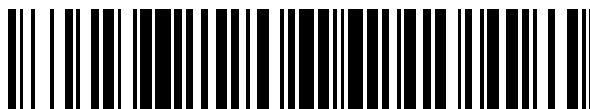


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 773**

51 Int. Cl.:

A61P 15/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2011 PCT/BR2011/000454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12083396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2011 E 11805370 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2654897**

54 Título: **Método para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de la madre en mamíferos, uso de una cantidad eficaz de lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma, de lectina de unión al beta-galactósido o de derivados y producto**

30 Prioridad:

21.12.2010 BR PI1005702

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2020

73 Titular/es:

**INPRENHA BIOTECNOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO AVANÇADO S.A. (50.0%)
Estrada Velha de Taquaritinga, Fazenda Lagoinha
- Km 04, Caixa Postal 55, Casa 2, - Zona Rural
Jaboticabal - SP -CEP 14870-970, BR y
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DIAS BARUFFI, MARCELO;
DA SILVA CARVALHO MORANI, ERIKA;
RONCOLETTA, MARCELO;
ANDRADE, CAMILLO DEL CISTIA y
CATALDI RODRIGUES, LÍLIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 756 773 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

Método para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de la madre en mamíferos, uso de una cantidad eficaz de lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma, de lectina de unión al beta-galactósido o de derivados y producto

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de la madre en mamíferos mediante la administración en el útero de un mamífero de una cantidad eficaz de lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma, así como a un producto que comprende dicha lectina. La invención no reivindica los métodos de tratamiento mediante cirugía o terapia realizados en el cuerpo humano o animal.

Descripción de la técnica relacionada

La industria agrícola juega un papel clave en la economía brasileña, gracias a su considerable participación en el producto nacional bruto y a su positiva contribución en el equilibrio del comercio.

Para asegurar su rentabilidad en el mercado agrícola, una propiedad agrícola debería mantener una eficacia reproductiva máxima de la ganadería con objeto de satisfacer la demanda de los consumidores de productos de alta calidad. En este sentido, el mantenimiento de unos elevados índices de nacimiento es un factor clave en la cadena de acontecimientos que da como resultado una propiedad agrícola rentable. No obstante, en la mayoría de los casos, el mantenimiento de unos niveles óptimos de reproducción es una tarea difícil debido a los elevados índices de pérdidas tempranas de embriones en el embarazo.

La reproducción puede definirse como la concepción de seres vivos de la misma especie después de una secuencia de acontecimientos fisiológicos, que a su vez, se basan en una multiplicidad de factores. El uso de las técnicas de reproducción del estado de la técnica en el área agrícola puede tener un papel clave en la mejora genética de la ganadería, aumentando el potencial de embarazo (la implantación de embriones en el útero de la madre) con el fin de garantizar una productividad máxima durante la vida útil de un animal.

Sin embargo, en todo el mundo, la pérdida de un embrión es una de las causas más habituales de pérdidas económicas para los criadores; por lo tanto, la prevención de la pérdida temprana de un embrión todavía es un reto en vista de los complejos mecanismos implicados en el diagnóstico y el mantenimiento de un embarazo.

Un diagnóstico temprano que identifique el índice de implantación del embrión en el útero de la madre en mamíferos es una herramienta clave para los procedimientos agrícolas, dado que permite que los criadores adopten medidas preventivas y minimicen la posible pérdida económica. Por lo tanto, se están desarrollando nuevas tecnologías en vista de la mejora en el conocimiento de la fisiología reproductiva del ovario del ganado para conseguir unos mejores resultados reproductivos y reducir los costes de tratamiento.

De una forma análoga a la fertilización *in vitro* del ganado, las técnicas de reproducción asistida están siendo cada vez más populares debido a las necesidades del mercado. El comportamiento reproductivo eficaz del ganado está relacionado directamente con el nacimiento de un gran número de terneras hembra de razas de ganado lechero y de terneros macho de razas de ganado vacuno, produciendo así beneficios económicos para las propiedades agrícolas.

Otras características del mercado, tales como la demanda del consumidor global de calidad, escala y estandarización de los productos de origen animal, junto con la lucha por un espacio para la crianza, las áreas agrícolas y bioenergéticas estimulan la investigación de una mayor productividad, haciendo que las biotécnicas de reproducción mejoren a un ritmo rápido.

En línea con las necesidades de producción y consumo del mercado primario global, la industria agrícola brasileña se basa en las técnicas de reproducción asistida para aumentar la productividad media de los rebaños de ganado, dado que dichas técnicas aumentan sustancialmente el nacimiento de animales genéticamente superiores.

Las principales técnicas de reproducción usadas en las propiedades agrícolas incluyen: (i) el apareamiento o la reproducción por medios naturales; (ii) la inseminación artificial; (iii) la producción *in vivo* seguida de la transferencia del embrión; y (iv) la producción *in vitro* seguida de la transferencia del embrión. Independientemente de la técnica elegida, el principal objetivo del método de reproducción es permitir un rendimiento máximo de la especie reproductora, consiguiendo unos resultados positivos.

El apareamiento es una técnica usada ampliamente dado que es más barata para los criadores, pero tiene un control limitado sobre las enfermedades de transmisión sexual y proporciona una mejora genética más lenta de los rebaños. En este procedimiento, los embriones consisten en un 50 % del material genético del padre (por lo tanto, diferente del material genético de la madre), lo que puede causar la formación de un gran número de aloantígenos y dar lugar a la pérdida del embrión debido a la ausencia de tolerancia materno-fetal.

Un aloantígeno es cualquier molécula codificada por el material genético de otro organismo perteneciente a la misma especie. Dado que dicha molécula es una diferente y es introducida en otro organismo, el sistema inmunitario del último es inducido a producir una serie de respuestas contra el material “extraño”. Un ejemplo es el embrión recién fertilizado, que tiene la mitad del material genético de la madre y la mitad del material genético del padre; la última

mitad puede ser extraña para el sistema inmunitario de la madre, y por lo tanto puede ser rechazada por el organismo de la madre. La ausencia de una inmunotolerancia materno-fetal (proceso mediante el cual el organismo de la madre reconoce/acepta el feto sin desencadenar una respuesta inmunitaria contra él) es una de las principales causas de aborto precoz.

Otra técnica de reproducción usada ampliamente en el área agrícola es la inseminación artificial (IA), que consiste en la deposición artificial de semen (espermatozoide/gameto masculino y plasma seminal) en el tracto reproductor femenino por medio de técnicas específicas adecuadas para las particularidades anatómicas de cada hembra. El éxito de la IA se mide por el índice de embarazo - o el número de hembras embarazadas en vista del número de hembras inseminadas. En este procedimiento, los embriones generados también consisten en un 50 % del material genético del padre (por lo tanto, diferente del material genético de la madre), que por lo tanto también puede dar lugar a la formación de un elevado número de aloantígenos y dar lugar a la pérdida del embrión debido a la ausencia de tolerancia materno-fetal.

Adicionalmente, la producción *in vivo* seguida de la transferencia del embrión (TE) es una técnica de reproducción en la que se generan varios embriones en el tracto reproductor de una hembra donante (que dona el material genético) y se transfieren al útero de una hembra receptora de la misma especie, que llevará el embarazo término. La generación de embriones en el útero de donantes implica una superovulación, una inseminación artificial y técnicas de purga del embrión. Después de la purga, los embriones son evaluados, y aquellos viables pueden ser transferidos o criopreservados. La transferencia (deposición) de los embriones de la producción *in vivo* en el útero o en la trompa de Falopio de las receptoras depende de procesos para la sincronización del estro (es decir, para adaptar el útero de la receptora a la misma fase de desarrollo embrionario). En este procedimiento, los embriones transferidos al organismo de la receptora consisten en hasta un 100 % de aloantígenos (material genético diferente), dado que están formados completamente por material genético de las donantes y del padre, lo que implica un mayor riesgo de pérdida del embrión debido a la ausencia de tolerancia materno-fetal.

