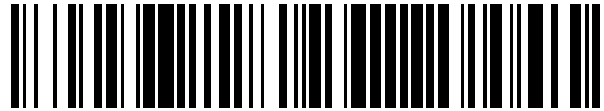


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 457**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/075** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2015 PCT/BE2015/000068**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016 WO16094970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2015 E 15853633 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3234112**

54 Título: **Maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamíferos**

30 Prioridad:

**19.12.2014 EP 14199324**

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

**21.07.2020**

73 Titular/es:

**VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL (100.0%)  
Pleinlaan 2  
1050 Brussel, BE**

72 Inventor/es:

**ROMERO, SERGIO;  
SANCHEZ, FLOR y  
SMITZ, JOHAN**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 774 457 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

Maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamíferos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para tecnología de reproducción asistida en mamíferos. Específicamente, la invención se refiere a composiciones y métodos para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamíferos.

Antecedentes de la invención

10 En la práctica de la infertilidad humana, las tecnologías clásicas de fertilización in vitro (FIV) o inyección de espermia intracitoplasmática (ICSI) todavía se usan después de la superovulación con terapias hormonales costosas para obtener folículos grandes (es decir, de al menos 17 mm de diámetro). Tanto los costos de las hormonas, su riesgo asociado de complicaciones agudas y a largo plazo y el inconveniente de las repetidas visitas al hospital para controlar el crecimiento del folículo incitan al desarrollo de un procedimiento terapéutico menos costoso y mejor tolerado para parejas infértiles con una reserva folicular normal/alta.

15 La maduración in vitro de los ovocitos (MIV) es una técnica que permite madurar ovocitos en estadio de vesícula germinal (GV) que están encerrados en una capa de corona-cúmulo firmemente condensada (complejos cúmulo-ovocito (COC)). Estos ovocitos se pueden obtener mediante punción con aguja guiada por ultrasonido antes de que la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) desencadene la ovulación o poco después de la administración de hCG. Por lo tanto, la MIV de ovocitos tiene el potencial de simplificar el tratamiento de fertilidad o reducir los riesgos y costos relacionados con la estimulación hormonal (hCG) en pacientes con reserva folicular ovárica normal o alta. Esta reserva folicular se determina rutinariamente mediante la medición de los niveles de la hormona antimülleriana y mediante el recuento de folículos guiado por ultrasonido en el día 3 del ciclo menstrual.

20 Para la MIV de ovocitos, usando punción con aguja guiada por ultrasonido, los ovocitos pueden recogerse de folículos pequeños (<10 mm), en ovarios mínimamente estimulados o no estimulados y madurar in vitro. Sin embargo, interferir con el desarrollo normal del ovocito en una etapa temprana de desarrollo (por ejemplo, cuando el folículo solo ha alcanzado un diámetro de 10 mm o menos) no solo produce menos ovocitos maduros, sino que también disminuye el desarrollo y la implantación de embriones posteriores. En particular, la tasa de implantación exitosa por embrión después de la MIV suele ser inferior al 10% y es solo la mitad de exitosa que la tasa que se informa para un procedimiento de FIV o ICSI de rutina. La tasa de pérdida temprana del embarazo parece ser variable, pero generalmente es mayor que después de la FIV/ICSI. Para los pacientes humanos, la tasa de maduración meiótica reducida (50%) actualmente forma un importante cuello de botella de las tecnologías de MIV actuales, junto con la deficiencia observada en el desarrollo embrionario de los ovocitos maduros (De Vos et al., *Fertil. Steril.* 2011; 96(4) 860-864; Guzmán et al., *Fertil. Steril.* 2012; 98 (2): 503-507). Por lo tanto, el potencial de desarrollo reducido y la tasa de implantación de embriones MIV deben abordarse antes de que el método pueda ser ampliamente aceptado.

35 La piedra angular de la cultura de la MIV es la provisión de un entorno apropiado para el logro de la competencia de desarrollo. Esto requiere principalmente una intervención hormonal y la activación de las vías de señalización necesarias mediante el uso de compuestos químicos que permiten la sincronización de los procesos de maduración nuclear y citoplasmática dentro del ovocito. La razón de un periodo prolongado de maduración de ovocitos in vitro es promover una interacción más larga entre el ovocito inmaduro y las células del cúmulo adecuadamente acondicionadas.

40 Las rutas de señalización entre las células foliculares y los ovocitos responsables de la detención meiótica han sido ampliamente investigadas. La detención meiótica se mantiene mediante la producción de altos niveles de adenosina monofosfato cíclico (cAMP). La concentración de cAMP intraocito está regulada por la actividad de las enzimas fosfodiesterasa (PDE) que degradan el cAMP. Estudios recientes mostraron que cGMP se produce en las células del cúmulo tras la activación del receptor de péptido natriurético acoplado a guanilil ciclasa tipo 2 (NPR2). La actividad de NPR2 es inducida por su ligando precursor de péptido natriurético C (NPPC), que se sintetiza principalmente por las células de la granulosa mural y se escinde en el péptido natriurético tipo C (CNP). Luego, cGMP se transfiere al ovocito donde inhibe la hidrólisis de cAMP por la fosfodiesterasa PDE3A. Esta inhibición mantiene una alta concentración de cAMP y, por lo tanto, bloquea la progresión meiótica. (Tsafiri et al. *Dev. Biol.* 1996, 178(2): 393-402; Conti et al., *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998, 145(1-2): 9-14; Conti et al., *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002, 187(1-2): 153-159). Además, el documento WO 2004035766 describe métodos para la sincronización in vitro de la maduración nuclear y citoplasmática de ovocitos de vesículas germinales usando inhibidores de PDE3, tales como DDMP (4,5-dihidro-6-(5,6-di-metoxi-benzofurofen-2-il)-5-metil-3(2H)-piridazinona).

55 La interferencia farmacológica con los niveles de cAMP en el ovocito maduro in vitro, derivado de diferentes especies como ratón, bovino, humano, se ha intentado previamente para promover la detención meiótica de los ovocitos y permitir la adquisición de la competencia de los ovocitos (Nogueira et al. *Biol. Reprod.* 2003, 69(6): 2045-2052; Thomas et al. *Biol. Reprod.* 2004, 71(4): 1142-1149; Shu et al. *Hum. Reprod.* 2008, 23(3): 504-513; Vanhoutte et al. *Hum. Reprod.* 2009, 24(3): 658-669). Sin embargo, no se han reportado mejoras importantes a nivel del potencial de desarrollo embrionario.

Recientemente, la vía de señalización CNP/NPR2 ha demostrado ser un mecanismo regulador crucial en el mantenimiento de la detención meiótica de ovocitos en folículos medianos y completamente desarrollados (Zhang et al. J. Cell. Physiol. 2015, 230(1): 71-81; Sato et al. Mol. Endocrinol. 2012, 26: 1158-1166, Franciosi et al. Biol. Reprod. 2014, 91(3): 61, Santiquet et al. Biol. Reprod. 2014, 91(1): 16). Sin embargo, el principal problema en los estudios mencionados anteriormente es que los COC solo pueden conservarse durante un corto tiempo en la detención meiótica y, por lo tanto, la maduración in vitro de folículos medianos a grandes fue exitosa y la maduración de los folículos antrales precoces pequeños ha fallado. Por lo tanto, actualmente es un gran desafío retrasar el inicio de la reanudación meiótica de pequeños folículos antrales tempranos para mejorar su proceso de MIV. En particular, dicho protocolo no debería afectar la maduración in vitro adicional. Este desafío es aún mayor para los pequeños folículos antrales tempranos, ya que necesitan obtener o retener la capacidad de completar la maduración nuclear (es decir, pasar del nucléolo no rodeado (NSN) a la etapa de nucléolo rodeado (SN)) antes de pasar a las siguientes etapas de desarrollo potencial, o incluso mantener la interconexión entre los ovocitos y los cúmulos, lo que permite la transferencia de los nutrientes del cúmulo (por ejemplo, carga de ARN).

#### Compendio de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para la tecnología de reproducción asistida en mamíferos. En particular, la presente invención proporciona composiciones y métodos para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito inmaduro (COC), mejorando así el resultado de la embriología.

En el contexto de la presente invención, el COC inmaduro de mamífero se recoge sin estimulación previa con hCG o después de la estimulación con hCG. En una realización preferida, cualquier desencadenante, incluidas altas dosis de FSH, LHRH y sus agonistas, análogos de LH o LH recombinantes, se evitan antes de la recolección de COC in vivo.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un medio de capacitación para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero (COC), comprendiendo dicho medio 1 a 50 nM de péptido natriurético tipo C (CNP), estradiol y FSH. En una realización particular, el medio de capacitación comprende 10 a 25 nM de CNP, incluso más en particular 25 nM de CNP.

En una realización específica, el medio de capacitación comprende 1 a 1000 nM de estradiol, más preferiblemente 10 nM de estradiol. En otra realización, el medio de capacitación comprende 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, en particular 1 a 5 mUI/ml de FSH, incluso más en particular, 2,5 mUI/ml de FSH o 1 mUI/ml de FSH. En una realización adicional, el medio de capacitación comprende 25 nM de CNP, 10 nM de estradiol y 2,5 o 1 mUI/ml de FSH. En otro aspecto más, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de FSH recombinante, análogos de FSH o moléculas miméticas de FSH.

En otra realización más, el medio de capacitación comprende 0,1-10 ng/ml de insulina, en particular 5 ng/ml de insulina. En otro aspecto, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de análogos de insulina o moléculas miméticas de insulina.

En una realización adicional, el medio de capacitación comprende un factor secretado por ovocitos. Los factores secretados por los ovocitos, como se usan en el presente documento, se seleccionan del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos; en particular a concentraciones en el medio de capacitación que varían de 10 a 100 ng/ml de cada una, respectivamente. En una realización particular, los factores secretados por los ovocitos son proteínas recombinantes. En otro aspecto más, los factores secretados por los ovocitos son proteínas heterodiméricas.

