. Demuestran que sCD146,  
55 cuando se mide en un medio de cultivo de embriones, puede utilizarse de manera ventajosa como un biomarcador para descalificar para la implantación *in utero* un embrión asociado a un alto riesgo de fracaso de la implantación,

para identificar un embrión implantable o para seleccionar, entre varios, el embrión asociado al mayor potencial de implantación.

5 Un primer objetivo descrito en la presente memoria se relaciona así con el uso de la proteína CD146 soluble (sCD146) presente en el medio de cultivo de embriones como un biomarcador de implantación de dicho embrión en el útero de un mamífero.

10 También se describe en la presente memoria un método temprano y no invasivo para obtener información útil sobre un embrión obtenido mediante fertilización *in vitro* (IVF), en particular para evaluar/determinar el potencial de implantación de un embrión fertilizado *in vitro*, típicamente para identificar embriones con un potencial de implantación (“embrión implantable”), cuando se transfieren al útero de un mamífero. Dicho método se implementa típicamente para descalificar, o por el contrario seleccionar, por ejemplo, pre-seleccionar, un embrión para su implantación en el útero de un mamífero.

El método de la invención comprende de manera ventajosa una etapa *in vitro* de dosificación de sCD146 en el medio de cultivo de embriones, preferiblemente en el sobrenadante del medio de cultivo de embriones, y una etapa de comparación de la dosificación con un valor umbral.

15 También se describe en la presente memoria un equipo de reactivos que comprende un sCD146 de unión a un anticuerpo monoclonal detectable, así como los usos de dicho equipo de reactivos para identificar entre los embriones obtenidos mediante fertilización *in vitro* (IVF) aquellos elegibles para su implantación en el útero de un mamífero, preferiblemente para seleccionar el embrión asociado al mayor potencial de implantación, o para verificar el estado de implantación (“implantabilidad”) de un solo embrión.

20 También se describe un método para promover el embarazo en un ser humano que se somete a una transferencia de embriones que comprende una etapa *in vitro* de dosificación de sCD146 en el medio de cultivo de embriones y una etapa de comparación de la dosis con un valor umbral.

#### Descripción detallada de la invención

25 La presente descripción se refiere al uso de la proteína CD146 soluble (sCD146) presente en un medio de cultivo de embriones como un biomarcador de implantación de dichos embriones en el útero de un mamífero, típicamente de un ser humano.

30 El sCD146 es una herramienta innovadora que representa un biomarcador temprano y no invasivo. Gracias a la presente invención, la selección de embriones elegibles para la transferencia al útero de un mamífero ya no se basa únicamente en criterios morfológicos de los embriones. El sCD146 puede probarse en cualquier medio de cultivo de embriones, independientemente de la calidad del embrión, según lo definido por la clasificación de Estambul (calidad “alta”, “regular” o “baja”). Además, la selección se puede realizar muy temprano en el desarrollo del embrión y antes que con las técnicas existentes. De hecho, el sCD146 se puede detectar en el medio de cultivo de embriones en la etapa temprana del desarrollo del embrión, típicamente tan pronto como dos días después de la fertilización *in vitro* de los ovocitos.

35 El nuevo marcador descrito en la presente memoria permite de manera ventajosa la transferencia de un solo embrión, típicamente del embrión que presenta, entre varios, el mayor potencial de implantación en el útero de un mamífero. Esta opción se puede tomar para evitar el riesgo de embarazos múltiples y las complicaciones relacionadas en el contexto de la IVF [IVF clásica o inyección intracitoplasmática de espermatozoides-IVF (ICSI-IVF)] y al mismo tiempo para mejorar significativamente las posibilidades de embarazo mientras se reducen los costos asociados con el procedimiento IVF.

40 La descripción también proporciona un método para obtener información útil sobre un embrión obtenido mediante fertilización *in vitro* (IVF), en particular para evaluar/determinar el potencial de implantación de un embrión fertilizado *in vitro*, preferiblemente para identificar/seleccionar embriones con un potencial de implantación (“embrión implantable”), cuando se transfiere al útero de un mamífero. Dicho método se utiliza típicamente para descalificar, o por el contrario para seleccionar, por ejemplo, pre-seleccionar, un embrión fertilizado *in vitro* para su implantación en el útero de un mamífero. El método de la invención es de manera ventajosa no invasivo y comprende una etapa *in vitro* de dosificación de sCD146 en el medio de cultivo de embriones, típicamente en el sobrenadante del medio de cultivo de embriones, y una etapa de comparación de la dosificación con un valor umbral. Cuando los embriones se preseleccionan gracias al método de la invención, este método puede comprender además una etapa posterior de selección morfológica que consiste en examinar el embrión utilizando criterios de valor reconocidos según la persona experta, tal como el tamaño y la simetría de las células, el número de células, la etapa de escisión, presencia de fragmentos de células anucleadas.

55 Un medio a emplear puede ser cualquiera de los medios convencionales utilizados convencionalmente en el cultivo o transferencia de embriones. El medio de cultivo es típicamente un medio de cultivo artificial que básicamente contiene glucosa, piruvato y componentes que proporcionan energía, así como factores liberados por el embrión de

pre-implantación que se desarrolla en él. Los medios pueden comprender, además, por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y colesterol.

Se prefiere un medio sin suero teniendo en cuenta que se debe eliminar el riesgo de contaminación con priones u otros agentes infecciosos.

- 5 El medio de cultivo se renueva regularmente. El medio puede ser el mismo durante todo el período de cultivo o cambiarse durante el período de cultivo según la etapa de desarrollo.

Un ejemplo de medio apropiado es el GLOBAL® (Life Global) suplementado con albúmina de suero humano al 10%. Dicho medio se puede utilizar adecuadamente en el cultivo para continuar hasta que se formen los blastocistos en el día 5.

- 10 El medio de cultivo, o sobrenadante del medio de cultivo, que se recogerá es preferiblemente aquel en el que se realizó un cultivo embrionario de al menos 1 día antes de la recogida.