Por otro lado, la fertilización *in vitro* seguida de la transferencia del embrión se refiere a la generación de embriones en el laboratorio, y dichos embriones son transferidos al útero de hembras receptoras de la misma especie, que llevarían el embarazo a término. La producción de embriones en el laboratorio depende de lo siguiente: (i) la aspiración de los ovocitos del ovario de la donante por medio de una punción folicular guiada por ultrasonidos; (ii) la MIV - la maduración *in vitro* de los ovocitos seguida de la inducción *in vitro* de la maduración del citoplasma del ovocito y del núcleo del ovocito, preparando así el huevo para la fertilización; (iii) la FIV - la fertilización *in vitro* o el proceso de singamia de los ovocitos maduros y de los espermatozoides viables; (iv) el CIV - el cultivo *in vitro* de los embriones después de la fertilización hasta que dichos embriones alcanzan la fase apropiada (mórula y/o blastocisto) para la transferencia después de 5-7 días de cultivo; (v) la transferencia del embrión, cuando – después del periodo de cultivo – los embriones deben ser evaluados, y aquellos con buena viabilidad pueden ser transferidos, criopreservados y/o vitrificados. La transferencia de los embriones producidos *in vitro* en el útero o en la trompa de Falopio de las receptoras también depende de los procesos para la sincronización del estro (es decir, para adaptar el útero de la receptora a la misma fase de desarrollo embrionario). En este proceso, los embriones ovulados en el organismo de la receptora consisten hasta en un 100 % de aloantígenos (material genético diferente), dado que están formados completamente por material genético de las donantes y del padre, lo que implica mayores riesgos de pérdida del embrión debido a la ausencia de tolerancia materno-fetal.

Según se ha descrito o más arriba, la tolerancia materno-fetal es un proceso inmunitario que regula la respuesta del organismo de la madre frente al embrión o al feto. El sistema inmunitario de un organismo es responsable de un conjunto complejo de reacciones frente a los factores externos y/o a los agresores que pueden deteriorar su estado fisiológico normal.

Las respuestas inmunorreguladoras durante el embarazo son los acontecimientos que se generan a partir de la ovulación, la cópula y la fertilización que, por encima de todo, aspiran al crecimiento y al desarrollo del producto de la concepción (el embrión o el feto y las membranas asociadas).

En este sentido, Lewis, S. K. *et al*, 2007 (Galectin-15 [LGALS15]: A Gene Uniquely Expressed in the Uteri of Sheep and Goats that Functions in Trophoblast Attachment) observaron que, en los rumiantes, el embrión en la fase de MO (mórula, entre los días 4-6) entra en el útero y continúa su desarrollo hasta la fase de BL (blastocisto, entre los días 6-7), que contiene una monocapa de células denominadas células del trofotodermo. Después de la ruptura de la zona pelúcida hasta el día D12 (día 12) en la oveja, o el D15 (día 15) en las cabras, los embriones permanecen en la fase de elongación. Durante dicha fase, el trofotodermo produce interferón-tau (IFNT), que, a su vez, es responsable de la inhibición de la luteolisis (la regresión del cuerpo lúteo). Cuando el cuerpo lúteo (el folículo ovárico) está activo, la producción de progesterona (P4) se mantiene, y el endometrio (la membrana mucosa que recubre la pared uterina) se prepara entonces para un eventual embarazo. El estudio también establece que la P4 y el IFNT regulan la transcripción de la Galectina-15 en el epitelio endometrial. La Galectina-15 actuaría en el entorno uterino, dado que

dicha Galectina participa en la fijación/adhesión del trofotodermo del producto de la concepción al endometrio del útero, estimulando por lo tanto respuestas biológicas tales como la adhesión y la migración, que son acontecimientos críticos durante la fase de elongación del blastocisto, y, consecuentemente para la evolución del embarazo.

En un segundo momento, según el estudio de Farmer, J. L. *et al*, 2008 (Galectin-15 (LGALS15) Functions in Trophoctoderm Migration and Attachment), la Galectina-15 estimula la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis, siendo ambos unos acontecimientos importantes durante la fase de implantación. Los autores demostraron que, aunque el gen de la Galectina-15 está presente en las especies ovinas, caprinas y bovinas, el ARNm (ARN mensajero) de la Galectina-15 sólo es expresado en la fase de elongación de las caprinas y de las ovinas, cuya expresión varía según la fase del ciclo de estró. Adicionalmente, se aprecia que la administración de IFNT exógeno mediante una infusión uterina únicamente incrementaría la expresión génica de la Galectina-15 si la hembra recibe un tratamiento con P4, demostrando así la necesidad de usar el IFNT y la P4 conjuntamente como inductores de la transcripción del ARNm de la Galectina-15.

Satterfield, M. C. *et al*, 2006 (Progesterone Regulation of Preimplantation Conceptus Growths and Galectin-15 [LGALS15] in the Ovine Uterus) concluyeron que la P4 induce la expresión génica de numerosas proteínas secretadas por el endometrio, tales como la Galectina-15 y la fosfoproteína secretada 1 (SPP1), que se consideran que son reguladores de la supervivencia y el crecimiento del producto de la concepción, así como de la adherencia celular durante la fase de implantación. En este sentido, el estudio de Burghardt, R. C. *et al*, 2009 (Enhanced Focal Adhesion Assembly Reflects Increased Mechanosensation and Mechanotransduction at Maternal - Conceptus Interface and Uterine Wall During Ovine Pregnancy) menciona que la SPP1 y la Galectina-15 son mecanosensores en la interfaz uterina del entorno-producto de la concepción.

Choe *et al*., Molecular Reproduction and Development 48: 261-266 (1997) únicamente desvelan que el ARNm de la Galectina-1 es expresado abundantemente en los órganos reproductores del ratón, tales como el útero y el ovario, y que la expresión uterina del ARNm de la Galectina-1 es abundante en el momento de la implantación del embrión y está regulada específicamente en el proceso de implantación del embrión. El estudio únicamente proporciona evidencias de que la expresión del gen de la Galectina-1 está bajo el control de los esteroides ováricos en los tejidos uterinos del ratón.

El documento US2007184014 está relacionado con una composición que comprende Galectina-1 o -3, o un fragmento funcional de la misma, para el tratamiento del trastorno de xeroftalmia.

El documento EP1908476 está relacionado con el uso de la Galectina-2 para el tratamiento de un trastorno de la piel.

Siguiendo otra línea de pensamiento, una investigación realizada por Than, N. G. *et al*, 2008 (Emergence of Hormonal and Redox Regulation of Galectin-1 in Placental Mammals: Implication in Maternal-Fetal Immune Tolerance) concluyó que la Galectina-1 muestra un elevado nivel de conservación estructural, propiedades de dimerización y de unión con carbohidratos e integrinas (proteínas de adhesión), lo que sugiere que estas proteínas están conservadas entre los vertebrados y mantienen una expresión génica convencional entre los diferentes tipos de placenta (tanto si es decidual como si no). Los autores también observaron que la Galectina-1 puede impartir una inmunotolerancia materna a los aloantígenos fetales, regula la acción de los linfocitos citolíticos naturales (NK) del útero y actúan como agentes de regulación y moderación de los linfocitos T (los linfocitos T están implicados en la inmunidad celular). Finalmente, los autores confirmaron la acción sinérgica de la P4 en la estimulación de la producción de Galectina-1 por parte del endometrio.

Gracias a los estudios de fertilidad es posible reconocer que el papel de las Galectinas está asociado con la modulación de las respuestas inmunitarias, así como la elongación del embrión y la adhesión del embrión al endometrio.

Se sabe que las galectinas son ligandos de las lectinas de beta-galactósido de mamífero, y pueden ser expresadas por un elevado número de tejidos. Estas lectinas son generalmente solubles y no contienen un péptido de señalización, siendo secretadas por un mecanismo que es independiente del retículo endoplásmico y del complejo de Golgi. A día de hoy existen descripciones de 15 Galectinas de mamífero, todas las cuales tienen un dominio de reconocimiento de carbohidrato con aproximadamente 130 residuos de aminoácidos.