En aún otra realización adicional, el medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, lo más preferiblemente, 25 nM de CNP; 1 a 1000 nM de estradiol, lo más preferiblemente, 10 nM de estradiol; 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, lo más preferiblemente, 2,5 mUI/ml de FSH o 1 mUI/ml de FSH; 0,1 a 10 ng/ml de insulina, más preferiblemente, 5 ng/ml de insulina; y un factor secretado por ovocitos seleccionado del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier equivalente o combinación de los mismos.

La invención también proporciona un método in vitro para la maduración de COC inmaduros de mamíferos.

En un primer aspecto, el método comprende recolectar un COC inmaduro en medio de recolección, contactar el COC de mamífero con un medio de capacitación que comprende 1 a 50 nM de CNP, estradiol y FSH, y contactar adicionalmente el COC de mamífero con un medio de maduración. En dicho método, el COC inmaduro típicamente se pone en contacto con el medio de recolección durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 2 horas. También en dicho método, y después de contactar con el medio de recolección, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación que mantiene la detención meiótica in vitro. En particular, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo como se evidencia, por ejemplo, mediante la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la llamada configuración de nucléolo rodeado (SN), observada en la etapa de GV. Después de este período, los ovocitos serán capaces de sufrir una descomposición de las vesículas germinales (GVBD) luego de un estímulo para la reanudación meiótica. Aún más en particular, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un mínimo de 2 h y un máximo de 96 h. En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Más en particular,

el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Para folículos con un diámetro de >5 a 10 mm, se prefiere que los COC permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación. En otra realización, el COC de mamífero se pone en contacto con un medio de maduración para permitir una maduración meiótica adicional del ovocito.

En una realización específica, en el método in vitro de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 1 - 1000 nM de estradiol, más en particular, 10 nM de estradiol. En otra realización, en el método in vitro según la presente invención, el medio de capacitación comprende de 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, más en particular 2,5 mUI/ml de FSH o 1 mUI/ml de FSH. En otro aspecto más, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de FSH recombinante, análogos de FSH o moléculas miméticas de FSH.

En otra realización más, en el método in vitro según la presente invención, el medio de capacitación comprende 0,1 a 10 ng/ml de insulina, más en particular, 5 ng/ml de insulina. En otro aspecto, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de análogos de insulina o moléculas miméticas de insulina.

En una realización adicional, en el método in vitro según la presente invención, el medio de capacitación comprende un factor secretado por ovocitos. Los factores secretados por los ovocitos, como se usan en el presente documento, se seleccionan del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos; en particular, a concentraciones en el medio de capacitación que varían de 10 a 100 ng/ml cada una, respectivamente. En una realización particular, los factores secretados por los ovocitos son proteínas recombinantes. En otra realización más, los factores secretados por los ovocitos son proteínas heterodiméricas.

En otra realización, en el método in vitro de acuerdo con la presente invención, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período mínimo de 2 ha máximo de 96 h. Este tiempo es suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como lo demuestra, por ejemplo, la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la llamada configuración de nucléolo rodeado (SN). En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Más en particular, el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de los COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de >5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación. El período de capacitación permite que el ovocito gane competencia para reanudar la meiosis, que solo se evalúa después de que se activa el estímulo meiótico. En otra realización, el COC de mamífero se pone en contacto con un medio de maduración (estímulo meiótico) para permitir una maduración meiótica in vitro adicional del ovocito, que se evidencia bajo el microscopio invertido por la descomposición de la vesícula germinal (GVBD) y la extrusión del primer cuerpo polar (PB).

En una realización particular, en el método in vitro de acuerdo con la presente invención, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación en una placa de cultivo no adherente o adherente, en particular en una placa de cultivo no adherente.

En una realización adicional, en el método in vitro según la presente invención, el COC inmaduro se pone en contacto con el medio de recolección durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 2 horas.

En una realización particular de la invención, el COC de mamífero es un COC humano.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para la maduración in vitro de un COC inmaduro de mamífero. Dicho kit comprende un medio de capacitación como se describe en el presente documento. En una realización particular, en un kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, estradiol y FSH. En una realización más particular, en un kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 10 a 25 nM de CNP, preferiblemente 25 nM de CNP. En una realización específica, el medio de capacitación en el kit comprende 1 - 1000 nM de estradiol, preferiblemente 10 nM de estradiol. En otra realización, el medio de capacitación en el kit comprende 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, más en particular 2,5 mUI/ml de FSH o 1 mUI/ml de FSH. En otro aspecto más, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de FSH recombinante, análogos de FSH o moléculas miméticas de FSH. En otra realización más, en el kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 0,1 a 10 ng/ml de insulina, más en particular 5 ng/ml de insulina. En otro aspecto, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de análogos de insulina o moléculas miméticas de insulina. En otra realización, en el kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, preferiblemente 25 nM de CNP; 1 a 1000 nM de estradiol, preferiblemente 10 nM de estradiol; 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, preferiblemente 2,5 mUI/ml de FSH o 1 mUI/ml de FSH; y 0,1 a 10 ng/ml de insulina, preferiblemente 5 ng/ml de insulina.

En una realización adicional, en un kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende un factor secretado por ovocitos. Los factores secretados por ovocitos utilizados en este documento se seleccionan del

grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos. En particular a concentraciones en el medio de capacitación que varían de 10 a 100 ng/ml cada una respectivamente. En una realización particular, los factores secretados por ovocitos usados en el presente documento son proteínas recombinantes o proteínas heterodiméricas.

- 5 En otra realización, el kit para la maduración in vitro de un COC inmaduro de mamífero comprende (a) un medio de recolección que comprende compuestos químicos naturales o artificiales que inhiben las fosfodiesterasas naturales o inhibidores naturales de la meiosis de los ovocitos; (b) un medio de capacitación como se describe en el presente documento; (c) un medio de maduración; (d) placas de cultivo adherentes y/o no adherentes; y (e) instrucciones para el uso del kit.
- 10 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de un medio de capacitación para la maduración in vitro de un COC inmaduro de mamífero. Dicho medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, estradiol y FSH, como se describe en el presente documento. En una realización específica, dicho medio de capacitación comprende 1 a 1000 nM de estradiol. En otra realización, el medio de capacitación comprende de 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, preferiblemente 2,5 mUI/ml de FSH o 1 mUI/ml de FSH. En otro aspecto más, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de FSH recombinante, análogos de FSH o moléculas miméticas de FSH. En otra realización más, el medio de capacitación comprende 0,1-10 ng/ml de insulina, preferiblemente 5 ng/ml de insulina. En otro aspecto, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de análogos de insulina o moléculas miméticas de insulina. En una realización adicional, en el uso del medio de capacitación de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende un factor secretado por ovocitos. Los factores secretados por los ovocitos como se usan en el presente documento se seleccionan del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, los factores secretados por los ovocitos son proteínas recombinantes. En otro aspecto más, los factores secretados por los ovocitos son proteínas heterodiméricas.

En una realización particular, en el uso del medio de capacitación de acuerdo con la presente invención, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período de mínimo 2 h a máximo 96 h. Más en particular, en el uso del medio de capacitación, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación para mantener los ovocitos bajo detención meiótica y para permitir la adquisición de la maduración citoplasmática. En particular, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como lo demuestra, por ejemplo, la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la llamada configuración de nucléolo rodeado (SN). En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Más en particular, el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de los COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de >5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación. La evaluación de la maduración de los ovocitos a nivel nuclear, es decir, la remodelación de la cromatina dentro del ovocito, se evalúa bajo un microscopio fluorescente.

En una realización particular, en el uso del medio de capacitación de acuerdo con la presente invención, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación en una placa de cultivo no adherente o adherente, en particular una placa de cultivo no adherente.

En otra realización, el uso del medio de capacitación mantiene el ovocito de un COC de mamífero en detención meiótica in vitro. En base a la capacidad de mantener los ovocitos en detención meiótica sin afectar su maduración adicional, el uso del medio de capacitación de la presente invención crea un método MIV flexible en comparación con los métodos MIV utilizados actualmente. Debido a la posible flexibilidad en la extensión del cultivo in vitro, es decir, el intervalo de capacitación, todo el trabajo técnico importante (como la microinyección de los ovocitos) ahora puede caer dentro de las horas normales de trabajo. Evidentemente, esta es una mejora práctica importante sobre los protocolos de MIV actuales.

En una realización adicional, se describe el uso del medio de capacitación de acuerdo con la presente invención en el que el complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro es adecuado para una tecnología de fertilización in vitro o tecnología ICSI.

Otras aplicaciones basadas en el uso del medio de capacitación de la presente invención residen en el mayor rendimiento MIV de los COC obtenidos de folículos más pequeños que los normalmente utilizados.

Al poder madurar folículos más pequeños:

- 55 - se tiene la posibilidad de criopreservar ovocitos maduros con desarrollo adecuado a partir de pequeños folículos antrales;
- se tiene la posibilidad de cultivar COC a partir de pequeños folículos antrales (importante para el campo de la preservación de la fertilidad en el caso del tratamiento del cáncer), donde el COC se obtendrá de la disección de folículos más pequeños que los perforados por la recuperación transvaginal guiada por ultrasonido.

Otro aspecto de la presente invención se basa en el uso de un kit que comprende un medio de capacitación para la maduración in vitro de un COC de mamífero. Dicho kit comprende un medio de capacitación como se describe en el presente documento. En una realización particular, en un kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, estradiol y FSH. En una realización específica, el medio de capacitación en el kit comprende 1 - 1000 nM de estradiol. En otra realización, el medio de capacitación en el kit comprende de 0,1 a 10 mUI/ml de FSH. En otra realización más, en el kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 0,1 a 10 ng/ml de insulina. En otra realización, en el kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, preferiblemente 25 nM de CNP; 1 a 1000 nM de estradiol, preferiblemente 10 nM de estradiol; y 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, preferiblemente 2,5 mUI/ml de FSH o 1 mUI/ml de FSH. En otro aspecto más, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de FSH recombinante, análogos de FSH o moléculas miméticas de FSH.