Considerando tanto la necesidad de suministrar una cantidad suficiente de un medio a los embriones como la conveniencia de recolectar los embriones del medio, el cultivo de embriones humanos mencionado anteriormente se lleva a cabo preferiblemente en una cantidad del medio que corresponde a 50 µL – 1 mL del medio por embrión humano, y más preferiblemente a 500 – 800 µL, típicamente 600 µL, del medio por embrión humano.

- 15 El medio de cultivo o el sobrenadante del cultivo recogidos se pueden analizar directamente, o se pueden almacenar congelados y descongelar antes de analizarlos. También se permite añadir uno o más diluyentes farmacéuticamente inertes (por ejemplo, agua purificada estéril o disolución acuosa que contiene albúmina de plasma humano, glucosa, cloruro de sodio y similares, que son compuestos contenidos en GLOBAL®) para aumentar el volumen mediante dilución en un volumen que es más fácil de manejar, por ejemplo, 0,2 mL o 0,5 mL.

- 20 Un método particular descrito en la presente memoria es un método para obtener información útil sobre un embrión obtenido mediante fertilización *in vitro* (IVF), y preferiblemente para determinar utilizando dicha información si el embrión se puede seleccionar para su implantación en el útero de un mamífero. Este método comprende una etapa *in vitro* de dosificación de sCD146 en el medio de cultivo del embrión y una etapa de comparación de la dosis con un valor umbral. La presencia en el medio de cultivo del embrión de sCD146 en una cantidad por encima de un valor umbral, es indicativo de (asociado con) un alto riesgo de fracaso de la implantación de embriones en el útero de un mamífero, y la presencia de sCD146 en una cantidad igual o por debajo de dicho valor umbral es indicativo de (asociado con) una posibilidad de éxito en la implantación de embriones en el útero de un mamífero. Cuanto menos es la concentración de sCD146, mayor es la posibilidad de éxito en la implantación del embrión. El “valor umbral” puede variar dependiendo de la naturaleza de los medios utilizados para el cultivo y por parte de los medios que se prueban concretamente (sobrenadante o medio total). Por ejemplo, cuando la dosis se realiza en el sobrenadante del medio de cultivo utilizando medio GLOBAL® (Life Global) tal como se realizó en la sección experimental, el valor umbral es de 1164 pg por mL de sobrenadante.

- 35 La etapa de dosificación se lleva a cabo de manera ventajosa entre los dos y los cinco días después de la fertilización de los ovocitos, preferiblemente dos días después de la fertilización de los ovocitos, típicamente en el día de la transferencia de embriones en el útero de un mamífero.

- 40 Un equipo de reactivos, típicamente un equipo de reactivos de selección de embriones fertilizados *in vitro*, que comprende un sCD146 de unión a un anticuerpo detectable, preferiblemente un sCD146 de unión a un anticuerpo monoclonal detectable, se describe también en la presente memoria, así como su uso para determinar si un embrión obtenido mediante fertilización *in vitro* (IVF) se puede seleccionar para su implantación en el útero de un mamífero.

- 45 Un equipo de reactivos particular descrito en la presente memoria comprende un sCD146 de unión a un anticuerpo detectable, preferiblemente un sCD146 de unión a un anticuerpo monoclonal detectable, opcionalmente junto con un sustrato apropiado que revela dicho anticuerpo detectable cuando se une a sCD146 en un medio de cultivo de embriones, preferiblemente un anticuerpo detectable (monoclonal) que se une selectivamente a la forma soluble del CD146 y no se une a una forma de CD146 unida a membrana. El equipo de reactivos comprende además opcionalmente un diluyente farmacéuticamente inerte desprovisto de sCD146 para utilizarse para preparar un control, o al menos una disolución que comprende una concentración conocida de sCD146, preferiblemente varias disoluciones (tales como 2, 3, 4, 5 o 6 disoluciones) que tienen diferentes concentraciones conocidas de sCD146s, junto con una curva de calibración (típicamente de 0 pg/mL a 10000 pg/mL). Generalmente, el equipo de reactivos también comprende uno o más contenedores llenos con una o más de las sustancias (anticuerpo, diluyente, y disoluciones) descritas en la presente memoria. Asociado con dicho contenedor(es), se puede añadir un aviso de etiquetado que proporcione instrucciones para utilizar las sustancia según los métodos descritos.

- 50 El sCD146 de unión al anticuerpo puede ser sintético, monoclonal, o policlonal y se puede preparar mediante técnicas bien conocidas en la técnica.

Un sCD146 de unión a un anticuerpo monoclonal se selecciona de manera ventajosa del clon COM 3D9, clon COM 2F6, clon COM 5G6, clon COM 7A4 y clon F4-35H7 (S-endo 1) de BioCytex, y es preferiblemente el clon COM 7A4.

5 Los métodos para preparar dichos anticuerpos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Despoix N, Walzer T, Jouve N, Blot-Chabaud M, Bardin N, Paul P, Lyonnet L, Vivier E, Dignat-George F, Vély F. Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. Eur J Immunol. 2008; 38: 2855-64).

10 El sCD146 de unión a anticuerpos monoclonales detectables del equipo de reactivos está preferiblemente en una forma de dosificación concentrada para detectar una baja concentración de sCD146 en el medio de cultivo del embrión o sobrenadante. Por lo tanto, se utiliza preferiblemente un anticuerpo concentrado. En una realización preferida, el anticuerpo concentrado permite la detección de sCD146 en el sobrenadante del medio embrionario que contiene no más de 100 ng/mL, preferiblemente no más de 50 ng/mL, incluso más preferiblemente no más de 10 ng/mL, de sCD146.