Se sabe que la interacción de las Galectinas con los glicanos de la superficie de las células del sistema inmunitario en el espacio extracelular puede modular la producción de citocinas y de mediadores, la adherencia celular, la apoptosis, la quimiotaxia y la endocitosis. En el entorno intracelular, las Galectinas pueden tomar parte en las rutas de señalización y modular algunas respuestas biológicas, tales como la apoptosis, la regulación del crecimiento celular y el ajuste del pre-ARNm.

Farmer, J. L. *et al*, 2008 (artículo mencionado más arriba) también divulgan que, aparte de la Galectina-15 y de la Galectina-1, otras Galectinas pueden ser expresadas por el endometrio y la placenta de los mamíferos y muestran unas importantes funciones en la diferenciación del endometrio, la implantación del blastocisto y la diferenciación del trofoblasto; asimismo, Poppovich *et al*, 2005 (Galectin-9: a New Endometrial Epithelial Marker for the Mid- and Late-Secretory and Decidual Phases in Human) divulgan las propiedades de la Galectina-9, y Lee *et al*, 1998 (Spatio-

Temporal Pattern for Expression of Galectin-3 in the Murine Utero-Placental Complex? Evidence for Differential Regulation) se refieren a la expresión de la Galectina-3. Adicionalmente, existen otros numerosos artículos en la bibliografía que notifican el potencial uso terapéutico de las Galectinas recombinantes o de los inhibidores específicos de estas proteínas.

5

La Galectina-1 es una molécula multifuncional que participa en procesos biológicos tales como la adhesión, la proliferación, la diferenciación y los ciclos celulares; la apoptosis; el ajuste del ARN; el control de los procesos inflamatorios y la respuesta inmunitaria adaptativa. La expresión endógena de la Galectina-1 ha sido recientemente observada en las células epiteliales del timo, en los linfocitos T cebados con antígeno, en los macrófagos activados, en los linfocitos B activados (implicados en la inmunidad humoral), en las células endoteliales, en las células estromales y en los órganos linfoides murinos tales como el timo y los ganglios linfáticos. En vista de estas propiedades inmunorreguladoras, la Galectina-1 (tanto endógena como exógena) es un mediador importante para prevenir la pérdida fetal y/o la muerte del embrión.

10

15

La Galectina-1 puede ser obtenida a partir de mamíferos (la especie humana, bovina, ovina, caprina, equina y/o porcina) por medio de un sistema de expresión heterólogo en una forma activa, estéril, alquilada y exenta de endotoxinas. El método para la obtención de la Galectina-1 recombinante es ampliamente conocido en la bibliografía y generalmente implica las siguientes etapas: (i) la obtención de un extracto en bruto de bacterias que contienen Galectina-1; (ii) la purificación de la Galectina-1; (iii) la conservación de la actividad de lectina de la Galectina-1 a través de una alquilación con yodoacetamida; y (iv) la eliminación de las endotoxinas bacterianas (LPS) de las preparaciones de Galectina-1 alquiladas con yodoacetamida. Entre las posibilidades divulgadas en la bibliografía para las pruebas realizadas en el presente experimento, hemos producido la Galectina-1 basándonos en los siguientes procedimientos.

20

25

La primera etapa para la obtención de la Galectina-1 recombinante comienza con un cultivo de bacterias (preferentemente la cepa rosetta de *E. coli*) transformadas con un vector de expresión (preferentemente un plásmido pET29a) que contiene el gen de la Galectina-1 en 200 ml de caldo básico LB (Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, Estados Unidos) que contiene 50 µg/ml de ampicilina (USB Corporation, Estados Unidos), que se realiza en un agitador orbital a 200 rpm durante 16-18 horas a 37 °C. Después de este periodo, se transfieren 25 ml de este cultivo a 1 l de un semi LB previamente tratado en el autoclave, que contiene 500 µl de ampicilina (50 µg/ml). Además, esta suspensión de bacterias se incuba de nuevo durante otras 2 horas a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. El índice de crecimiento bacteriano óptimo muestra un intervalo de densidad óptica (DO) de entre 0,5-0,5 a 600 nm. Además, al cultivo se añaden 0,36 g de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG, Promega, WI, Estados Unidos) diluidos en 1 ml de semi LB para inducir la expresión de la Galectina-1 por parte de las bacterias transformadas. El cultivo se realiza de nuevo una vez más en el agitador (37 °C - entre 250 y 300 rpm) durante 4 horas. Después de este periodo, la suspensión de bacterias se centrifuga a 5.000 g durante 15-20 minutos a 4 °C, y el sedimento del cultivo se centrifuga de nuevo a 3.000 g durante 15-20 minutos a 4 °C. Finalmente, se desecha el sobrenadante y el sedimento se almacena a -80 °C hasta el momento de su uso.

30

35

40

La segunda etapa para la obtención de la Galectina-1 recombinante continúa a partir del sedimento bacteriano, que experimenta una descongelación en un baño de hielo y que se resuspende adicionalmente en un tampón de lisis que contiene 7 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato-NaCl (136,8 mM); KCl (2,7 mM); Na₂HPO₄ (6,4 mM); KH₂PO₄ (0,9 mM, pH 7,4); mercaptoetanol 14 mM (2-ME) (Merck-Schuchardt, Alemania), 1 comprimido de inhibidores de la proteasa exentos de EDTA (Roche Diagnostics GmbH, M, Alemania), 1 ml de lisozima - 1 mg/ml (Roche Diagnostics GmbH, M, Alemania), 10 µl de ARNasa A de tipo 3A - 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) y 10 µl de ADNasa I de tipo IV - 10 mg/ml (Sigma-Aldrich) y después experimenta una incubación durante 30 minutos con el tampón de lisis en un baño de hielo. Además, la muestra se somete a ultrasonidos a 5 ciclos de 20 segundos cada uno a 40 W (Sonics Vibra cell; SONICS & MATERIALS INC.); entre los ciclos, la suspensión reposa durante 15 segundos. El lisado bacteriano se centrifuga después a 10.000 g durante 45 minutos a 4 °C. Después se recoge el sobrenadante y experimenta una cromatografía de afinidad sobre una columna de agarosa-lactosa (Sigma-Aldrich) con 5 ml volumen de lecho. El no ligando eluye con un tampón de equilibrado (PBS, añadido desde 2-ME hasta 14 mM, pH 7,4) y se recogen 20 fracciones de 2 ml. El ligando de la columna de afinidad se eluye con un tampón de elución (que contiene lactosa 14 mM, pH 7,4) y se recogen 10 fracciones de 0,5 ml. El procedimiento cromatográfico es monitorizado mediante la lectura de la absorbancia a 280 nm (UV Mini 1240, Shimadzu) y mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida.

45

50

55

Las concentraciones proteicas en las soluciones de Galectina-1 se determinan mediante una espectrometría usando unas lecturas de la absorbancia a 280 nm o los ensayos colorimétricos disponibles en el mercado, y se expresan en miligramos de proteína por mililitro (mg/ml). Las fracciones cromatográficas obtenidas a través de este proceso para la purificación de la Galectina-1 en agarosa-lactosa se analizan mediante una electroforesis (SDS-PAGE - "Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio"). Las muestras contenidas en un tampón de reducción y disociación (volumen final de 20 µl) se aplican al gel de poliacrilamida (15 %) y experimentan un análisis electroforético a un voltaje constante (150 V). Como muestras se usaron las fracciones cromatográficas del lisado bacteriano en bruto y el material no ligado. Como control se usa un patrón de peso molecular conocido (LMWH - Low Molecular Weight Calibration kit for Electrophoresis - GE, Amersham - Biosciences, Uppsala, Suecia). El gel se colorea con "azul brillante de Coomassie". Las soluciones de Galectina-1 obtenidas a partir de la cromatografía sobre agarosa-lactosa se conservan en un tampón de elución con el fin de conservar la actividad de lectina de esta proteína, y se almacenan a -80 °C hasta el momento de su uso. Para el análisis, estas soluciones experimentan una desalinización