En otra realización más, en el kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 0,1 a 10 ng/ml de insulina, más en particular 5 ng/ml de insulina. En otro aspecto, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de análogos de insulina o moléculas miméticas de insulina.

En una realización adicional, en un kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende un factor secretado por ovocitos. Los factores secretados por ovocitos utilizados en este documento se seleccionan del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, los factores secretados por ovocitos usados en el presente documento son proteínas recombinantes o proteínas heterodiméricas.

En otra realización, el uso de un kit que comprende un medio de capacitación para la maduración in vitro de un COC de mamífero inmaduro comprende poner en contacto el COC de mamífero con el medio de capacitación durante un período de mínimo 2 h a máximo 96 h. Más en particular, en el uso de un kit que comprende un medio de capacitación, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación para inducir la detención meiótica y permitir la maduración. En particular, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como lo demuestra, por ejemplo, la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la llamada configuración de nucléolo rodeado (SN). En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Más en particular, el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de COC mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de >5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación. La evaluación de la maduración de los ovocitos a nivel nuclear, es decir, la remodelación de la cromatina dentro del ovocito, se evalúa bajo un microscopio fluorescente.

Otro aspecto de la presente invención se basa en el uso de un kit que comprende (a) un medio de recolección que comprende compuestos químicos naturales o artificiales que inhiben las fosfodiesterasas naturales o inhibidores naturales de la meiosis de los ovocitos; (b) un medio de capacitación como se describe en el presente documento; (c) un medio de maduración; (d) placas de cultivo adherentes y/o no adherentes; y (e) instrucciones para el uso del kit.

En un aspecto particular de la presente invención, el uso de un kit para la maduración in vitro de un COC inmaduro de mamífero comprende el contacto del COC con el medio de recolección durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 2 horas. En otro aspecto, en el uso de un kit de acuerdo con la presente invención, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período de mínimo 2 h a máximo 96 h. Más en particular, en el uso de un kit que comprende un medio de recolección, un medio de capacitación, un medio de maduración, placas de cultivo adherentes y/o no adherentes e instrucciones de uso, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación para inducir una detención meiótica y para permitir la maduración. En particular, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como lo demuestra, por ejemplo, la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la llamada configuración de nucléolo rodeado (SN). En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Más en particular, el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de los COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de >5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación.

El período de capacitación permite que el ovocito gane competencia para reanudar la meiosis, que solo se evalúa después de que se activa el estímulo meiótico. En otra realización, el COC de mamífero se pone en contacto con un medio de maduración (estímulo meiótico) para permitir una maduración meiótica adicional del ovocito, que se evidencia bajo el microscopio invertido por la descomposición de la vesícula germinal (GVBD) y la extrusión del primer cuerpo polar (PB).

En una realización particular, en el uso de un kit de acuerdo con la presente invención, el COC de mamífero se pone

en contacto con el medio de capacitación en una placa de cultivo no adherente o adherente.

En otra realización, en el uso de un kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación mantiene el ovocito de un COC de mamífero en detención meiótica in vitro.

5 En una realización adicional, el uso de un kit de acuerdo con la presente invención induce la maduración de un COC de mamífero.

En otra realización más, se describe el uso del kit de acuerdo con la presente invención en el que el complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro es adecuado para una tecnología de fertilización in vitro o tecnología ICSI.

Breve descripción de los dibujos

10 Con referencia específica ahora a las figuras, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las diferentes realizaciones de la presente invención solamente. Se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácil de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intenta mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención. La descripción tomada con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo las diversas formas de la invención pueden realizarse en la práctica.

15 Fig. 1: Efecto dependiente de la dosis de CNP-22 sobre la progresión de la maduración meiótica. Los COC preovulatorios se maduraron in vitro durante 18 horas en presencia de 0 (control), 1, 10, 100 nM de CNP-22 (A) y en combinación con 4 ng/ml de EGF (B). Después del período de maduración, se evaluó la maduración nuclear de los ovocitos. Cada barra representa la media  $\pm$  DE de los datos experimentales obtenidos de tres réplicas (al menos 33 ovocitos/tratamiento). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

20 Fig. 2: CNP-22 retrasa la reiniciación de la meiosis dependiente de EGFR

(A) Los COC preovulatorios se colocaron en cultivo en presencia de 0 (control) o 25 nM de CNP-22 + 4 ng/ml de EGF, y se evaluó la reanudación meiótica temprana a las 2, 4 y 6 horas después de la recolección.

25 (B) Los COC preovulatorios se colocaron en cultivo en presencia de 25 nM de CNP-22 o 25 nM de CNP-22 + 4 ng/ml de EGF, y se evaluó la maduración meiótica (terminación meiótica hasta la extrusión de PB) 24 horas más tarde. Cada barra representa la media  $\pm$  DE de los datos obtenidos de tres réplicas (al menos 41 ovocitos/tratamiento). Letras diferentes o a \* indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

30 Fig. 3: Efectos de E2, dosis de suplementación de FSH y GDF9 sobre la detención meiótica de ovocitos. Los COC inmaduros se colocaron en cultivo en presencia de 25 nM de CNP-22 solo o con 10 nM de E2. Se evaluaron los efectos potenciales de agregar 2,5 ml de U/ml o 5 ml U/ml de FSH, solo o en combinación con 50 ng/ml de GDF9, sobre el mantenimiento de la detención meiótica durante 48 horas de cultivo. Cada barra representa la media  $\pm$  DE de los datos experimentales obtenidos de tres réplicas (al menos 38 ovocitos/tratamiento). Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

35 Fig. 4: Efectos de un período de cultivo de 48 horas (Pre-MIV) sobre la configuración de cromatina y el diámetro de los ovocitos GV. Los COC inmaduros se colocaron en cultivo en presencia de 25 nM de CNP-22 + 10 nM de E2. Se evaluaron los posibles efectos complementarios de 2,5 ml de U/ml de FSH o una combinación de 2,5 ml de U/ml de FSH + 50 ng/ml de GDF9, sobre la configuración de cromatina de los ovocitos (A) o el diámetro de los ovocitos (B). La configuración de la cromatina se evaluó como se describe en el material y los métodos y se calificó como NSN, NSN/SN (transicional) y NSN. Además, el diámetro también se evaluó en los ovocitos inmediatamente después del aislamiento, antes del cultivo (0 h). En (A), cada barra representa la media  $\pm$  DE de los datos experimentales obtenidos de tres réplicas (al menos 46 ovocitos/tratamiento). En (B), se midieron al menos 31 ovocitos de GV/tratamiento. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

Fig. 5: Evaluación de la calidad de ovocitos y embriones después de Pre-MIV + MIV

45 Después de un período de pre-MIV de 48 horas y un período de MIV de 18 horas, los ovocitos fueron fertilizados in vitro y los embriones fueron cultivados por hasta 5 días. Los parámetros de evaluación fueron la tasa de 2 células (fertilización) (A) y la formación de blastocistos en el día 5 (D5 Blast/2 células) (B). Cada barra en (A) y (B) representa datos experimentales obtenidos de cuatro réplicas (al menos 64 ovocitos/tratamiento); los resultados se muestran como la media  $\pm$  DE. (C) Se muestra la tasa de 2 células y la tasa de blastocisto en el día 5 (D5 Blast/2 células) para dos controles de referencia. Los COC inmaduros se obtuvieron de pequeños folículos antrales de ratones de 20 días de edad y se maduraron in vitro durante 18 horas en presencia de EREG 100 ng/ml [20do (MIV)]. De manera similar, se obtuvieron ovocitos (controles) estándar de oro, crecidos in vivo, de ratones de 25-27 días, después de 48 horas de cebado de eCG seguido de 14 horas de hCG. Los datos para estos controles provienen de 2 repeticiones (al menos 56 ovocitos/tratamiento) ( $P < 0,05$ ).

Fig. 6: Efecto de CNP sobre las conexiones de cúmulo-ovocito cultivadas in vitro.

Proyecciones transzonales (TZP) en COC de ratón después de 48 h de cultivo en presencia de un inhibidor de PDE3

o CNP. A la izquierda, en presencia de un inhibidor de PDE3, a la derecha, en presencia de CNP. La zona pelúcida que rodea al ovocito está delineada e indicada con una flecha. En presencia de un inhibidor de PDE3, la zona pelúcida es negra, lo que indica que casi no hay proyecciones transzonales. Más allá de cualquier expectativa, en presencia de CNP, la zona pelúcida está llena con proyecciones transzonales que indican una conexión sólida de cúmulo-ovocito.

5 Fig. 7: Tinción de filamentos de actina en la zona pelúcida de conexiones de cúmulo-ovocito cultivadas in vitro

Intensidad media de píxeles en la zona pelúcida en COC expuestos a CNP o un inhibidor de PDE3. En (A), Org9935 se usó como inhibidor de PDE3 y los filamentos de actina se evidenciaron con faloidina unida al rojo Texas; mientras que en (B), la clostamida se usó como inhibidor de PDE3 y los filamentos de actina se evidenciaron con Actin green™ (n = número de COC analizados). Los grupos CNP y PDE3i se compararon estadísticamente utilizando una prueba de Mann Whitney con un valor P para el panel A de 0,0082 y un valor P para el panel B <0,0001.

10

Fig. 8: Efectos diferenciales de CNP y PDE3i presentes durante un cultivo de capacitación sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos encerrados en cúmulos de ratón de los primeros folículos antrales

Tasas de fertilización (A) y formación de blastocistos (B) después del cultivo de capacitación seguido de MIV. En ambos casos, se incluyeron datos de dos controles de referencia: 1) Un control para MIV sin cultivo previo de capacitación y 2) un control estándar in vivo (ovocitos maduros completamente desarrollados).