15 La determinación de la presencia, así como la medida de las cantidades de sCD146, se determina preferiblemente en un inmunoensayo mediante un método de una sola etapa en la que el medio de cultivo, o sobrenadante de cultivo, se pone en contacto directo con el antígeno apropiado o mediante un método que implica un tratamiento preliminar de la muestra biológica. El inmunoensayo puede realizarse a través de métodos conocidos de la técnica: en fase sólida o fase homogénea, en una o dos etapas, a través de un método competitivo, etc.

Más preferiblemente, dicho inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en ELISA, FEIA, transferencia de Western, transferencia de punto (dot blot), ensayo basado en perlas, matriz de antígeno y radio inmunoensayo.

20 En un ELISA, un antígeno se debe inmovilizar en una superficie sólida y después formar un complejo con un anticuerpo que está unido a una enzima. La detección se logra evaluando la actividad enzimática conjugada mediante incubación con un sustrato para producir un producto coloreado.

En FEIA, el producto coloreado es fluorescente.

En el radio Inmunoensayo, el producto final es radioactivo.

25 La detección de proteínas utilizando el protocolo Dot Blot es similar a la transferencia de Western en que ambos métodos permiten la identificación y el análisis de proteínas de interés. La metodología Dot Blot difiere de las técnicas tradicionales de la transferencia de Western al no separar las muestras de proteínas mediante electroforesis. En cambio, las muestras de proteínas se colocan en membranas y se hibridan con una sonda de anticuerpos.

30 Las mediciones semicuantitativas se pueden obtener con cada uno de los métodos descritos anteriormente utilizando, por ejemplo, controles normales para normalizar el valor y establecer después una relación, o utilizando un control positivo como calibrador (expresado en unidades arbitrarias).

La detección se puede llevar a cabo sobre un soporte sólido, por ejemplo, una microplaca, sobre la que se coloca el antígeno correspondiente a sCD146, para ser detectado y cuantificado, o partículas sólidas, tubos de ensayo, etc.

35 Los anticuerpos que reconocen sCD146 utilizables en el contexto de la presente invención se etiquetan preferiblemente con una o más etiquetas (marcador de detección) que permiten su identificación, seguimiento, detección y/o medición. Los marcadores de detección pueden seleccionarse, por ejemplo, de un fluoróforo, una perla magnética, un epítipo antigénico, un sustrato de una enzima específica, un dominio de unión de un ligando específico y cualquier otra molécula o resto que pueda detectarse o cuantificarse. Los anticuerpos utilizables en el contexto de la presente invención también pueden ser anti-anticuerpos utilizados para identificar, hacer un  
40 seguimiento, detectar y/o medir los anticuerpos que reconocen el sCD146.

El diluyente farmacéuticamente inerte desprovisto de sCD146 se puede seleccionar, por ejemplo, de agua purificada estéril, o una disolución acuosa que contiene albúmina de plasma humano, glucosa, cloruro de sodio y similares tales como el medio GLOBAL®.

45 También se describe un método para promover el embarazo (es decir, aumentar la tasa de éxito para lograr el embarazo) en un mamífero, típicamente en un ser humano, que se somete a transferencia de embriones que comprende una etapa *in vitro* i) de dosificación de sCD146 en el medio de cultivo de embriones, una etapa ii) de comparar la dosis con un valor umbral según la invención y decidir que el embrión es elegible para su implantación en el útero de un mamífero si la dosis es igual a o está por debajo del valor umbral y que el embrión no es elegible para su implantación en el útero de un mamífero si la dosis está por encima del valor umbral, opcionalmente una  
50 etapa iii) de examinar el embrión utilizando criterios morfológicos, y una etapa iv) de transferir el embrión en el útero del mamífero si la dosis es igual o está por debajo del valor umbral y si dicho embrión satisface los criterios morfológicos de implantación.

En el método descrito anteriormente, la etapa opcional iii) se puede realizar primero, es decir, antes de las etapas i) y ii). La etapa iii) se puede realizar en otra realización entre las etapas i) y ii).

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en los siguientes ejemplos que se proporcionan con fines ilustrativos y no a modo de limitación.

### Leyenda de las Figuras

Figura 1: Distribución de parejas y embriones

5 Figura 2: Análisis de transferencia de Western de sobrenadantes de embriones positivos y negativos mediante el ensayo ELISA. El control negativo corresponde al medio de cultivo sin ningún embrión. MW, peso molecular

Figura 3: Concentraciones de sCD146 en el día 2 (D2) y día 3 (D3).

Figura 4: Concentraciones de sCD146 según la calidad del embrión tal como se define en la clasificación de Estambul (tipo 1 "alta" n=90, tipo 2 "regular" n=190, o tipo 3 "baja" n=43)

10 Figura 5: Comparación de las concentraciones de sCD146 entre los embriones implantados (SI, n=63) y no implantados (NO, n=172)

Figura 6: Porcentaje de embarazo según el valor de sCD146.

### Ejemplos

#### Materiales y métodos

15 Pacientes

Desde Marzo de 2013 hasta Diciembre de 2014, los inventores realizaron un estudio piloto inicial en 162 parejas que se sometieron a intentos de fertilización *in vitro* (IVF) en el departamento de reproducción del centro médico La Conception University Hospital (AP-HM, Marseille, France). Se informó a todas las parejas que los medios de cultivo de embriones de embriones transferidos se preservarían después de la transferencia de embriones para fines de investigación, y optaron por participar o no en este estudio. Cada pareja se incluyó solo una vez. Los inventores excluyeron de este estudio donantes de ovocitos y espermatozoides y pacientes con falta de consentimiento The Institutional Review Board aprobó esta investigación.