60

65

en una columna PD10 a través de una cromatografía de exclusión molecular según las instrucciones del fabricante (Sephadex-G25M; Pharmacia LKB, Uppsala, Suecia). Las concentraciones de las soluciones desalinizadas de Galectina-1 se determinan mediante una espectrometría o una reacción colorimétrica, como se ha descrito anteriormente. Con objeto de evaluar el nivel de conservación de la actividad de lectina (la capacidad de la Galectina-1 de reconocer un azúcar) en la Galectina-1 purificada en resinas de agarosa-lactosa, se desalinizan muestras de esta proteína en una columna PD-10 e inmediatamente se vuelven a cromatografiar en una columna de agarosa-lactosa. Se han recogido 20 fracciones de 1,0 ml cada una. El proceso de elución es monitorizado por medio de la concentración proteica (mg/ml). En este último procedimiento, la elución de la Galectina-1 con un tampón de lavado se considera un indicador de la pérdida de la propiedad de lectina de esta proteína, dado que en dichas condiciones, la Galectina-1 no es capaz de reconocer la lactosa, y por lo tanto, no es retenida en la resina de agarosa-lactosa. La oxidación de los grupos sulfhidrilo de la Galectina-1 y su desnaturalización puede favorecer la pérdida de la actividad de lectina de esta proteína, una propiedad asociada con numerosas funciones de esta molécula. Teniendo en consideración que las soluciones purificadas de Galectina-1 fueron almacenadas a -80 °C y que deben ser descongeladas antes de su uso, debería evaluarse el impacto de dichos procedimientos sobre la actividad hemaglutinante de esta lectina. La hemaglutinación se produce en presencia o en ausencia de un azúcar de hapteno específico para la Galectina-1, es decir, la lactosa (20 mM). Únicamente se usaron las preparaciones de Galectina-1 que muestran actividad hemaglutinante a unas concentraciones de no más de 2 µM en los diferentes ensayos.

La tercera etapa para la preparación de la Galectina-1 recombinante implica el control de la actividad de lectina de las preparaciones alquiladas de esta lectina a través de métodos de hemaglutinación y/u otros que hacen posible la determinación de la conservación del carácter de lectina de estas preparaciones de Galectina-1 recombinante. La oxidación de los grupos sulfhidrilo de la Galectina-1 promueve la desnaturalización y la pérdida de la actividad de lectina de esta proteína. Por lo tanto, con objeto de obtener unas muestras más estables de Galectina-1, las preparaciones de esta lectina experimentan una alquilación con el uso de yodoacetamida, un compuesto reductor que reacciona de una forma covalente con los grupos sulfhidrilo, generando por lo tanto carboxiamidometil-Galectina-1 (Galectina-1 alquilada). En resumen, se diluyen 0,037 g de yodoacetamida (Protein-Iodoacetamida, Sigma-Aldrich; concentración final de 20 µM) en 1,0 ml de una solución purificada de Galectina-1 en presencia de lactosa 100 mM. A continuación, esta solución se incuba en un baño de hielo, protegida de la luz, durante 16-18 horas. Después de la incubación, la solución experimenta una cromatografía de exclusión molecular en PD10 para eliminar la yodoacetamida y la lactosa libres. La concentración de las preparaciones de Galectina-1 alquilada se determina mediante una espectrometría y se expresa en mg/ml, como se ha mencionado más arriba.

La cuarta etapa para la preparación de la Galectina-1 recombinante se refiere a la eliminación de las endotoxinas bacterianas (LPS). Teniendo en consideración que la Galectina-1 se ha obtenido a partir de bacterias gramnegativas, que tienen LPS (lipopolisacárido) en la composición de su pared celular, después de la etapa de alquilación con yodoacetamida, las preparaciones de Galectina-1 experimentan una cromatografía de afinidad sobre una columna de Polimixina B-agarosa (Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel, Pierce, IL, Estados Unidos). La eficacia del procedimiento para la eliminación del LPS de las preparaciones de Galectina-1 alquilada se evalúa mediante la medición de la cantidad de endotoxina LPS a través del uso de un kit QCL-1000 (Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay, Cambrex Company, MD, Estados Unidos). Las preparaciones de Galectina-1 alquilada activa y exenta de endotoxinas experimentan después una esterilización mediante una filtración (membranas de 0,22 µm).

Como se ha divulgado un método para la preparación de Galectina-1 recombinante, debería apreciarse que puede obtenerse cualquier otra lectina de unión al beta-galactósido o derivados de la misma por medio de un procedimiento muy similar.

Por lo tanto, sabiendo que la Galectina-1 juega un importante papel en la modulación de los trastornos inmunitarios, la inhibición de la respuesta inflamatoria y la modulación de las funciones de los linfocitos T tanto en sistemas *in vivo* como *in vitro*, la solicitud de patente US 12/175.227 desvela un método para la modulación de la respuesta inmunitaria de dicha lectina con objeto de prevenir y tratar trastornos inmunitarios, incluyendo el linfoma de Hodgkin.

Con respecto al potencial de interacción con otras moléculas y/o células, se sabe que, en presencia de la Galectina-1, las células dendríticas se vuelven tolerogénicas y capaces de modular una respuesta inmunitaria en mamíferos, previniendo el desarrollo de enfermedades autoinmunes, así como revirtiendo el rechazo de trasplantes. En este sentido, la solicitud de patente US 12/137.004 desvela un método para la preparación de una formulación que comprende células dendríticas en presencia de dicha lectina, con el objeto de tratar neoplasmas y enfermedades autoinmunes e infecciosas.

El estudio de Blois, S. M. *et al*, 2007 (A Pivotal Role for Galectin-1 in Fetomaternal Tolerance) estaba basado en los resultados de un modelo de tratamiento experimental, en el que se administra la Galectina-1 por vía intraperitoneal en ratones isogénicos con objeto de evaluar la pérdida fetal inducida por estrés causada por una exposición al ruido. Se aprecia que la expresión de la Galectina-1 en el útero de los ratones es muy sensible a los cambios medioambientales, comprometiendo por lo tanto el embarazo de las hembras sometidas a estrés. Por otro lado, cuando se trataron los ratones con la Galectina-1 recombinante, se redujo significativamente la ocurrencia de pérdidas fetales.

Se sabe que para mantener un embarazo, el organismo de la madre experimenta unos cambios considerables,

incluyendo cambios hormonales e inmunitarios. Existen pruebas de que la preparación del endometrio para la implantación del embrión no es una simple cuestión de estimulación hormonal, depende de la interacción entre el blastocisto y el endometrio, y también está mediada por las citocinas, los factores de crecimiento y las moléculas de adhesión, que son producidos y secretados por el endometrio y el blastocisto. Aun así, una interacción entre los diferentes sistemas fisiológicos podría dar lugar a una pérdida del embarazo que no puede ser explicada por un único factor aislado.

Desde el punto de vista del mercado agrícola, los mecanismos de la tolerancia inmunitaria materno-fetal en los embarazos que derivan tanto de un apareamiento como de una inseminación artificial todavía suponen un reto para la medicina veterinaria reproductora en vista de la respuesta inmunitaria frente a los aloantígenos fetales.

En este aspecto, debería apreciarse que las pérdidas de embarazos generan pérdidas económicas, con unas consecuencias drásticas para los criadores, que a su vez, deben mantener unos niveles satisfactorios de eficacia reproductiva con objeto de cumplir con las necesidades de los consumidores y mantener la rentabilidad de su propia propiedad.

Adicionalmente, los criadores tanto de ganado lechero como de ganado de carne usan habitualmente técnicas de reproducción para definir el sexo del embrión después de la fertilización. Sin embargo, los embriones producidos *in vitro* que son transferidos adicionalmente al útero de las receptoras no muestran unos índices de supervivencia satisfactorios debido a cambios morfológicos y estructurales que se producen principalmente en el medio de mantenimiento, lo que causa a unas pérdidas precoces del embrión.