15

Fig. 9: Reanudación meiótica después de 18 horas. Efecto dependiente de la dosis de CNP-22 sobre la progresión de la maduración meiótica. Los COC preovulatorios se cultivaron en presencia de dosis de CNP que oscilaban entre 0,1 nM y 1 µM. Se incluyó una condición de control (medio basal sin CNP). Cada barra representa la media ± DE de los datos experimentales obtenidos de tres réplicas (en promedio, 54 ovocitos/tratamiento). Los asteriscos indican diferencias significativas contra la condición de control sin CNP (P <0,01). El panel A proporciona el porcentaje de ovocitos con tasa de vesículas germinales (VG) intactas (%), en donde la presencia de VG intactos es indicativa de detención meiótica. El panel B proporciona el porcentaje de ovocitos en la etapa de descomposición de la vesícula germinal (GVBD), que se espera que sea bajo en caso de detención meiótica y el panel C proporciona el porcentaje de ovocitos que extruden el primer cuerpo polar (PB), nuevamente se espera que sea bajo en caso de detención meiótica.

20

25

Fig. 10: Reanudación meiótica después de 18 horas. Efecto dependiente de la dosis de CNP-53 sobre la progresión de la maduración meiótica. Los COC preovulatorios se cultivaron en presencia de dosis de CNP que oscilaban entre 0,1 nM y 1 µM. Se incluyó una condición de control (medio basal sin CNP y un control positivo con 25 nM de CNP-22). Cada barra representa la media ± DE de los datos experimentales obtenidos de tres réplicas (en promedio, 54 ovocitos/tratamiento). Los asteriscos indican diferencias significativas contra la condición de control sin CNP (P <0,01). El panel A proporciona el porcentaje de ovocitos con tasa de vesículas germinales (GV) intactas. El panel B proporciona el porcentaje de ovocitos en la etapa de descomposición de vesículas germinales (GVBD). El panel C proporciona el porcentaje de ovocitos que extruden el primer cuerpo polar (PB).

30

Fig. 11: Tasas de maduración, tasas de fertilización y número de embriones de buena calidad (GQE) expresados por número de huevos fertilizados (2PN) o por número de COC iniciales (COC). Barra negra (N=374 pacientes): resultados del 'campo de FIV convencional (ICSI)': refleja la práctica actual de ICSI en Europa. Estos datos se obtienen de la terapia de estimulación utilizada con mayor frecuencia (antagonista de GnRH + HP-hMG): datos de embriología de los datos publicados de 'MEGASET': estudio multinacional multicéntrico europeo de Ferring Pharmaceuticals, donde todos los embriones se cultivaron hasta la etapa de blastocisto. Barra gris (N=413 pacientes): resultados obtenidos con MIV de rutina (Kit Origio), al obtener ovocitos a partir de ciclos desencadenados sin HCG. Barra blanca (N=15): resultados con la etapa "Nuevo cultivo de capacitación" utilizada en los ovocitos de 15 pacientes que también dieron COC para el cultivo de capacitación. Barra blanca rayada (N=15 pacientes): estos resultados provienen de MIV de rutina (método Origio®) en una parte de los ovocitos de 15 pacientes que dieron COC para el cultivo de capacitación (es decir, "hermano" con el grupo verde).

35

40

Fig. 12: Formación de blastocistos en D5-D6, expresada por número de óvulos fertilizados (2PN), expresada por MII Ovocitos o por número de COC iniciales (COC). La barra negra (N=374 pacientes) resulta del 'campo de FIV convencional (ICSI)': refleja la práctica actual de ICSI en Europa. Estos datos se obtienen de la terapia de estimulación utilizada con más frecuencia (antagonista de GnRH + HP-hMG): datos de embriología de los datos publicados de 'MEGASET': estudio multinacional multicéntrico europeo de Ferring Pharmaceuticals, donde todos los embriones se cultivaron hasta la etapa de blastocisto. Barra gris (N=98 pacientes): es el resultado del subgrupo de 98 pacientes, cuyos embriones solo se cultivan en medio de blastocisto si tenían 4 o más embriones del día 3 buenos. Barra blanca (N=15): resultados con la etapa "Nuevo cultivo de capacitación" utilizada en los ovocitos de 15 pacientes que también dieron COC para el cultivo de capacitación. Barra blanca rayada (N=5 pacientes): es el resultado del subgrupo de 5 pacientes, cuyos embriones se cultivan aún más en medio de blastocisto si tenían 4 o más embriones del día 3 de "buena calidad". NOTA: Este es el "sesgo" más favorable para el MIV de rutina. Barra blanca punteada (N=7): son resultados del subgrupo de 7 pacientes hermanos con la etapa "Nuevo cultivo de capacitación"; es decir, los embriones solo se consideran para su desarrollo en medio de blastocisto en caso de que tuvieran 4 o más embriones del día 3 de "buena calidad". NOTA: Este análisis de subgrupos se realizó para realizar la comparación ideal con la política de cultivo de blastocistos en la MIV de rutina (barra blanca rayada).

45

50

55



Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones y métodos para tecnología de reproducción asistida en mamíferos. Específicamente, la invención se refiere a composiciones y métodos para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero (COC). La invención se basa en el hallazgo de que la combinación de una dosis baja de CNP, estradiol y FSH permite con éxito la maduración in vitro de los folículos antrales tempranos, en particular los folículos antrales precoces pequeños con un diámetro inferior a 9 mm.

10 El término "folículo", como se usa en el presente documento, se refiere a un folículo ovárico que es la unidad básica de la biología reproductiva femenina y está compuesto de agregaciones más o menos esféricas de células encontradas en el ovario. Un folículo contiene un solo ovocito. Los folículos se inician periódicamente para crecer y desarrollarse, culminando en la ovulación de un solo ovocito competente. Las células del folículo ovárico son los ovocitos, las células de la granulosa y las células de las capas teca interna y externa.

El término "ovocito", como se usa en el presente documento, incluye un ovocito solo o un ovocito en asociación con una o más células adicionales, tales como un ovocito como parte de un complejo cúmulo-ovocito (COC). El núcleo de un ovocito se llama vesícula germinal.

15 La expresión "célula del cúmulo", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula en los folículos ováricos en desarrollo, que está en proximidad directa o cercana a un ovocito. Las células del cúmulo están involucradas en proporcionar a un ovocito algunos de sus requerimientos nutricionales, de energía y/u otros que son necesarios para producir un embrión viable después de la fertilización.

20 La expresión "complejo cúmulo-ovocito", como se usa en el presente documento, se refiere a al menos un ovocito y al menos una célula del cúmulo en una asociación física entre sí. En general, el ovocito está rodeado por capas apretadas de células cúmulos, formando así el complejo de cúmulos ovocitos.

25 La tecnología de reproducción asistida o ART, como se usa en este documento, incluye todos los tratamientos de fertilidad en los que se manejan tanto los gametos femeninos (ovocitos) como los gametos masculinos (esperma). La fertilización in vitro (FIV) es una de varias técnicas de reproducción asistida que se utilizan para ayudar a las parejas infértiles a concebir un hijo. La FIV se refiere al procedimiento mediante el cual se extraen los ovocitos del ovario de la hembra y se fertilizan con esperma en un procedimiento de laboratorio.

30 Mientras que en la ART convencional, las gonadotropinas se usan para estimular el ovario para que produzca muchos folículos grandes con ovocitos maduros in vivo, MIV apunta principalmente a evitar los efectos secundarios de la estimulación ovárica mediante la recuperación de ovocitos inmaduros de pequeños folículos (diámetro <12 mm) de ovarios no estimulados o mínimamente estimulados. Sin embargo, la competencia intrínseca del desarrollo de los ovocitos se reduce después de la MIV en comparación con la ART convencional.

35 La maduración nuclear de un ovocito abarca los procesos que reactivan la detención de la meiosis en la profase I y estimula el proceso meiótico para proceder a la metafase II (etapa MII), etapa en la que generalmente tiene lugar la fertilización. Los ovocitos detenidos en la profase I exhiben una llamada vesícula germinal (etapa de GV), en la cual la membrana nuclear y el nucléolo son visibles a través de un microscopio. La maduración nuclear se manifiesta cuando el ovocito sufre la llamada descomposición de GV (etapa de GVBD), progresa a la etapa MII y extrude el primer cuerpo polar (PB). La maduración citoplasmática se refiere a los procesos que preparan al ovocito para la activación, la formación de pronúcleos y la ruta de desarrollo emprendida hasta que se haya logrado la implantación. La competencia para someterse tanto a la maduración nuclear como a la citoplasmática de los ovocitos en etapa de GV generalmente se adquiere en forma gradual.

40 La maduración in vitro de los ovocitos (MIV) es una técnica que permite madurar los ovocitos en la etapa de GV (como los COC) que están encerrados en una capa de cúmulo-corona firmemente condensada. Estos ovocitos se pueden obtener mediante punción con aguja guiada por ultrasonido antes o después de que la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) haya provocado la ovulación. La MIV de ovocitos tiene el potencial de simplificar el tratamiento de fertilidad o reducir los riesgos y costos relacionados con la estimulación hormonal (hCG) en pacientes con reserva folicular ovárica normal o alta. Esta reserva folicular se determina rutinariamente mediante la medición de los niveles de la hormona antimülleriana (AMH) y mediante el recuento folicular guiado por ultrasonido en el día 3 del ciclo menstrual.

45 El éxito de la ART y MIV depende, en gran medida, de la madurez del ovocito antes de la fertilización. Los ovocitos extraídos de los folículos antrales suelen sufrir una reanudación espontánea de la meiosis, es decir, proceder a la maduración nuclear, cuando se colocan en cultivo. Esta maduración nuclear a menudo puede ocurrir antes de que el ovocito haya experimentado la madurez citoplasmática completa. Se cree que esto afecta en última instancia el éxito de la fertilización y posiblemente el posterior desarrollo e implantación del embrión. Por lo tanto, el principal desafío para MIV es la sincronización de los procesos de maduración nuclear y citoplasmática dentro del ovocito. Un período prolongado de maduración del ovocito promovería una interacción más larga entre el ovocito inmaduro y las células del cúmulo adecuadamente acondicionadas. Además, la MIV de los folículos pequeños parece ser aún más difícil. Se sabe por la literatura que los folículos humanos pequeños no expresan cantidades suficientes de receptor de LH y/o el sistema receptor para EGF y factores similares a EGF. En consecuencia, la cascada principal de factores similares

a EGF, que induce la maduración, no se puede activar.