#### Protocolo de tratamiento

25 Los pacientes se sometieron a una hiperestimulación ovárica controlada utilizando tres tipos de protocolos: protocolo de agonistas largo (administración de agonistas de GnRH en la fase lútea del ciclo anterior); protocolo agonista corto (administración diaria de agonistas de GnRH desde el primer día del ciclo de IVF); y protocolo antagonista (administración diaria de antagonista de GnRH desde el día 5). La FSH y/o hMG recombinantes se utilizaron en dosis que oscilaban entre 150 IU/día y 450 IU/día, según el índice de masa corporal, la edad de la mujer, el valor basal de FSH del día 3 y el número de folículos antrales. Las pacientes se sometieron rutinariamente a ultrasonido transvaginal en serie a partir del día 8 de hiperestimulación ovárica y mediciones de estradiol (E2) en suero. La dosis de gonadotropina se ajustó según la respuesta ovárica. La activación de la ovulación se llevó a cabo mediante la inyección subcutánea de gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG, Ovitrelle®, Merck-Serono, 250 µg) cuando al menos tres folículos alcanzaron un diámetro medio de 16 mm. La extracción de ovocitos se realizó bajo anestesia local o general utilizando una punción transvaginal guiada por ultrasonido de los folículos 35 horas después de la administración de hCG. La IVF convencional o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI-IVF) se realizó según los parámetros de los espermatozoides, utilizando protocolos de rutina. Después de la evaluación de la fertilización normal (es decir, ovocitos fertilizados con dos pronúcleos, los denominados cigotos diploides) 18 horas después de la inseminación, los cigotos se cultivaron individualmente a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en 500 µL de medio GLOBAL® (Life Global) hasta el día de la transferencia de embriones (día 2 o 3).

40 Se observaron 26 horas después de la inseminación para detectar la escisión celular temprana. Los embriones diploides obtenidos se clasificaron antes de la transferencia según el sistema de puntuación basado en el tamaño y la simetría de las células, la fragmentación y el número de células según el Consenso de Estambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. Hum Reprod. 2011).

Los embriones se clasificaron después en tres subgrupos:

45 1/ embriones de alta calidad con células del mismo tamaño, sin fragmentación o menos del 10%, y 4 células en el día 2 o 8 células en el día 3; preferentemente seleccionado para transferir cuando esté disponible;

2/ embriones de calidad regular con un tamaño de células específico del estadio para la mayoría de las células y/o 10-25% de fragmentación, y/o 3 o 5 células el día 2 o 6, 7 o 9 células el día 3;

50 3/ embriones de baja calidad sin tamaño de célula específico de etapa y/o fragmentación severa (>25%) y/o 2 células o > 5 células en el día 2 o < 6 o > 9 células en el día 3.

Después de la transferencia de embriones, la fase lútea se respaldó mediante tabletas de progesterona diarias (DuphastonR 30 mg / día; Abbot Products SAS, Francia). Los embarazos fueron diagnosticados mediante niveles de hCG positivos en suero (> 100 IU/l) 14 días después de la transferencia de embriones. Los embarazos clínicos se confirmaron por la presencia de un saco gestacional con actividad cardíaca en el examen de ultrasonido vaginal durante la quinta semana después de la transferencia de embriones.

#### Sobrenadantes de embriones

Los medios de cultivo (500 µL Global®) de cada embrión transferido se recogieron individualmente después de la transferencia del embrión, se congelaron y almacenaron a -20°C hasta la cuantificación del sCD146. La recogida de sobrenadantes de embriones es una técnica no invasiva; no hubo cambios en la atención de los pacientes. Los resultados de la IVF se compararon retrospectivamente en todos los pacientes.

#### Confirmación de la presencia de sCD146 en sobrenadantes de embriones

El CD146 ya se ha identificado en las primeras etapas del embrión humano (Wang H et al. J of Reprod and Contracept 2008) y se sabe que se puede generar una forma soluble mediante el desprendimiento del CD146 de membrana en las células trofoblásticas (Kaspi et al., Angiogenesis, 2013). Sin embargo, no hay datos disponibles sobre la secreción de sCD146 por embriones en la literatura. Los inventores llevaron a cabo análisis de transferencia de Western en el sobrenadante de embriones para confirmar la liberación de sCD146 por los embriones. Se sometieron 50 µL de sobrenadantes de embriones o control negativo (medio de cultivo) a electroforesis en gel de poliacrilamida-NuPage SDS 4-12% (En Vitrogen/Life Technologies, USA) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizaron marcadores de peso molecular de Bio-Rad. La transferencia se realizó a voltaje constante (60 V) durante 2 horas. Después de bloquear con albúmina de suero bovino al 4% en TBS-Tween 20 (TBST), se evidenció el CD146 soluble con el anticuerpo anti-CD146 humano (7A4 1 mg/l; Biocytex, Marseille, France) diluido en TBST (1:3000), durante una noche a 4°C con agitación constante. El CD146 soluble se reveló por el anticuerpo de anti-ratón de cabra acoplado a HRP (Thermo Scientific, USA). Las membranas se escanearon y analizaron mediante G:Box-Chemi-XT4 (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

#### Ensayo de CD146 soluble

El sCD146 se analizó utilizando una adaptación del ensayo comercial ELISA (CY-QUANT sCD146, Biocytex, Marsella). Las placas se revistieron con fragmentos de CD146 F(ab')<sub>2</sub> monoclonales antihumanos específicos de ratón. Se añadieron 200 µL de sobrenadante embrionario diluido a 1/2 a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las placas se lavaron cinco veces, seguido de incubación con un anticuerpo monoclonal anti-CD146 acoplado a HRP específico (7A4-HRP, 1 mg/l; Biocytex, Marseille, France) a una dilución de 1:1000 en un diluyente específico durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se lavó 5 veces. 200 µL de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) se incubaron durante aproximadamente 20 minutos a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se detuvo después mediante la adición de 100 µL de una disolución ácida. La intensidad de la señal estaba directamente relacionada con la concentración de sCD146 contenida inicialmente en la muestra. La adaptación de la técnica se basó en la sustitución del diluyente del equipo de reactivos por medio de cultivo de embriones, conservado en las mismas condiciones que los sobrenadantes de embriones (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas), pero sin embrión para mejorar la repetitividad y la reproducibilidad del ensayo. También se utilizó un anticuerpo concentrado anti-CD146 debido a una menor concentración de sCD146 en sobrenadantes que en suero o plasma humano (7A4-HRP, 1 mg/l; Biocytex, Marseille, France). Las concentraciones de sCD146 en los sobrenadantes de embriones se determinaron utilizando una curva de calibración de disoluciones con concentraciones conocidas de sCD146 (de 0 pg/ml a 10000 pg/ml). Debido al bajo volumen de sobrenadantes y las recomendaciones del proveedor (200 µL/pocillo), cada muestra se diluyó (1:2) y se analizó de forma simple. La densidad óptica (OD) se midió a 450 nm.