Adicionalmente, una de las limitaciones del uso comercial de las biotécnicas de reproducción es la distancia que debe cubrirse entre los sitios de recolección y la deposición de los gametos del macho (semen) o de la hembra (ovocito) donante, o del embrión producido, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Se sabe que la conservación de las funciones celulares está relacionada directamente con la variación en el pH y a la temperatura, entre otras propiedades, y por lo tanto es un reto mantenerlos en unas condiciones óptimas hasta el momento de la transferencia del embrión.

En vista de lo anterior, la presente invención desvela una solución a las actuales dificultades reproductivas que se encuentran fundamentalmente en el mercado agrícola, cuyo objeto principal es promover un aumento en el índice de implantación del embrión en el útero de la madre mediante el suministro en el útero del mamífero de una cantidad eficaz de una lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma.

Objetos de la invención

El objeto de la presente invención es el uso de una cantidad eficaz de una lectina de unión al beta-galactósido o de una forma alquilada de la misma, seleccionada entre la Galectina-1, la Galectina-3, la Galectina-9, la Galectina-13 o la Galectina-15, con objeto de mejorar el índice de implantación del embrión en el útero de una madre no humana, previniendo por lo tanto la eliminación del embrión por parte del sistema inmunitario de la madre.

Otro objeto de la presente invención es la mejora del índice de implantación del embrión en el útero de un mamífero no humano mediante la transferencia de una lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma al tracto reproductor de un mamífero por medio de una inseminación artificial, de una transferencia del embrión *in vitro* o *in vivo*, o de un apareamiento.

Adicionalmente, es un objeto de la presente invención el uso de una cantidad eficaz de una lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma con objeto de promover la fertilización de: (i) semen reciente, enfriado o congelado; (ii) un ovocito reciente, congelado o vitrificado; y (iii) un embrión reciente, congelado o vitrificado de la transferencia del embrión o de una fertilización *in vitro*, o de un embrión clonado no humano o transgénico no humano.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una lectina de unión al beta-galactósido o derivados de la misma para mejorar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.

Finalmente, es un objeto de la presente invención el uso de un producto que comprende una cantidad eficaz de una lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma para mejorar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.

Breve descripción de la invención

Los objetos de la presente invención se consiguen por medio de:

- a) un método para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos, que no es para el tratamiento mediante una cirugía o una terapia llevado a cabo sobre el cuerpo humano o animal, que se caracteriza por que comprende la administración en el útero de un mamífero de una cantidad eficaz de desde 1×10^{-7} mg hasta 1 mg / kg de peso corporal de dicho mamífero, de una forma activa de una lectina de unión al beta-galactósido o de una forma alquilada de la misma, seleccionada entre la Galectina-1, la Galectina-3, la Galectina-9, la

Galectina-13, la Galectina-15 y preferentemente la Galectina-1, simultáneamente o hasta 17 días después de la administración del semen, de un ovocito o de un embrión;

(b) una lectina de unión al beta-galactósido o una forma alquilada de la misma, seleccionada entre la Galectina-1, la Galectina-3, la Galectina-9, la Galectina-13 y la Galectina-15, para su uso como un medicamento para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.

Descripción detallada de la invención

En la presente invención, el índice de implantación se refiere al número de embriones que realmente se adhieren al endometrio de los mamíferos después de la fertilización (la unión del gameto masculino y femenino), tanto si es generado por la tecnología de reproducción asistida como si no.

Los objetos de la presente invención se consiguen suministrando en el útero de la madre de un mamífero, tanto por vía uterina como vaginal, una cantidad eficaz de una forma activa de una lectina de unión al beta-galactósido o de un derivado de la misma en una solución tamponada convencional, sola o mezclada con esperma, un ovocito o un embrión en un medio de mantenimiento.

La solución tamponada aspira a mantener, manipular y transferir el semen, el ovocito o el embrión y preferentemente es un portador formado por una solución salina tamponada (solución salina tamponada con fosfato - PSB) o un suero fisiológico isotónico estéril, estable, exento de endotoxinas, con un pH de entre 6,8 y 7,4.

El medio de mantenimiento es un medio complejo y exento de suero para mantener los embriones bajo el aire atmosférico durante un tiempo variable según la temperatura. Un medio de mantenimiento está formado habitualmente por una solución tamponada isotónica, que contiene aminoácidos esenciales, factores de crecimiento, enzimas, sustratos energéticos, nutrientes celulares y antibióticos.

Un ejemplo de un medio de mantenimiento es un agente de dilución, es decir, un líquido de dilución que se añade o se mezcla con el semen para conservar la capacidad de fertilización de este último. Algunos agentes de dilución especiales para la congelación también tienen propiedades criogénicas, permitiendo así el transporte, la congelación y la descongelación. Los agentes de dilución consisten en un tampón isotónico, sustratos energéticos y nutrientes celulares, antibióticos, antioxidantes y crioprotectores.

Los objetos de la presente invención también pueden conseguirse suministrando, de una forma simultánea o consecutiva, una lectina de unión al beta-galactósido o un derivado de la misma, junto con el semen, el ovocito o el embrión, en el útero de un mamífero (estas etapas serán adicionalmente definidas).

Algunas de las ventajas proporcionadas por la presente invención son como sigue: un aumento en la eficacia reproductiva de la ganadería; mejoras cualitativas y cuantitativas en la progenie; una reducción en el tiempo transcurrido entre el nacimiento y el sacrificio; unos costes de alimentación reducidos; un aumento en la posibilidad de heterocigosis; mejoras en la manipulación y una reducción en los costes técnicos, sanitarios y reproductivos; entre otros aspectos que se describirán más tarde en el presente documento.

La presente invención comprende el uso de una lectina de unión al beta-galactósido o de una forma alquilada de la misma, seleccionada entre la Galectina-1, la Galectina-3, la Galectina-9, la Galectina-13 y la Galectina-15, para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.

El aumento en el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos por medio de las biotecnologías reproductivas refleja directamente la viabilidad del uso de dichos procedimientos como una herramienta para el progreso genético, teniendo en consideración que mejora los resultados y/o el éxito de las técnicas hasta unos niveles económicamente viables.

Adicionalmente, es mejor usar material genético de individuos genéticamente superiores en las biotécnicas reproductivas, dado que maximiza la diseminación de estos animales y proporciona una alternativa a la escasez de individuos claramente superiores. Las biotecnologías reproductivas también permiten una reducción en los intervalos de generación.

Además, uno de los retos globales de hoy en día es vencer la hambruna en un Mundo en el que las áreas de tierra cultivable están reduciéndose y con un crecimiento estimado de población del 50 % en los próximos 25 años. Por lo tanto, un aumento en el índice de implantación de los embriones en el útero de la madre de especies bovinas, porcinas, ovinas y otras significa un aumento en la producción de alimentos como un todo, lo que incluye la producción de carne, cuya demanda se estima que se duplicará en los próximos 25 años, alcanzando más de 127 millones de toneladas por año.

El impacto del aumento en el índice de implantación de los embriones en el útero de mamíferos en rebaños productivos es como sigue:

- Mejoras cualitativas y cuantitativas en la progenie - en el ganado vacuno, tanto en peso como en calidad -, un aumento en la ganancia diaria de peso, una mejora en la calidad de la veta, la ternura, el sabor de la carne y también una mejora en la producción de cortes de primera calidad, que añade más valor al producto final. En los rebaños lecheros, proporciona un aumento en la productividad y una mejora en la calidad de la leche.
- También proporciona una reducción en el tiempo transcurrido hasta el sacrificio, es decir, el aumento en la ganancia de peso diaria que deriva de la mejora en el material genético reduce el tiempo transcurrido entre el nacimiento y el sacrificio en hasta un 30 %. Por lo tanto, el crecimiento temprano de los animales está aumentado significativamente.
- Una reducción en los costes de la alimentación: a pesar del aumento en las inversiones necesarias para conseguir una calidad genética superior, hay una consideración más que satisfactoria con la reducción en los costes de producción del animal, debido fundamentalmente al aumento en la precocidad, que reduce el tiempo transcurrido hasta el sacrificio. En vista de lo anterior, los costes de producción se reducen en al menos un 10 %.
- Aumento en la probabilidad de heterocigosis: se hace más viable cruzar razas de ganado que no están adaptadas al clima tropical de Brasil, pero que proporcionan mejoras en el cuerpo, la precocidad y la fecundidad del rebaño.
- Mejoras en la manipulación y una reducción en los costes técnicos, sanitarios y reproductivos: el uso de biotecnologías reproductivas proporciona unas condiciones sanitarias mejores dado que evita la diseminación de enfermedades de transmisión sexual en el ganado, reduciendo los costes de los fármacos para el tratamiento de enfermedades, y reduciendo por lo tanto los costes de producción.