En la presente invención, el COC inmaduro de mamífero se recoge sin estimulación previa con hCG o solo después de la estimulación con hCG. En una realización preferida, la estimulación con hCG no se ha producido antes de la recolección de COC. En una realización aún más preferida, cualquier desencadenante, incluidas altas dosis de FSH, LHRH, análogos de LH o LH recombinantes, debe evitarse antes de la recolección de COC in vivo.

La presente invención se basa en el hallazgo de que un rango específico de dosis "bajas" de péptido natriurético tipo C (CNP) en combinación con estradiol y FSH mejora notablemente el proceso de MIV de COC de mamíferos, en particular los derivados de pequeños folículos antrales tempranos con un diámetro inferior a 9 mm. Como es más evidente a partir de los ejemplos que siguen, y claramente diferente de la aplicación de inhibidores de PDE3 para mantener los COC en la detención meiótica, el CNP tiene una curva de dosis en forma de campana. Inesperadamente, no solo dosis muy bajas como 0,1 nM, sino también dosis muy altas como 1 M demostraron ser subóptimas en el mantenimiento de los ovocitos detenidos en la etapa de GV. Esta diferencia en la curva de dosis implica diferentes mecanismos subyacentes, lo que hace que el tratamiento con CNP vaya más allá de simplemente retrasar el inicio de la reanudación meiótica en pequeños folículos antrales tempranos como se detalla más adelante.

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención es proporcionar un medio de capacitación para la maduración in vitro de un COC de mamífero. El medio de capacitación comprende de 1 a 50 nM de péptido natriurético tipo C (CNP), estradiol y FSH. En una realización específica, el medio de capacitación comprende 1 a 1000 nM de estradiol. En otra realización, el medio de capacitación comprende 0,1 a 10 mUI/ml de FSH. En otro aspecto más, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de FSH recombinante, análogos de FSH o moléculas miméticas de FSH. En otra realización más, el medio de capacitación comprende 0,1-10 ng/ml de insulina. En otro aspecto, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de análogos de insulina o moléculas miméticas de insulina. En otra realización más, el medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, preferiblemente 10-50 nM de CNP, lo más preferiblemente, 10-25 nM de CNP, incluso más preferiblemente 25 nM de CNP; 1 a 1000 nM de estradiol, lo más preferiblemente, 10 nM de estradiol; 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, lo más preferiblemente, 2,5 o 1 mUI/ml de FSH; e 0,1 a 10 ng/ml de insulina, lo más preferiblemente, 5 ng/ml de insulina. Además, en algunas realizaciones de la invención, el medio de capacitación comprende un factor secretado por ovocitos o una combinación de factores secretados por ovocitos. Los factores secretados por los ovocitos, como se usan en el presente documento, se seleccionan del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, los factores secretados por los ovocitos son proteínas heterodiméricas. En otro aspecto más, los factores secretados por los ovocitos son proteínas heterodiméricas. En otra realización adicional más, el medio de capacitación comprende preferiblemente 1 a 50 nM de CNP, preferiblemente 10-50 nM de CNP, lo más preferiblemente, 10 a 25 nM de CNP, incluso más preferiblemente, 25 nM de CNP; 1 a 1000 nM de estradiol, incluso más preferiblemente, 10 nM de estradiol; 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, incluso más preferiblemente, 2,5 o 1 mUI/ml de FSH; 0,1 a 10 ng/ml de insulina, incluso más preferiblemente, 5 ng/ml de insulina; y un factor secretado por ovocitos seleccionado del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier equivalente o combinación de los mismos.

El péptido natriurético atrial (ANP), el péptido natriurético cerebral (BNP) y el péptido natriurético tipo C son los miembros más estudiados de la familia de los péptidos natriuréticos. CNP está codificado por el gen precursor del péptido natriurético C (NPPC), que se expresa en diversos tipos de células en las que la proteína NPPC precursora se escinde en el péptido CNP de 22 aminoácidos. CNP activa su receptor afín guanilil ciclasa B (GC-B), también conocido como receptor de péptido natriurético B (NPRB), mientras que ANP y BNP estimulan la guanilil ciclasa (GC-A), también conocido como receptor de péptido natriurético A (NPRA). GC-A y GC-B son enzimas guanilil ciclasa ancladas a la membrana que señalizan a través de la producción del segundo mensajero cGMP. El CNP actúa de manera autocrina/paracrina para inducir vasorelajación y remodelación vascular, y para regular el crecimiento óseo.

El CNP tiene 22 residuos de aminoácidos de longitud (CNP-22), y también se ha descrito una forma alargada en el término N con 53 residuos de aminoácidos (CNP-53). ANP, BNP y CNP son altamente homólogos con la estructura de anillo de 17 residuos formada por un enlace disulfuro intramolecular. Se puede acceder a la secuencia genética para el gen NPPC en Genbank, locus NM\_024409. ANP y BNP actúan principalmente como hormonas cardíacas, producidas principalmente por la aurícula y el ventrículo, respectivamente. Se pensaba que el CNP se expresaba principalmente en el cerebro. Sin embargo, otros estudios demostraron la producción de CNP por células endoteliales cultivadas y por vasos sanguíneos in vivo con el aumento de la producción de CNP por diversas citoquinas y factores de crecimiento. Los estudios han informado sobre la expresión ovárica de NPPC y NPRB y su regulación por gonadotropinas. Un estudio reciente demostró la expresión de ARNm de NPPC en células de granulosa y la capacidad de CNP para estimular la producción de cGMP en células del cúmulo. El cGMP luego se difunde a través de uniones vacías desde las células del cúmulo a los ovocitos y previene la degradación del cAMP dependiente de la fosfodiesterasa tipo 3 (PDE3), por lo tanto, mantiene los ovocitos bajo detención meiótica.

Como resultará evidente a partir de los ejemplos a continuación, la combinación de una dosis baja de CNP con estradiol y FSH es esencial para prolongar la detención meiótica inducido por CNP. El CNP mantiene eficientemente la detención meiótica en los COC durante al menos 24 horas, pero el CNP solo fue insuficiente para mantener la detención meiótica durante 48 horas. Por lo tanto, el CNP solo no permite la MIV de pequeños folículos antrales tempranos, por lo que un período de cultivo in vitro a largo plazo es esencial para una maduración exitosa. Sin embargo, la combinación de una dosis baja de CNP con estradiol permitió al COC mantener la detención meiótica

durante un largo período, aunque la calidad embrionaria final del ovocito después de la FIV no fue suficiente. Además, la suplementación de FSH al medio de capacitación, además de CNP y estradiol, también mantuvo el COC en detención meiótica durante un largo período. Además, la suplementación de FSH mejoró la reanudación meiótica, aumentó el diámetro del ovocito y mejoró la calidad del embrión después del procedimiento de FIV.

5 La FSH es una hormona sintetizada y secretada por gonadotropos en la glándula pituitaria anterior. La FSH regula el desarrollo, el crecimiento, la maduración puberal y los procesos reproductivos del cuerpo humano. La FSH y la hormona luteinizante (LH) actúan sinérgicamente en la reproducción. En el ovario, la FSH estimula el crecimiento de los folículos inmaduros hasta la maduración. A medida que el folículo crece, libera inhibina, que bloquea la producción de FSH. La FSH es una glucoproteína dimérica. Las subunidades alfa de LH, FSH, TSH y hCG son idénticas y  
10 contienen 92 aminoácidos. FSH tiene una subunidad beta de 118 aminoácidos que confiere su acción biológica específica y es responsable de la interacción con el receptor de FSH.

Para uso clínico, están disponibles diversas formulaciones. Se usa comúnmente en la terapia de infertilidad para estimular el desarrollo folicular. FSH está disponible mezclada con LH o hCG en forma de, por ejemplo, Pergonal o Menopur, que son gonadotropinas purificadas en orina, así como en formas puras como FSH recombinante (por  
15 ejemplo, Gonal F, Puregon), y como por ejemplo Gonal-F, Gonal-f RFF, Gonal-f RFF Pen. Los análogos de FSH también son clínicamente útiles e incluyen todas las formas mutantes biológicamente activas, por ejemplo, donde uno, dos, tres o más aminoácidos están alterados del nativo de FSH PEGilado, mutantes bifuncionales de cadena simple, FSH-CTP, y similares. También se han desarrollado terapias de FSH de acción prolongada, incluida una FSH-CTP  
20 (Corifolitropina alfa, donde las subunidades beta de FSH están unidas por el resto del péptido C-terminal (CTP) de hCG) como Elonva.

La insulina es una hormona central para regular el metabolismo de carbohidratos y grasas en el cuerpo. En las células diana, la insulina inicia una transducción de señales a través de la activación de receptores de membrana con actividad de tirosina quinasa. Esta transducción de señales da como resultado un aumento de la captación y almacenamiento de glucosa. También en los ovocitos, la cascada de señalización de insulina está activa. La insulina actúa  
25 sinérgicamente con la FSH para promover la diferenciación y la función de las células de la granulosa. Para uso clínico, también hay insulina recombinante disponible. La insulina se usa en la clínica como parte de un reemplazo de suero sintético (SSR). SSR es un componente de medios ampliamente utilizado en diferentes medios para el cultivo de embriones.