Se llevó a cabo un análisis de repetitividad y reproducibilidad y los datos mostraron un 4% de repetitividad y un 11% de reproducibilidad (n= 3 ensayos).

#### Datos recogidos

Los inventores recopilaron datos clínicos y biológicos de la paciente (edad, índice de masa corporal, hábito de fumar, indicación y duración de la infertilidad, evaluación de la reserva ovárica evaluada mediante recuento de folículos antrales y niveles plasmáticos basales de FSH y AMH del día 3), características del ciclo de IVF y datos de laboratorio (número de intentos anteriores de IVF-ICSI, IVF o ICSI-IVF convencionales, protocolo de estimulación ovárica, niveles de estradiol, grosor endometrial en el día de la activación, número de ovocitos recuperados, de ovocitos maduros, de embriones diploides obtenidos y de embriones transferidos, puntuación morfológica de embriones transferidos, el día de la transferencia) y aparición de embarazos clínicos.

#### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media ± SEM. El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Prism (GraphPad Software Inc., San Diego). Diferencias significantes se determinaron utilizando los ensayos no

paramétricos Mann Whitney y Chi2. Debido a que tenemos varias observaciones para cada pareja, se utiliza una ecuación de estimación generalizada (GEE) con un modelo multivariante. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo.

Resultados

5 Características iniciales del paciente

El grupo de estudio incluyó 162 parejas que se sometieron a IVF o IVF-ICSI con al menos un embrión transferido. De los 1505 ovocitos recuperados, 1199 fueron maduros (81,2%), se obtuvieron 907 embriones y 738 fueron diploides. En el día 2/3, se transfirieron un total de 261 embriones, con uno o dos embriones por transferencia. De las 162 parejas estudiadas, los datos completos (resultado del ensayo de sCD146 y de la prueba de embarazo) estaban disponibles para 138 de ellas con 225 embriones transferidos (Figura 1). Estos 225 embriones transferidos dieron como resultado 36 embarazos clínicos e incluyeron 33 simples y 3 gemelos. Se transfirieron 146 embriones el día 2 (D2, 64,8%), 79 el día 3 (D3, 35,2%). El número medio de embriones transferidos fue 1,63 (SD +/- 0,53) y la tasa de implantación fue del 17,3% (39 sacos / 225 embriones). La tasa general de embarazo fue del 26,1% (36 embarazos / 138 pacientes).

10

15

Entre estos 225 embriones, y según la clasificación de Estambul, 64 fueron “embriones de calidad alta”, 125 “calidad regular” y 36 “baja calidad”. Su tasa de implantación fue del 26,2%, 12% y 5,7% respectivamente.

20

La edad media de las mujeres fue 33,1 años (SD +/- 4,51). La hiperestimulación ovárica controlada se llevó a cabo utilizando un protocolo agonista corto en un 21,5% de los intentos, un protocolo agonista largo en un 58,3% y un protocolo antagonista en un 20,2%. El 54% de las parejas se sometieron a la fertilización clásica *in vitro*, el 46% a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. La fila media de ciclos de IVF fue 1,77 (SD +/- 0,97). Las indicaciones para la IVF se relacionaron con la infertilidad masculina en el 58% de las parejas o con la infertilidad femenina en el 42%. Las características de la población estudiada (estado de reserva ovárica, factores de pronóstico clínico de implantación, respuesta ovárica y estado endometrial en el día de activación) se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Características de la población estudiada. Los datos se expresan como media +/- SD y mediana [IQR]

AMH (ng/mL)	3,68 +/- 3,38 2,50 [1,36-5,20]
FSH (UI/L)	7,452 +/- 2,601 7 [5,6-8,78]
Recuento de folículos antrales	14,32 +/- 8,74 12 [9-18]
Índice de masa corporal (BMI, Kg/m <sup>2</sup> )	23,81 +/- 4,98 22,5 [20,7-26,0]
Fumadores actuales (%)	28
Historial de embarazos previos	35
Estradiol (pg/mL) en el día de la activación	2394 +/- 1392 2216 [1495-2946]
Grosor endometrial en el día de la activación	
alta calidad: 8 – 13 mm (%)	74
baja calidad: < 8 mm o > 13 mm (%)	24

25

Presencia de sCD146 en sobrenadantes de embriones desde el día 2

Para confirmar la presencia de sCD146 en los sobrenadantes de embriones, los inventores realizaron un análisis de transferencia de Western en 4 muestras con diversas concentraciones de sCD146: la primera se evaluó, por ELISA, a 220 pg/mL (transferida el día 2), la segunda a 1178 pg/mL (transferida el día 2), la tercera a 3850 pg/mL (transferida el día 3) y la última fue el control negativo y correspondió al diluyente utilizado para el ensayo (medio de

30



cultivo del embrión, conservado en las mismas condiciones que los sobrenadantes de embriones pero sin embrión) (Figura 2).

5 Como los embriones se transfirieron el día 2 (D2) o 3 (D3), los inventores compararon las concentraciones de sCD146 en los sobrenadantes de embriones en D2 y D3. No se mostró ninguna diferencia significativa en las concentraciones de sCD146 entre las transferencias D2 o D3 ( $p = 0,36$ ) (Figura 3).