Más particularmente, la presente invención es el resultado de las pruebas de la transferencia de embriones producidos *in vivo* en vacas con objeto de mostrar un aumento en el índice de implantación de los embriones en el útero de mamíferos en presencia de Galectina-1.

Ejemplos

Se administró una única dosis de 100 µg en 22 µl de una Galectina-1 humana recombinante estéril, activa, alquilada y exenta de endotoxinas a las receptoras del embrión a través de la vía uterina. Debería apreciarse que la dosis anterior está drásticamente reducida en comparación con el peso corporal del bovino y favorece los aspectos de bioseguridad de las hembras tratadas, que, al contrario que los ratones (usados habitualmente como animales de experimentación), tienen al cuerpo preparado para un único embarazo cada vez.

Con objeto de evaluar los efectos de la Galectina-1 como agente regulador de la fertilidad en mamíferos, hemos usado animales no isogénicos confinados, con unas condiciones de manipulación normales.

Las hembras bovinas donantes experimentaron una superovulación y fueron inseminadas el D0 (día cero) de la fertilización. En paralelo, las receptoras experimentaron unos protocolos de sincronización del estro con objeto de ovular el D0.

El D7 (el día 7), las donantes entran en la fase de recolección y evaluación de los embriones en el estadio de mórula y/o de blastocisto. Los embriones malos (grado 3), buenos (grado 2) y excelentes (grado 1) fueron embotellados con objeto de ser transferidos, el mismo día, a las receptoras, que habían sido previamente seleccionadas según el desarrollo del cuerpo glúteo.

En general, la clasificación del embrión se lleva a cabo teniendo en cuenta parámetros morfológicos, y engloba tres estadios principales identificados según su fase de desarrollo. En el mejor, el embrión no debe tener fragmentos visibles y las células deben tener un tamaño homogéneo. También debe apreciarse que no todos los embriones con una morfología excelente están enteramente sanos, debido a que están sometidos a unas condiciones relacionadas con el óvulo, el espermatozoide y el propio proceso de fertilización.

Los embriones, en una columna de medio de mantenimiento TQC® y Galectina-1 diluida en suero fisiológico estéril en otra columna (el embrión no entra en contacto con la solución de Galectina en el momento del embotellado), fueron embotellados en la misma cánula y transferidos al útero de las receptoras, sincronizadas con las donantes, con la ayuda de una pipeta de inseminación. Todo el contenido de la cánula es transferido de una vez, y, en esta realización, los embriones y la Galectina-1 alcanzan el útero de la receptora de una forma individual y simultánea.

El propósito de estas prueba será analizar el número de implantaciones de embrión confirmadas en el útero del mamífero 30 y 60 días después de la fecha de transferencia del embrión en (i) las receptoras que recibieron un tratamiento local con Galectina-1 (ii) las receptoras de un embrión transferido sin la presencia de Galectina-1. Con este fin, las receptoras de un embrión transferido se dividieron en dos grupos distintos para cada apareamiento (donante x semen), como sigue: el **Grupo de Control** (embriones sin la presencia de Galectina-1) y el **Grupo Tratado** (embriones con la presencia de Galectina-1).

El diagnóstico del embarazo se llevó a cabo tanto en el Grupo Tratado como en el Grupo de Control mediante un análisis con ultrasonidos en dos momentos distintos: la primera medición se llevó a cabo 30 días después de la transferencia del embrión (representada en la siguiente tabla como "P30") y la segunda evaluación del índice de implantación del embrión en el útero de un mamífero se llevó a cabo 60 días después de la transferencia del embrión

(representada en la siguiente tabla como "P60").

Metodología

- 5 Las receptoras eran hembras bovinas con una buena producción de leche y unas clasificaciones reproductivas conocidas. Las receptoras eran hembras Hplstein con una buena producción de leche y unas clasificaciones reproductivas conocidas.

10 El procedimiento para la selección del apareamiento se refiere a la elección del animal de reproducción (dosis de semen) para cada donante. Después de la recolección y la evaluación de los embriones, se transfirió aproximadamente la mitad de los embriones generados al útero de las receptoras pertenecientes al GRUPO DE CONTROL y la otra mitad de los embriones se transfirió al útero de las receptoras pertenecientes al GRUPO TRATADO. Se realizó un esfuerzo por dividir equitativamente los embriones, según el grado de calidad mostrado, entre el GRUPO DE CONTROL y el GRUPO TRATADO, con objeto de hacer los grupos comparables.

15 Metodología: GRUPO DE CONTROL

20 El procedimiento de transferencia del embrión en el Grupo de Control se llevó a cabo según la metodología tradicional para dichos acontecimientos, es decir, la transferencia del embrión se produjo en la trompa de Falopio ipsilateral al cuerpo lúteo (donde se produjo la ovulación en el momento del estro) de las receptoras. La cánula usada, que consiste en tres columnas principales, empaquetaba una columna de medio de mantenimiento TQC®, seguido de una columna de aire, seguido de una columna de medio de mantenimiento TQC® que contiene el embrión, seguido de otra columna de aire, seguido de otra columna de medio de mantenimiento TQC®. La totalidad del contenido de la cánula se transfirió de una vez.

25 Metodología: GRUPO TRATADO

30 El procedimiento de transferencia del embrión en el Grupo Tratado se llevó a cabo según la metodología tradicional, es decir, la transferencia del embrión se produjo en la trompa de Falopio ipsilateral al cuerpo lúteo (donde se produjo la ovulación en el momento del estro) de las receptoras. La cánula usada, que consiste en tres columnas principales, empaquetaba una columna de medio de mantenimiento TQC®, seguido de una columna de aire, seguido de una columna de medio de mantenimiento TQC® que contiene el embrión, seguido de otra columna de aire, seguido de otra columna de medio de mantenimiento que contiene Galectina-1. Todo el contenido de la cánula se transfirió de una vez, y, en esta realización, los embriones y la Galectina-1 alcanzaron el útero de la receptora de una forma individual y simultánea.

40 Resultados: en las dos tablas ilustradas a continuación, la primera columna de la izquierda (*Repetición*) indica las repeticiones de las transferencias de los embriones generados por cada hembra bovina, correspondientes a un total de 12 repeticiones. Mientras tanto, las otras dos columnas están subdivididas para separar los resultados obtenidos en vista del Grupo de Control y del Grupo Tratado, seguidas de otras dos columnas que muestran la relación entre los índices del índice de implantación adicional del embrión en el útero de las receptoras obtenido con el uso de Galectina-1 en el procedimiento.

45 La columna correspondiente al "*Control de calidad*" indica el número de embriones generados a partir de la transferencia de los embriones sin la presencia de Galectina-1. La siguiente columna de la derecha (*Control P30*) está subdividida para mostrar tanto el número de implantaciones 30 días después de la transferencia del embrión (*Cantidad 30*) con respecto al respectivo porcentaje correspondiente al índice de implantación durante el mismo periodo (T30). Se usa el mismo razonamiento para la siguiente columna de la derecha (*Control P60*), subdividida con objeto de mostrar tanto el número de implantaciones 60 días después de la transferencia del embrión (*Cantidad 60*) como el respectivo porcentaje correspondiente al índice de implantación durante el mismo periodo (T60).