Los factores secretados por los ovocitos son factores paracrinos secretados por el ovocito y necesarios para la función normal de las células de la granulosa y las células tecales. La expresión "factores secretados por ovocitos", como se  
30 usa en el presente documento, debe entenderse como factores secretados por un ovocito que actúa sobre una célula de la granulosa para regular funciones clave en las células de la granulosa, tales como proliferación, diferenciación, metabolismo de la glucosa y biosíntesis de colesterol. Los factores secretados por los ovocitos se seleccionan del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8, o cualquier equivalente de los mismos. GDF-9 es miembro de la  
35 superfamilia del factor de crecimiento transformante  $\beta$ . La expresión de ovocitos de GDF-9 comienza en la etapa primaria del folículo y persiste a través de la ovulación. Como se usa en este documento, "GDF-9" se refiere a la proteína GDF-9, sus subunidades individuales, multímeros de sus subunidades individuales, fragmentos funcionales o porciones de GDF-9, y equivalentes funcionales y/o análogos de GDF-9. Como se define en el presente documento, los equivalentes funcionales o fragmentos de "GDF-9" incluían la proteína GDF-9 modificada de modo que el producto  
40 GDF-9 resultante tiene una actividad similar a GDF-9.

BMP-15 es un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Se sintetiza como prepro péptido, se escinde y luego se procesa en proteínas diméricas. BMP-15 puede formar homodímeros, y también heterodímeros con GDF-9. Como se usa en el presente documento, "BMP-15" se refiere a la proteína BMP-15, sus  
45 subunidades individuales, multímeros de sus subunidades individuales, fragmentos funcionales o porciones de BMP-15 y equivalentes funcionales y/o análogos de BMP-15. Como se define en el presente documento, los equivalentes funcionales o fragmentos de "BMP-15" incluían la proteína BMP-15 modificada de manera que el producto BMP-15 resultante tiene una actividad similar a BMP-15.

El FGF-8 es un miembro de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). En ovarios adultos, FGF-8 se expresa en ovocitos y se informó la expresión de receptores de FGF en células de granulosa. Durante la maduración de los ovocitos, FGF-8, junto con otros factores secretados por los ovocitos, promueve la glucólisis en las células del  
50 cúmulo. Como se usa en el presente documento, "FGF-8" se refiere a la proteína FGF-8, sus subunidades individuales, multímeros de sus subunidades individuales, fragmentos funcionales o porciones de FGF-8 y equivalentes funcionales y/o análogos de FGF-8. Como se define en el presente documento, los equivalentes funcionales o fragmentos de "FGF-8" incluían la proteína FGF-8 modificada de manera que el producto FGF-8 resultante tiene una actividad similar  
55 a la FGF-8.

En otra realización, el medio de capacitación comprende CNP, estradiol y FSH en combinación con uno o una combinación de factores secretados por ovocitos, seleccionados del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos. Esta combinación de factores de crecimiento y hormonas mejora  
60 significativamente la competencia del desarrollo y la calidad embrionaria final de los ovocitos derivados de pequeños folículos antrales, como se evidencia en los ejemplos que se describen a continuación. En particular, la adición de

GDF-9 al medio de capacitación promovió la remodelación de la configuración de cromatina de ovocitos en una etapa condensada, diámetro de ovocitos y calidad de ovocitos y embriones.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un medio de capacitación, como se describió anteriormente en el presente documento, para la maduración in vitro de COC de mamíferos inmaduros. Dicho uso comprende poner en contacto el COC de mamífero con el medio de capacitación durante un período mínimo de 2 h y máximo de 96 h. En particular, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como lo demuestra, por ejemplo, la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la llamada configuración de nucléolo rodeado (SN). En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo.

El uso del medio de capacitación que comprende CNP, estradiol y FSH induce una detención meiótica en el COC inmaduro de mamíferos. Típico para la presente invención y como se evidencia a partir de los ejemplos a continuación, el uso de un medio de capacitación que comprende CNP, estradiol y FSH permite un cultivo prolongado de 'capacitación' de ovocitos, de hasta 96 h. Como resultado, este período prolongado de detención meiótica permite que los ovocitos de pequeños folículos sobrevivan, crezcan y alcancen una etapa avanzada de desarrollo con el objetivo de obtener una mayor capacidad de reproducción. Hasta ahora, la maduración in vitro de estos pequeños folículos ha sido un desafío porque las condiciones de cultivo y el tiempo durante el cual los ovocitos podrían sobrevivir bajo una detención meiótica fue demasiado corto para adquirir una competencia nuclear y de desarrollo completa. Como se muestra adicionalmente en el ejemplo, sin ovocitos CNP del tamaño más pequeño de folículos se reanudó espontáneamente la meiosis. Por el contrario, cuando se trata con 1 nM, 10 nM, 25 nM o 50 nM de CNP, casi el 100% de los ovocitos podría mantenerse en detención meiótica.

El medio de capacitación de la presente invención no solo permite un cultivo prolongado de ovocitos, sino que la presencia de CNP sostiene igualmente las conexiones cúmulo-ovocito con una mejora notable en la capacidad de desarrollo del ovocito, especialmente cuando se compara con el uso actual de inhibidores de PDE3 en el mantenimiento de COC en la detención meiótica.

Después del uso de un medio de capacitación como se describe en el presente documento, los ovocitos podrán alcanzar una etapa avanzada de desarrollo. La configuración de cromatina de los ovocitos se evalúa en los ovocitos de GV mediante tinción con Hoechst y análisis bajo un microscopio de fluorescencia. La configuración de la cromatina se clasifica como nucléolo no rodeado (NSN), nucléolo rodeado (SN) o etapa de transición (NSN/SN), de acuerdo con el patrón de agregación de cromatina alrededor del nucléolo. También se registra el diámetro de los ovocitos antes de la tinción con Hoechst. Además, después del período de capacitación, se puede inducir y analizar la competencia meiótica evaluando la etapa de maduración nuclear bajo un microscopio invertido. La maduración nuclear de los ovocitos se puntúa como etapa de GV (vesícula germinal), etapa de GVBD (descomposición de vesículas germinales) y MII (metafase) o PB (cuerpo polar). A medida que crecen los ovocitos, adquieren la competencia para reiniciar la meiosis, un proceso también llamado reanudación meiótica. En esa etapa, los ovocitos se descomponen de la membrana de la vesícula germinal y los cromosomas se separan entre sí.

En la presente invención, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como se evidencia, por ejemplo, mediante la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la configuración SN. Además, el COC de los mamíferos se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. El tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de >5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación.

En otra realización, el uso del medio de capacitación es parte de una tecnología de reproducción asistida in vitro, en particular fertilización in vitro e ICSI.

La invención también proporciona un método in vitro para la maduración de un COC inmaduro de mamífero. En dicho método, se recoge un COC inmaduro en medio de recolección y se pone en contacto con el medio de recolección durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 2 horas. También en dicho método, y después de contactar con el medio de recolección, el COC de los mamíferos se pone en contacto con un medio de capacitación como se describió anteriormente para mantener la detención meiótica y promover las interacciones de cúmulos-ovocitos. Finalmente, el COC de los mamíferos se pone en contacto con un medio de maduración para permitir la maduración meiótica del ovocito.

En una realización específica, en el método de acuerdo con la presente invención, el COC inmaduro se pone en contacto con el medio de recolección durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 2 horas.

Dicho medio de recolección comprende compuestos farmacológicos naturales o artificiales que inhiben las fosfodiesterasas naturales o los inhibidores naturales de la reanudación meiótica de los ovocitos, generalmente

denominados desviadores meióticos. Dichos inhibidores naturales pueden seleccionarse del grupo que consiste en CNP, hipoxantina o análogos de los mismos. El uso de este medio de recolección permite la recuperación de COC de folículos antrales muy pequeños sin necesidad obligatoria de estimulación ovárica en cualquier momento del celo o el ciclo menstrual. La presencia de dicho desviador meiótico en el medio de recolección tiene el propósito de bloquear la disminución de cAMP de los COC recolectados, en particular para prevenir el reinicio de la meiosis en aquellos que tienen la capacidad de hacerlo, es decir, aquellos que son maduros nucleares y también para mantener las condiciones 'correctas' para las interconexiones entre ovocitos y cúmulos. Dicho medio de recolección se utilizará durante la recolección de COC, como medio en el que el COC perforado se transfiere desde la aguja de punción. El COC recién desprendido permanece preferiblemente durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 2 horas en este medio de recolección. El objetivo principal de este medio de recolección es mantener los COC en un estado funcional óptimo mientras están separados del líquido folicular y otras células contaminantes. El COC está aislado como entidades separadas para ser transferidas al "medio de capacitación".

En otra realización del método in vitro según la invención, el COC de mamífero se pone en contacto con un medio de capacitación como se describió con anterioridad. En dicho método, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación que comprende CNP, estradiol y FSH durante un período de mínimo 2 h a máximo 96 h. En particular, en el método in vitro para la maduración, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como se evidencia, por ejemplo, mediante la reorganización de la cromatina de los ovocitos en una etapa condensada o la denominado configuración de nucléolo rodeado (SN). Aún más en particular, en el método in vitro para la maduración, el reinicio meiótico se analiza evaluando la etapa de maduración nuclear bajo un microscopio invertido. La maduración nuclear del ovocito se califica como etapa de GV (vesícula germinal), etapa de GVBD (descomposición de vesículas germinales) y etapa MII (metafase) o PB (cuerpo polar). En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Como ya se describió en el presente documento, el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de >5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación.

En una realización particular, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación en una placa de cultivo no adherente o adherente. Como será evidente a partir de los ejemplos a continuación, la combinación de una dosis baja de CNP con estradiol y FSH es esencial para prolongar la detención meiótica mediado por CNP. El CNP mantiene eficientemente la detención meiótica en los COC durante al menos 24 horas, pero el CNP solo fue insuficiente para mantener la detención meiótica durante 48 horas. Sin embargo, la combinación de una dosis baja de CNP con estradiol permitió a los COC mantener la detención meiótica durante un período prolongado, aunque la calidad embrionaria final de estos ovocitos después de la FIV no fue lo suficientemente alta. La suplementación de FSH al medio de capacitación, además de CNP y estradiol, también mantuvo los COC en detención meiótica durante un largo período, pero también aumentó el diámetro de los ovocitos y mejoró la calidad del embrión después del procedimiento de FIV.