Concentraciones de sCD146 y calidad del embrión

10 En la práctica, la selección de embriones se basa en su morfología. Este es el único criterio evaluado antes de la transferencia. De este modo, los inventores estudiaron la relación entre las concentraciones de sCD146 y la calidad del embrión según lo definido por la clasificación de Estambul. Descubrieron que las concentraciones de sCD146 no se correlacionaban con el tipo de embrión (Figura 4).

Concentraciones de sCD146 y resultado de IVF

15 Los inventores encontraron una diferencia significativa en las concentraciones de sCD146 entre embriones con y sin implantación (Figura 5) con una baja concentración asociada con un alto potencial de implantación. Después de un análisis multivariable por etapas con ajuste a la clasificación de Estambul de las covariables y la tasa de FSH, confirmaron la asociación significativa entre una concentración baja de sCD146 y la implantación con una chi-cuadrada de Wald a 5,39 ( $p = 0,02$ ).

Eficacia de sCD146 como biomarcador de implantación

20 La curva ROC calculada mostró que la sensibilidad óptima (71%) y la especificidad (60%) para la implantación se encontraron a 1164 pg/mL de sCD146. En este umbral, el porcentaje de embarazo aumentó en aproximadamente un 40%. Este aumento se mantiene en los tres grupos de Estambul con un aumento del 20, 30 y 77% en la calidad del embrión alta, regular y baja, respectivamente (Figura 6).

### Conclusiones

25 Para evitar el riesgo de embarazos múltiples y las complicaciones relacionadas, es necesario seleccionar solo un embrión para transferir. La predicción del potencial de implantación de los embriones constituye, por lo tanto, un imperativo en la IVF. En este experimento, los inventores demostraron que sCD146 representa un biomarcador temprano, no invasivo e innovador para seleccionar el embrión con el mayor potencial de implantación. Curiosamente este biomarcador es independiente de los criterios de morfología como se definen por la clasificación de Estambul, que hasta ahora eran los únicos criterios de selección. Por lo tanto, la selección de embriones con sCD146 puede ser útil sea cual sea el grupo de embriones. Por lo tanto, sCD146 representa el primer biomarcador de selección de embriones que mejora la precisión de la selección de embriones y la efectividad de la IVF.

Una elección temprana, clara y precisa del embrión con el mejor potencial de implantación constituye, de hecho, la mejor estrategia para mejorar las posibilidades de embarazo en la IVF.

35 El inventor evidenció en sus experimentos la presencia de sCD146 en los sobrenadantes de embriones tanto por ELISA como por la transferencia de Western. Esta detección podría lograrse tan pronto como el día 2 en el sobrenadante embrionario. Estos resultados muestran sCD146 como un biomarcador ventajoso en la IVF, ya que hasta ahora no se pudo detectar ningún biomarcador en la etapa temprana de blastocisto. Además, el uso de sCD146 muestra otra ventaja, ya que la mayoría de los centros transfirieron embriones el día 2 o 3, un período que es compatible con la detección de sCD146. Finalmente, la detección temprana de sCD146 también se asocia con la reducción de costos.

40 La concentración de sCD146 en sobrenadantes de embriones representa un biomarcador temprano, no invasivo e innovador para seleccionar el embrión con el mayor potencial de implantación. Este biomarcador mejora de manera ventajosa la efectividad de la IVF al reducir el tiempo y el costo para obtener un embarazo.

**Referencias**

- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011; 26:1270-1283.
- Bardin *et al.* *FEBS Lett* 1998
- Bardin *et al.* *Blood* 2001
- Bardin *et al.* *Thromb Haemost* 2003
- Kaspi *et al.*, *Angiogenesis*, 2013
- Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, Calhaz-Jorge C, Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Reproduction and Embryology. Hum Reprod.* 2014 ;29:2099-113.
- Liu *et al.* *J Cell Physiol*, 2008
- Liu *et al.* *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2004
- McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC, Gerris J, Kremer JA, Martikainen H, Mol BW, Norman RJ, Thurin-Kjellberg A, Tiitinen A, van Montfoort AP, van Peperstraten AM, Van Royen E, Bhattacharya S. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ.* 2010; 21:341:c6945.
- Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G, Bhattacharya S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; 29;7:CD003416.
- Pasquier *et al.* *Thromb Haemost* 2005
- Wang *et al.*, *Journal of Reproduction and Contraception*, 2008

**REIVINDICACIONES**

1. El uso de la proteína CD146 soluble (sCD146) presente en un medio de cultivo embrionario como un biomarcador de implantación de dicho embrión en el útero de un mamífero.
- 5 2. Un método para obtener información útil sobre un embrión obtenido mediante fertilización *in vitro* (IVF) y preferiblemente determinar si el embrión se puede seleccionar para la implantación en el útero de un mamífero, comprendiendo el método una etapa *in vitro* de dosificación de sCD146 en el medio de cultivo embrionario y comparación con un valor umbral.
- 10 3. El método según la reivindicación 2, en donde la presencia de sCD146 en una cantidad por encima del valor umbral, es indicativo de un alto riesgo de fracaso de la implantación del embrión en el útero de un mamífero, y la presencia de sCD146 en una cantidad igual o por debajo del valor umbral es indicativo de una posibilidad de éxito en la implantación de embriones en el útero de un mamífero.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en donde la etapa de dosificación se lleva a cabo entre dos y cinco días después de la fertilización *in vitro* del ovocito, preferiblemente dos días después de la fertilización *in vitro* del ovocito.
- 15 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el mamífero es un ser humano.
6. El uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para evaluar el potencial de implantación de un embrión fertilizado *in vitro* en el útero de un mamífero, y opcionalmente descalificar para la implantación de embriones con alto riesgo de fracaso de la implantación.
- 20 7. El uso de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para seleccionar, preferiblemente pre-seleccionar, un embrión fertilizado *in vitro* para su implantación en el útero de un mamífero.
8. El uso *in vitro* de un equipo de reactivos que comprende un sCD146 de unión a un anticuerpo monoclonal detectable para determinar si un embrión obtenido mediante fertilización *in vitro* (IVF) se puede seleccionar para su implantación en el útero de un mamífero.