55 La columna correspondiente a la "*Cantidad tratada*" indica el número de embriones generados a partir de la transferencia de los embriones en presencia de Galectina-1. La siguiente columna de la derecha (*Tratada P30*) está subdividida para mostrar tanto el número de implantaciones 30 días después de la transferencia del embrión (*Cantidad 30*) con respecto al respectivo porcentaje correspondiente al índice de implantación durante el mismo periodo (T30). Se usa el mismo razonamiento para la siguiente columna de la derecha (*Tratada P60*), subdividida con objeto de mostrar tanto el número de implantaciones 60 días después de la transferencia del embrión (*Cantidad 60*) como el respectivo porcentaje correspondiente al índice de implantación durante el mismo periodo (T60).

60 La columna correspondiente al " Δ índice de implantación" está subdividida para indicar la diferencia en el índice de implantación obtenido con el Grupo de Control y con el Grupo Tratado P30 (Δ 30), así como con el Grupo de Control y el Grupo Tratado P60 (Δ 60).

Tablas:

Tabla 1: resultados del índice de implantación de los embriones de grado 1, 2 y 3 del Grupo de Control (transferencia del embrión sin la presencia de Galectina-1) y del Grupo Tratado (transferencia del embrión en presencia de Galectina-1) después de 30 y de 60 días, respectivamente.

Repetición	Cantidad de control	Control P30 Cantidad 30 T30	Control P60 Cantidad 60 T60	Cantidad tratada	Tratada P30 Cantidad 30 T30	Tratada P60 Cantidad 60 T60	Δ índice de implantación Δ 30	Δ 60
# 01	16	6	37,5 %	4	25,0 %	5	33,3 %	-4,2 %
# 02	11	5	45,5 %	4	36,4 %	8	53,3 %	7,9 %
# 03	6	4	66,7 %	4	66,7 %	3	75,0 %	8,3 %
# 04	19	7	36,8 %	6	31,6 %	13	72,2 %	35,4 %
# 05	6	3	50,0 %	3	50,0 %	7	100,0 %	50,0 %
# 06	10	5	50,0 %	5	50,0 %	8	72,7 %	22,7 %
# 07	9	7	77,8 %	5	55,6 %	10	58,8 %	19,0 %
# 08	1	1	100,0 %	-	-	2	100,0 %	-
# 09	8	5	62,5 %	5	62,5 %	5	83,3 %	20,8 %
# 10	6	2	33,3 %	1	16,7 %	4	40,0 %	6,7 %
# 11	5	-	-	-	-	2	40,0 %	40,0 %
# 12	6	-	-	-	-	3	50,0 %	50,0 %
TOTAL	103	45	43,7 %	37	35,9 %	70	60,3 %	16,7 %
						58	50,0 %	14,1 %

Según se observa en la Tabla 1, el análisis de los resultados totales demuestra que 30 días después de la transferencia del embrión, el Grupo Tratado mostraba unos mayores índices de implantación en el útero de la madre, con un 60,3 % de implantación con respecto al 43,7 % del Grupo de Control. El análisis del resultado final 60 días después de la transferencia del embrión demostró que los índices del Grupo Tratado tenían una implantación del 50 % en el útero de la madre, mientras que el Grupo de Control tenían un 35,9 %.

En vista de los resultados de la Tabla 1, es posible concluir que el uso de Galectina-1 aumentó el número de implantaciones del embrión en el útero de la madre en 16,7 puntos porcentuales después de 30 días y en 14,1 puntos porcentuales después de 60 días.

Tabla 2: resultados del índice de implantación teniendo en consideración únicamente los embriones de grado 2 del Grupo de Control (transferencia del embrión sin la presencia de Galectina-1) y del Grupo Tratado (transferencia del embrión en presencia de Galectina-1) después de 30 y de 60 días, respectivamente.

Repetición	Cantidad de control	Control P30		Control P60		Cantidad tratada	Tratada P30		Tratada P60		Δ Índice de embarazo	
		Cantidad 30 T30	Cantidad 30 T30	Cantidad 60 T60	Cantidad 60 T60		Cantidad 30 T30	Cantidad 30 T30	Cantidad 60 T60	Cantidad 60 T60	Δ 30	Δ 60
# 01	11	4	36,4 %	3	27,3 %	14	5	35,7 %	5	35,7 %	-0,6 %	8,4 %
# 02	9	4	44,4 %	3	33,3 %	12	6	50,0 %	6	50,0 %	5,6 %	16,7 %
# 03	5	3	60,0 %	3	60,0 %	4	3	75,0 %	2	50,0 %	15,0 %	-10,0 %
# 04	12	4	33,3 %	4	33,3 %	11	8	72,7 %	6	54,5 %	39,4 %	21,2 %
# 05	4	2	50,0 %	2	50,0 %	4	4	100,0 %	4	100,0 %	50,0 %	50,0 %
# 06	3	1	33,3 %	1	33,3 %	5	3	60,0 %	2	40,0 %	26,7 %	6,7 %
# 07	5	3	60,0 %	2	40,0 %	10	6	60,0 %	5	50,0 %	-	10,0 %
# 08	1	1	100,0 %	-	-	1	1	100,0 %	1	100,0 %	-	100,0 %
# 09	3	3	100,0 %	3	100,0 %	1	1	100,0 %	1	100,0 %	-	-
# 10	4	1	25,0 %	-	-	7	2	28,6 %	2	28,6 %	3,6 %	28,6 %
# 11	4	-	-	-	-	3	2	66,7 %	1	33,3 %	66,7 %	33,3 %
# 12	2	-	-	-	-	2	1	50,0 %	1	50,0 %	50,0 %	50,0 %
TOTAL	63	26	41,3 %	21	33,3 %	74	42	56,8 %	36	48,6 %	15,5 %	15,3 %

Los resultados indicados en la Tabla 2 demostraron que el Grupo Tratado tenía un mayor número de implantaciones en el útero de la madre, con un índice de implantación del 56,8 % con respecto al 41,3 % de implantación conseguido por el Grupo de Control 30 días después de la transferencia del embrión de embriones de grado 2. El análisis del resultado final 60 días después de la transferencia de embriones de grado 2 demostró que los índices del Grupo Tratado tenían una implantación del 48,6 % en el útero de la madre, mientras que el Grupo de Control tenía un índice del 33,9 %.

En vista de los resultados mostrados en la Tabla 2, es posible concluir que la Galectina-1 suministrada en el útero de una receptora bovina del Grupo Tratado aumentó el número de implantaciones en 15,5 puntos porcentuales después de 30 días y en 15,3 puntos porcentuales después de 60 días, mejorando el índice de implantaciones de embriones de grado 2 en el útero de las vacas.

Teniendo en consideración que, en este experimento, la Galectina-1 recombinante humana actúa como un antígeno en el útero de la madre de los bovinos, fundamentalmente debido a que procede de una especie diferente, se están realizando estudios con objeto de demostrar (i) una mayor interacción entre las Galectinas y los glicanos de la misma especie, y, consecuentemente, (ii) un mejor comportamiento de la Galectina-1 en el aumento del índice de implantación del embrión en el útero de la madre de los mamíferos.

Los mecanismos fisiológicos desencadenados por la Galectina-1 que hacen posible aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos todavía están siendo estudiados, dado que los embarazos de las receptoras bovinas a las que se les habían transferido los embriones todavía no habían llegado a término.

En los bovinos, la placenta tiene numerosas unidades con diferentes tamaños y formas, que a su vez consisten en una oleada de vellosidades fetales interdigitadas con invaginaciones criptiformes reunidas en el útero. Para el mantenimiento del embarazo, el embrión debe participar enviando señales de su existencia en el entorno uterino a través de la producción de IFNT. Por lo tanto, la luteolisis permanece inhibida, y consecuentemente, los niveles de P4 se mantienen altos. Por lo tanto, tanto el IFNT como la P4 estimulan al ARNm para que aumente el nivel de las Galectinas en el útero. Después de que el entorno materno reconozca y acepte al embrión, las células de trofoblasto se diferencian y se unen a las células del epitelio uterino, entrando por lo tanto en contacto directo con los tejidos maternos.