En otra realización, en el método in vitro de acuerdo con la presente invención, los factores secretados por ovocitos, tales como GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos se añaden al medio de capacitación que comprende CNP, estradiol y FSH. Al igual que la FSH, estos factores secretados por los ovocitos mejoran la competencia de desarrollo de los ovocitos de los folículos antrales pequeños y su calidad embrionaria final.

Como ya se mencionó en el presente documento con anterioridad, en el método in vitro de la presente invención, el COC se pone en contacto adicionalmente con un medio de maduración. En esa etapa, y dado el uso de los medios de capacitación de acuerdo con la presente invención, el ovocito capacitado en etapa de GV encerrado en cúmulos puede madurarse en un medio de maduración con cualquier composición basal que se complemente con una selección de factores de crecimiento. Estos factores de crecimiento se seleccionan de un grupo que consiste, pero no se limitan a factores similares a EGF tales como Anfirregulina o Epirregulina, FSH, LH, moduladores de cAMP, o una combinación de los mismos. Por lo tanto, en una realización adicional, el método de maduración in vitro de la presente invención comprende poner en contacto un COC con un medio de capacitación como se describe aquí, y poner en contacto un COC con un medio de maduración, caracterizado porque el medio de maduración consiste en cualquier composición basal suplementada con una selección de factores de crecimiento como se describe en este documento.

También es un objeto de la presente invención proporcionar un kit para la maduración in vitro de un COC inmaduro de mamífero. Dicho kit comprende un medio de capacitación como se describe en el presente documento y que comprende 1 a 50 nM de CNP, estradiol y FSH. En una realización particular, el kit según la presente invención comprende un medio de capacitación que comprende 1 a 1000 nM de estradiol. En otra realización, el kit comprende de 0,1 a 10 mUI/ml de FSH. En otro aspecto más, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de FSH recombinante, análogos de FSH o moléculas miméticas de FSH. En otra realización más, en el kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 0,1 a 10 ng/ml de insulina. En otro aspecto, el medio de capacitación comprende dosis equipotentes de análogos de insulina o moléculas miméticas de insulina. En otra realización, en el kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende 1 a 50 nM de CNP, preferiblemente 10 a 25 nM de CNP, incluso más preferiblemente 25 nM de CNP; 1 a 1000 nM de estradiol,

preferiblemente 10 nM de estradiol; 0,1 a 10 mUI/ml de FSH, preferiblemente 2,5 o 1 mUI/ml de FSH; y 0,1 a 10 ng/ml de insulina.

En una realización adicional, en un kit de acuerdo con la presente invención, el medio de capacitación comprende un factor secretado por ovocitos. Los factores secretados por ovocitos utilizados en este documento se seleccionan del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8 o cualquier combinación de los mismos. En una realización particular, los factores secretados por ovocitos usados en el presente documento son proteínas recombinantes o proteínas heterodiméricas. En otra realización, el kit para la maduración in vitro de un COC inmaduro de mamífero comprende (a) un medio de recolección que comprende compuestos químicos naturales o artificiales que inhiben las fosfodiesterasas naturales o inhibidores naturales de la meiosis de los ovocitos, (b) un medio de capacitación como se describió anteriormente, (c) un medio de maduración, (d) placas de cultivo adherentes y no adherentes, y (e) instrucciones para el uso del kit. Los kits, como se describe en el presente documento, pueden ser útiles para realizar los métodos descritos en el presente documento junto con instrucciones para llevar a cabo los métodos, que se incluyen en el kit.

Otro aspecto de la presente invención describe el uso de un kit para la maduración in vitro de un COC de mamífero, como se describió anteriormente en este documento. En una realización particular, se describe el uso de un kit que comprende un medio de capacitación como se describió anteriormente en el presente documento. Este uso comprende poner en contacto el COC de los mamíferos con el medio de capacitación durante un período mínimo de 2 h hasta un máximo de 96 h. Más en particular, en el uso de un kit que comprende un medio de capacitación, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación para mantener la detención meiótica y permitir la maduración nuclear y citoplasmática. En particular, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar una etapa avanzada de desarrollo, como se evidencia, por ejemplo, mediante la remodelación de la cromatina en un nucléolo rodeado (SN). En una realización particular adicional, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Como ya se describió aquí, el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de >5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación.

El período de capacitación permite que el ovocito gane competencia para reanudar la meiosis, que solo se evalúa después de que se activa el estímulo meiótico, por ejemplo, el contacto con un medio de maduración. La evaluación de la maduración nuclear de los ovocitos se realiza bajo un microscopio invertido y se evidencia por la descomposición de la vesícula germinal (GVBD) y la extrusión adicional del primer cuerpo polar (PB).

En otra realización, se describe el uso de un kit que comprende (a) un medio de recolección que comprende compuestos químicos naturales o artificiales que inhiben las fosfodiesterasas naturales o inhibidores naturales de la meiosis de los ovocitos, (b) un medio de capacitación como se describió anteriormente, (c) un medio de maduración, (d) placas de cultivo adherentes y/o no adherentes, y (e) instrucciones para el uso del kit. Típicamente, el uso del kit para la maduración in vitro de un COC inmaduro de mamífero comprende el contacto del COC con el medio de recolección durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 2 horas. En otro aspecto, en el uso de un kit de acuerdo con la presente invención, el COC de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período de mínimo 2 h a máximo 96 h. Más en particular, en el uso de un kit que comprende un medio de recolección, un medio de capacitación, un medio de maduración, placas de cultivo adherentes y/o no adherentes e instrucciones de uso, el COC de los mamíferos se pone en contacto con el medio de capacitación para mantener la detención meiótica y para permitir la maduración. En particular, el COC se pone en contacto con el medio de capacitación durante un tiempo suficiente para alcanzar la etapa de GVBD y reiniciar la meiosis, alcanzando así una etapa avanzada de desarrollo, como lo demuestra, por ejemplo, un nucléolo rodeado (SN). Además, el COC de los mamíferos se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período determinado por el tamaño del folículo. Como ya se describió aquí, el tamaño del folículo se determina en el momento de la recuperación de COC como, por ejemplo, mediante imágenes de ultrasonido. Se prefiere que los folículos con un diámetro de 1 a 5 mm permanezcan durante al menos 48 h en el medio de capacitación. Se prefiere que los folículos con un diámetro de > 5 a 10 mm permanezcan durante al menos 24 h en el medio de capacitación, y se prefiere que los folículos con un diámetro de más de 10 mm permanezcan durante al menos 2 h en el medio de capacitación.

El período de capacitación permite que el ovocito gane competencia para reanudar la meiosis, que solo se evalúa después de que se activa el estímulo meiótico, por ejemplo, el contacto con un medio de maduración. La evaluación de la maduración nuclear de los ovocitos se realiza bajo un microscopio invertido y se evidencia por la descomposición de la vesícula germinal (GVBD) y la extrusión adicional del primer cuerpo polar (PB).

En las diferentes realizaciones de la invención, el COC de mamífero es un COC humano.

Otros aspectos de la presente invención son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos para obtener ovocitos de un sujeto, las herramientas y el equipo para manipular ovocitos, los métodos de crioconservación, los métodos de FIV, el cultivo embrionario in vitro y los métodos para colocar embriones en el tracto reproductivo de un paciente son bien conocidos en la técnica y cualquiera de tales métodos adecuados conocidos en la técnica puede

usarse junto con los métodos y composiciones de la presente invención.

La presente invención puede ilustrarse adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Materiales y métodos

*Modelo animal*

Los animales utilizados para el estudio actual fueron CBAB6F1 (híbridos F1 de C57Bl/6j x CBA/ca). Estos animales fueron alojados y criados siguiendo la legislación nacional y con el consentimiento del comité de ética de la Vrije Universiteit Brussel (número de proyecto: 09-216-1).

10 Colección de complejos cúmulos-ovocitos inmaduros (COC) de pequeños folículos antrales y COC preovulatorios de grandes folículos antrales

Para la recolección de COC inmaduros, se recolectaron COC compactos de la primera ola de desarrollo folicular de pequeños folículos antrales de ratones prepúberes (19-21 días de edad), sin administración previa de gonadotropina. Para la recolección de COC preovulatorios (controles), se recolectaron COC compactos perforando grandes folículos antrales de ratones hembra prepúberes (25-27 días de edad) después de 48 horas de cebado con gonadotropina crónica equina 2,5 UI (eCG, Folligon), Intervet, Oss, Países Bajos). El medio de recolección consistió en Leibovitz L-15, que contenía suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor al 10%, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin (todo de Life Technologies, Gante, Bélgica) y suplementado con 200 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX; Sigma, Schnellendorf, Alemania) para prevenir la reiniciación de la meiosis durante el período de recolección y manejo previo al cultivo.

20 Cultivo de los COC

El medio de cultivo basal para el cultivo de COC (fases Pre-MIV e MIV) consistió en  $\alpha$ -MEM, 2,5% de FBS (ambos de Life Technologies, Gante, Bélgica) y 5 ng/mL de insulina, 5 µg/mL de Apo-Transferrina, 5 ng/ml de selenito de sodio (todos de Sigma, Schnellendorf, Alemania).

25 Para los experimentos previos a MIV, se obtuvo CNP-22 de Phoenix Europe (Karlsruhe, Alemania), 17- $\beta$ -estradiol de Sigma, (Schnellendorf, Alemania), y Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (GDF9) de R&D systems Europe (Oxon, Reino Unido).

Para los experimentos que implican MIV, se utilizaron el Factor de crecimiento epidérmico recombinante (r-EGF) (Roche; Mannheim, Alemania) y epirregulina de ratón recombinante (EREG) (R&D systems Europe; Oxon, Reino Unido) como estímulos ovulatorios y los cultivos duraron 18 hs.

30 Cuando se mencionó la hormona estimulante del folículo recombinante (FSH) (Merck-Serono, Ginebra, Suiza), se añadió a los medios Pre-MIV e MIV.