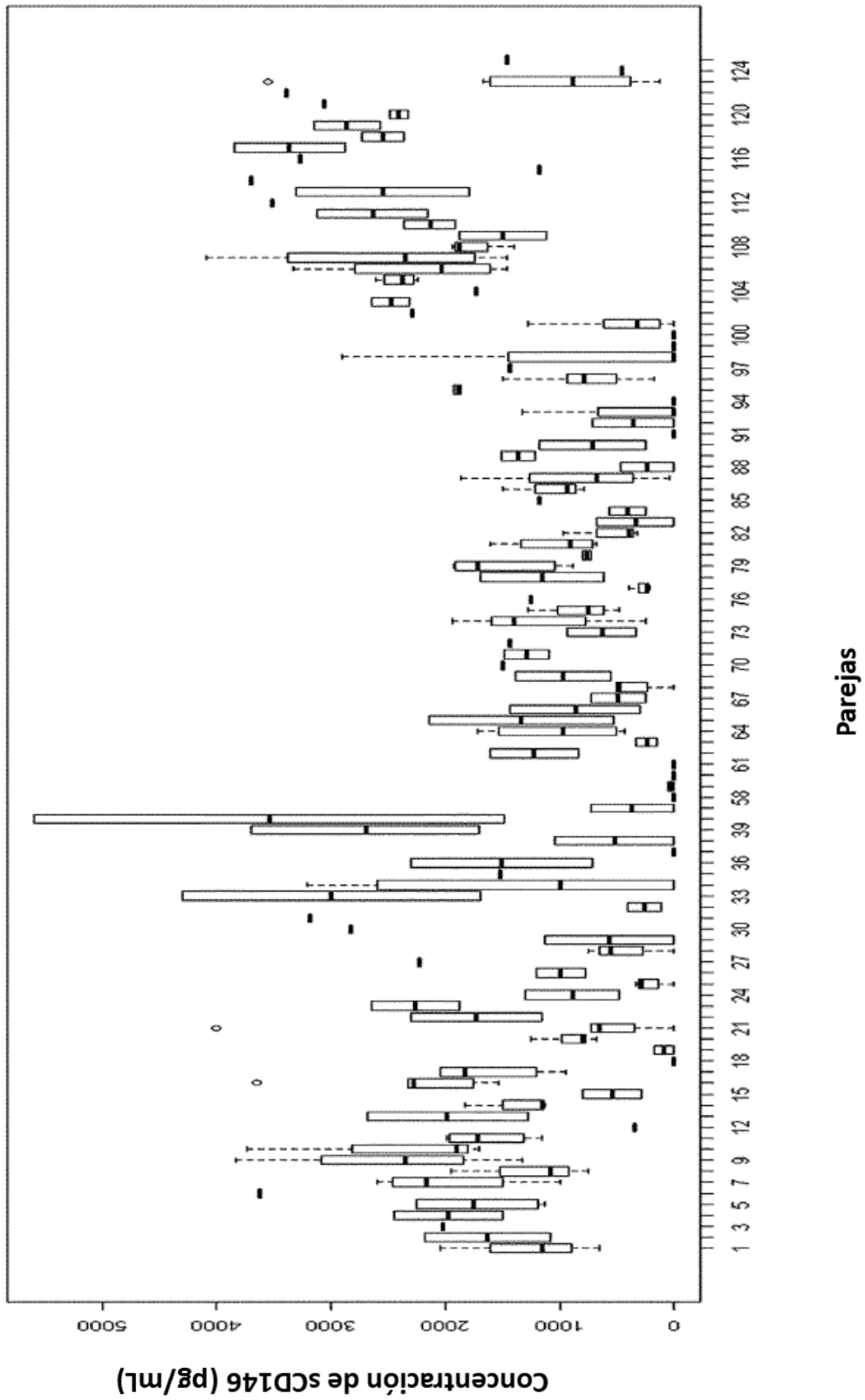


FIGURA 1

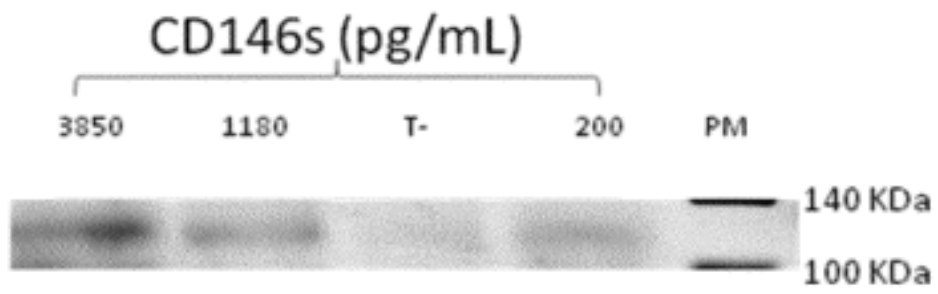


FIGURA 2

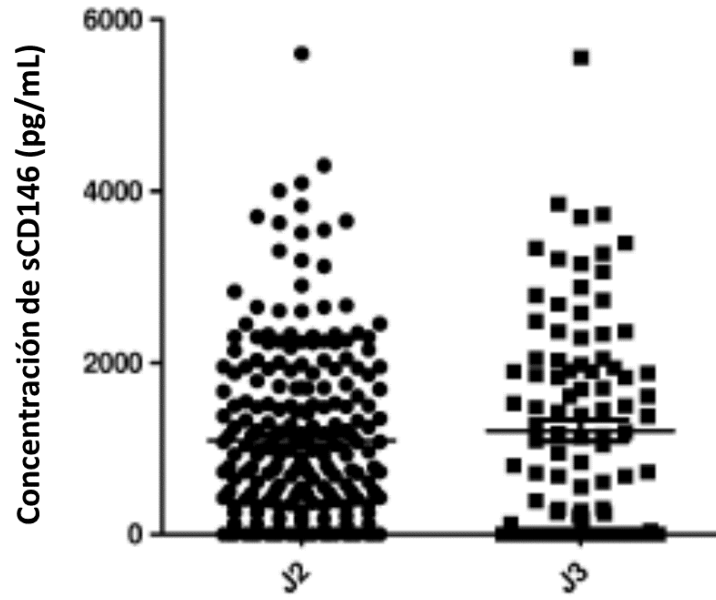


FIGURA 3