Por lo tanto, se cree que el aumento en el índice de implantación del embrión en el útero de la madre de los mamíferos se explica por la participación de la Galectina-1 en la regulación de los mecanismos relacionados con la tolerancia inmunitaria y/o en la promoción del proceso de elongación del blastocisto y de la adhesión del embrión al endometrio.

La presente invención desvela adicionalmente que puede usarse una lectina de unión al beta-galactósido o un derivado de la misma, seleccionado preferentemente entre la Galectina-1, la Galectina-3, la Galectina-9, la Galectina-13 o la Galectina-15, o un derivado de las mismas, para que actúe como un agente para regular la fertilidad del semen, de los ovocitos o de los embriones, aumentando así el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.

La cantidad de lectina de unión al beta-galactósido o de un derivado de la misma que es suministrada en el útero de la madre de un mamífero puede variar según el peso corporal de la especie, y su índice de concentración debería variar preferentemente entre 0,0000001 y 1,0 mg por kilogramo de peso corporal del mamífero.

En una realización, se diluye la lectina de unión al beta-galactósido o un derivado de la misma en una solución tamponada, preferentemente solución salina tamponada con fosfato (PBS) o suero fisiológico, y se suministra en el útero por medio de una cánula convencional mezclada con semen, un ovocito o un embrión mantenido en un medio de mantenimiento (capaz de mantener la supervivencia de las células y la integridad biológica durante la manipulación, el transporte, la congelación y la descongelación), de forma que la totalidad del contenido de la cánula sea suministrada en el útero del mamífero de una vez.

En una variación preferida, la lectina de unión al beta-galactósido o un derivado de la misma se empaqueta en dos etapas, de una forma individual y posterior al semen, al ovocito o al embrión, y, en este procedimiento, se usan dos cánulas de llenado. En la primera aplicación, se coloca el semen, el ovocito o el embrión en un medio de mantenimiento y se empaqueta en una cánula convencional, de forma que todo el contenido es suministrado en el útero del mamífero. En la segunda aplicación, la lectina de unión al beta-galactósido o un derivado de la misma diluido en una solución tamponada se empaqueta en una cánula diferente, y posteriormente, es suministrada en el útero del mamífero. El tiempo transcurrido entre el suministro de la lectina de unión al beta-galactósido o de un derivado de la misma y el suministro del esperma, del ovocito o del embrión dependerá esencialmente de la especie de mamífero en cuestión y del método de tratamiento empleado, y puede prolongarse hasta 17 días según el tratamiento que se esté empleando.

También se divulga que la lectina de unión al beta-galactósido o un derivado de la misma, diluida en una solución tamponada, se empaqueta en una columna de una cánula convencional dada, intercalada entre otras columnas que contienen esperma, un ovocito o un embrión en un medio de mantenimiento, de forma que todo el contenido de la cánula será suministrado posteriormente en el útero del mamífero.

En todas las variaciones proporcionadas, la lectina de unión al beta-galactósido o un derivado de la misma, junto con el semen, el ovocito o el embrión, es administrada a través de la vía uterina o vaginal. El semen puede ser reciente, o estar enfriado o congelado; el ovocito puede ser reciente, o estar enfriado o congelado; y el embrión puede ser reciente, o estar enfriado o vitrificado, y también puede ser de la transferencia del embrión, de la fertilización *in vitro*, así como un clon o un embrión transgénico.

Además, se sabe que los sistemas de producción de embriones *in vitro* permiten la determinación del sexo del embrión después de la fertilización, y por lo tanto dichos sistemas son una herramienta importante para los criadores de ganado lechero y de ganado vacuno. No obstante, los embriones producidos *in vitro* no muestran unos índices de supervivencia satisfactorios en el útero de mamíferos. Por lo tanto, la presente invención proporciona una solución para la regulación de la fertilidad del semen, del ovocito o del embrión fertilidad, aumentando por lo tanto el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.

Por otro lado, una de las limitaciones para la aplicación comercial de las biotecnologías de reproducción es la distancia que existe entre la ubicación para la recolección del semen, del ovocito o del embrión del donante y la ubicación en la que está la especie receptora; así como la distancia que separa la especie donante de la especie receptora. En este sentido, la criopreservación (el proceso de congelación) y la vitrificación (un método de congelación ultrarrápida) se han convertido en una práctica habitual en la producción animal. Sin embargo, aunque las técnicas de criopreservación y de vitrificación tienen unas ventajas comerciales, los espermatozoides pueden experimentar cambios en la membrana, una capacidad temprana, cambios en el ADN y un estrés oxidante durante la congelación, lo que compromete su fertilidad.

En una realización preferida, la presente invención desvela el uso de un producto que comprende una cantidad eficaz de una lectina de unión al beta-galactósido o de derivados de la misma para mejorar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.

Como se han divulgado numerosos ejemplos de las realizaciones preferidas, debería entenderse que el ámbito de la presente invención engloba otras posibles realizaciones, y únicamente está limitado por el contenido de las reivindicaciones anexas, que incluyen en las mismas los posibles equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos, que no es para el tratamiento mediante una cirugía o una terapia realizada sobre el cuerpo humano o animal, que está caracterizado por que comprende la administración en el útero de un mamífero de una cantidad eficaz de entre 1×10^{-7} mg y 1 mg / kg de peso corporal de dicho mamífero de una forma activa de la lectina de unión al beta-galactósido o de una forma alquilada de la misma, seleccionada entre la Galectina-1, la Galectina-3, la Galectina-9, la Galectina-13, la Galectina-15 y preferentemente la Galectina-1, simultáneamente con, o hasta 17 días después de, la administración del semen, de un ovocito o de un embrión.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la forma activa de una lectina de unión al beta-galactósido o de una forma alquilada de la misma está en forma de una solución tampón isotónica, estéril, estable, exenta de endotoxina que tiene un pH de entre 6,8 y 7,4.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que la solución tamponada se selecciona entre una solución salina tamponada fosfato (PBS) o suero fisiológico.
4. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la lectina de unión al beta-galactósido o una forma alquilada de la misma se suministra en el útero del mamífero mezclada con el semen, el ovocito o el embrión.
5. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la lectina de unión al beta-galactósido o una forma alquilada de la misma se suministra en el útero del mamífero junto con el semen, el ovocito o el embrión, tanto por separado como simultáneamente.
6. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la lectina de unión al beta-galactósido o una forma alquilada de la misma se suministra en el útero del mamífero junto con el semen, el ovocito o el embrión, tanto por separado como simultáneamente.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado por que la lectina de unión al beta-galactósido o una forma alquilada de la misma se suministra en el útero del mamífero junto con y el semen, el ovocito o el embrión de una forma posterior, y el intervalo de tiempo entre el suministro de la lectina de unión al beta-galactósido o de una forma alquilada de la misma y el suministro del semen, del ovocito o del embrión se extiende hasta 17 días.
8. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que el semen, el ovocito o el embrión se proporciona en un medio de mantenimiento.
9. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que el semen es reciente, o está enfriado o congelado.
10. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que el embrión es reciente, o está enfriado o vitrificado y procede de la transferencia de un embrión (TE), de una fertilización *in vitro* (FIV), de un clon no humano o de un embrión transgénico no humano.
11. Método según la reivindicación 8, caracterizado por que el ovocito es reciente, o está enfriado o vitrificado.
12. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que la lectina de unión al beta-galactósido o una forma alquilada de la misma, junto con el semen, el ovocito o el embrión, se administra a través de la vía uterina o vaginal.
13. Una lectina de unión al beta-galactósido o una forma alquilada de la misma, seleccionada entre la Galectina-1, la Galectina-3, la Galectina-9, la Galectina-13 y la Galectina-15, para su uso como un medicamento para aumentar el índice de implantación del embrión en el útero de mamíferos.