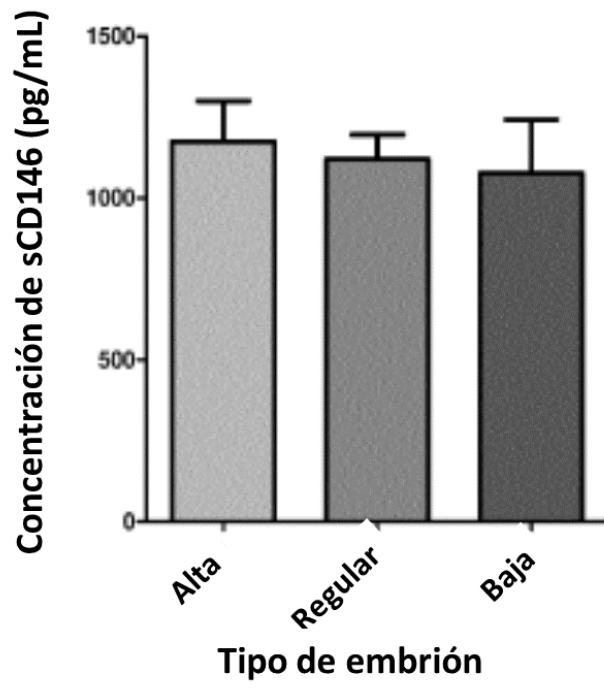


FIGURA 4

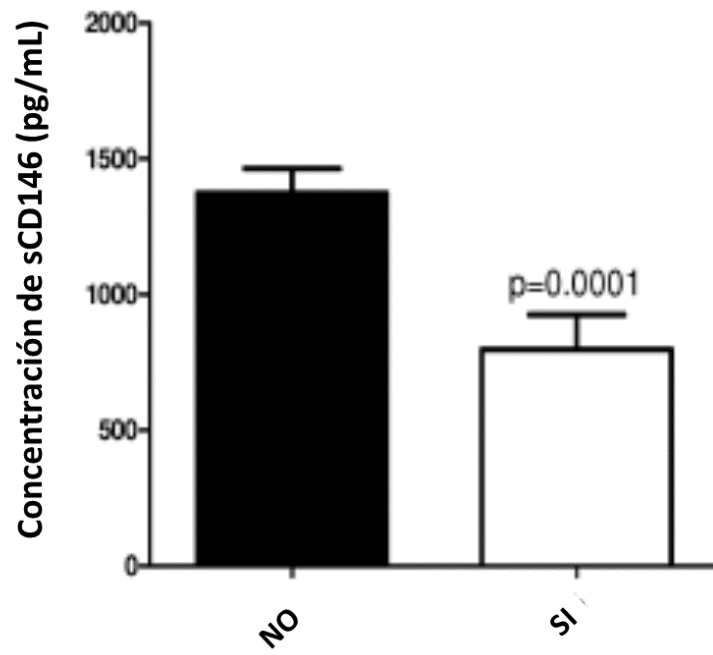


FIGURA 5



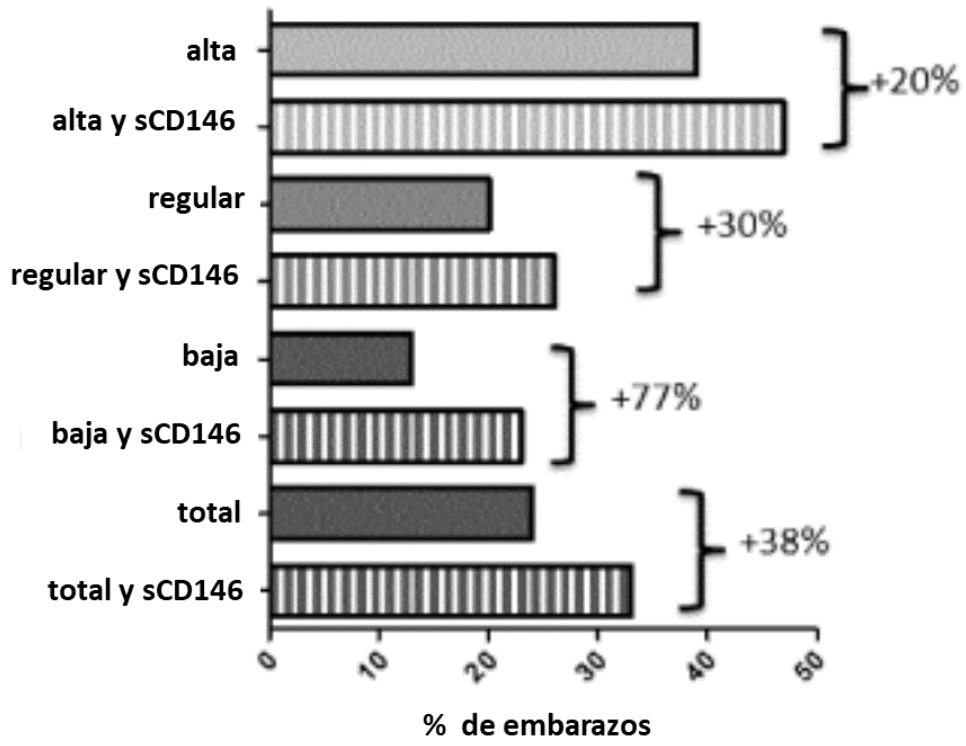


FIGURA 6