Valoración del reinicio meiótico

35 En los puntos de tiempo especificados, los ovocitos se liberaron mecánicamente de las células del cúmulo compactas o expandidas usando una pipeta de vidrio de diámetro fino controlada por la boca. El reinicio meiótico se analizó evaluando la etapa de maduración nuclear bajo un microscopio invertido equipado con un sistema de contraste de modulación Hoffman (Nikon, Tokio, Japón). La maduración nuclear se puntuó como GV (etapa de vesículas germinales), GVBD (cuando GV no es visible), PB (primer cuerpo polar observado en el espacio perivitelino) o DEG (cuando el ovocito se degeneraba).

40 Evaluación de la configuración de cromatina del ovocito

La configuración de cromatina de los ovocitos se evaluó en ovocitos de vesículas germinales, antes y después del cultivo Pre-MIV. Brevemente, después de la evaluación del reinicio meiótico, los ovocitos GV se tiñeron con 10 µg/ml de Hoechst 33258 (Sigma; Schnellendorf, Alemania) durante 5 minutos. La configuración de la cromatina nucleolar se analizó bajo un microscopio de fluorescencia (IX70; Olympus). La configuración de la cromatina se clasificó como nucléolo no rodeado (NSN), nucléolo rodeado (SN) o etapa de transición (NSN/SN), de acuerdo con el patrón de agregación de cromatina alrededor del nucléolo [27-29]. Los diámetros de algunos de estos ovocitos se registraron antes de la tinción con Hoechst.

45 Procedimiento de fertilización in vitro (FIV)

50 En la prueba final para evaluar la competencia del desarrollo de los ovocitos, después de los períodos de cultivo Pre-MIV + MIV, se realizó la fertilización in vitro (FIV) seguida de cultivo de embriones hasta la etapa de blastocisto. Para

este experimento, se usó EREG de 100 ng/ml como desencadenante para la reanudación meiótica. El medio para la FIV consistió en medio M16, fracción V de albúmina de suero bovino al 3% (BSA) (ambos de Sigma, Schnelldorf, Alemania) y aminoácidos no esenciales (Life Technologies, Gante, Bélgica). El medio de cultivo de embriones consistió en medio M16 y aminoácidos esenciales y no esenciales (Life Technologies, Gante, Bélgica).

- 5 Se recogieron complejos de ovocitos de cúmulo de las diferentes condiciones y se lavaron una vez en medio de FIV. La fertilización in vitro se realizó en medio de FIV usando espermatozoides capacitados (dilución final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml) obtenido de un macho CBAB6F1. Después de 3,5 horas de coincubación a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 100% de humedad, se desnudaron los presuntos cigotos, se lavaron dos veces y se cultivaron en grupos de 10-15 cigotos en 20 µL de medio de cultivo de embriones superpuesto con aceite para cultivo de embriones (Irvine Scientific, Alere; Sint Denijs Westrem, Bélgica) a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 100% de humedad. La tasa de escisión (2 células) se calificó 24 horas después de la FIV. En el día 5, se registraron el desarrollo de blastocistos y la eclosión.

También se evaluó la competencia de los COC inmaduros de pequeños folículos antrales de ratones de 20 días de edad, sometidos a 18 horas de MIV con 100 ng/ml de EREG.

- 15 Se obtuvieron ovocitos cultivados in vivo (controles) de hembras de 25-27 días de edad preparadas durante 48 h con 2,5 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG, Folligon®) seguido de 14 horas con 2,5 UI de hCG (Chorulon®) (ambos de Intervet, Países Bajos). Estos ovocitos fueron inseminados con la misma muestra de espermatozoides y los ovocitos/embriones cultivados en las mismas condiciones que los ovocitos de MIV.

#### Análisis estadístico

- 20 A menos que se mencione lo contrario, los resultados se muestran como la media  $\pm$  DE. ANOVA evaluó las diferencias en la tasa de reanudación meiótica de ovocitos (por etapa meiótica), la configuración de la cromatina y el desarrollo embrionario después de la FIV, entre las diferentes condiciones in vitro, seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey,  $p < 0,05$ . La prueba t no apareada se usó para comparar las tasas de reanudación meiótica al comparar 2 condiciones. Los porcentajes de datos se transformaron (arcoseno) antes de realizar el análisis estadístico.

#### Resultados

- 25 CNP mantiene eficientemente la detención meiótica y retrasa la reanudación meiótica dependiente de EGFR

Los COC preovulatorios, recuperados de ratones cebados con gonadotropina (de 26 a 27 días de edad), se colocaron en cultivo, durante 18 horas, en presencia de 0 (control), 1, 10, 100 nM de CNP-22 y en combinación con 4 ng/mL de EGF.

- 30 El CNP-22 tuvo un efecto dependiente de la dosis en el mantenimiento de la detención meiótica. A una dosis de 100 y 10 nM, la tasa de VG al final del cultivo fue significativamente mayor que a 1 nM y control (96%, 93%, 48% y 0%) (Figura 1A).

- 35 En presencia de EGF, se observó un efecto dependiente de la dosis de CNP-22 sobre la tasa de PB. A una dosis de 10 y 100 nM de CNP-22, muchos ovocitos permanecieron en la etapa de GVBD y, por lo tanto, la tasa de PB permaneció significativamente más baja (35% y 15%, respectivamente) en comparación con control y 1 nM de CNP-22 (98% y 92%, respectivamente) (Figura 1B). Debido a la mayor tasa de ovocitos GVBD observada con tratamientos con CNP de 10 y 100 nM, se realizó un experimento de seguimiento para explorar la posibilidad de un proceso más lento de reanudación meiótica.

- 40 Los COC preovulatorios, recuperados de ratones cebados con gonadotropina, se colocaron en cultivo en ausencia (controles) o en presencia de 25 nM de CNP-22 + 4 ng/ml de EGF, y se evaluó la maduración meiótica a las 2, 4 y 6 horas. Mientras que la reanudación meiótica aumentó de 2 a 6 horas en el grupo de control, se indujeron pocos GVBD en el grupo tratado con CNP-22 + EGF ( $\leq 11\%$ ), dentro del mismo período de tiempo (Figura 2A). Además, los COC colocados en medio CNP-22 + EGF durante 24 horas tuvieron una alta incidencia de ovocitos PB (93%), una cifra significativamente mayor que en los COC cultivados durante el mismo período de tiempo solo en CNP-22 (Figura 2B).

- 45 En conjunto, estos datos sugieren que el CNP-22 puede mantener la detención meiótica durante al menos 24 horas y que la señalización de EGFR puede inducir la reanudación meiótica en los COC mantenidos bajo detención meiótica por el CNP, sin embargo, a un ritmo más lento (6 horas de retraso vs. control).

La detención meiótica prolongada inducida por CNP de COC inmaduros depende de la presencia de estradiol en el entorno de cultivo

- 50 De manera similar al estudio descrito anteriormente, se realizó un estudio replicado con COC inmaduros (muy incompetentes meióticamente/evolutivamente). Dichos COC se recuperaron de pequeños folículos antrales (como se describe en M&M) y se colocaron en cultivo durante 48 horas. Los resultados mostraron que CNP-22 puede mantener la detención meiótica durante 24 horas pero no durante 48 horas (datos no mostrados), por lo tanto, se diseñó un estudio en el que la respuesta al CNP-22 está respaldada por la suplementación media con E2, FSH y GDF9.

Se recuperaron COC inmaduros de pequeños folículos antrales de ratones hembra de 19-20 días de edad y se



colocaron en cultivo durante 48 horas en presencia de 25 nM de CNP-22 y presencia o ausencia de 10 nM 17- $\beta$ -estradiol; además, se evaluaron los efectos de la adición adicional de 2,5 o 5 mUI/ml de FSH y/o 50 ng/ml de GDF9.

5 Los ovocitos de COC cultivados en presencia de 25 nM de CNP (solos) fueron predominantemente incapaces de mantener la detención meiótica, en consecuencia, después de 48 horas de cultivo, la tasa de GV representaba solo el 26% del número total de COC. En contraste, la mayoría de los ovocitos de COC cultivados en presencia de 25 nM de CNP-22 más 10 nM de 17- $\beta$ -estradiol (E2) se mantuvieron de manera eficaz en la etapa de GV ( $\geq 89\%$ ; Figura 3), independientemente de la suplementación con FSH o GDF9.

Efectos de la suplementación con FSH y GDF9 sobre el estado de la condensación de cromatina de ovocitos, el diámetro de los ovocitos y la capacidad de respuesta de COC a la señalización ovulatoria de EGFR

10 Los COC inmaduros se recuperaron de pequeños folículos antrales de ratones hembra (de 19 a 20 días de edad) y se colocaron en cultivo durante 48 horas (condición Pre-MIV) en presencia de 25 nM de CNP-22 y 10 nM de 17- $\beta$ -estradiol y la adición de 2,5 mUI/mL de FSH o 2,5 mUI/mL de FSH + 50 ng/mL de GDF9. Estos pretratamientos fueron seguidos por 18 horas de estímulo ovulatorio con medio que contenía EGF (condición MIV).

15 El análisis de la condensación de cromatina de ovocitos antes y después del tratamiento Pre-MIV reveló que, durante 48 horas de cultivo, la cromatina de ovocitos cambió de una configuración dispersa predominante de nucléolo no rodeado (NSN) a una configuración condensada de nucléolo rodeado (SN). De hecho, antes de Pre-MIV, el 34% de los ovocitos tenían la configuración NSN/SN de transición (66% de NSN), mientras que después de Pre-MIV,  $\geq 68\%$  de los ovocitos, en cada una de las condiciones, mostraron un patrón SN (Figura 4A). Se observó una cantidad absoluta no significativa, pero mayor de patrón de SN (86%) en ovocitos cultivados en presencia de 2,5 mUI/ml de FSH + 50 ng/ml de GDF9.

20 Además, los ovocitos obtenidos después del cultivo Pre-MIV en medio que contenía FSH (sin GDF9) alcanzaron un diámetro medio significativamente mayor que los ovocitos cultivados en medio sin FSH. En consecuencia, inmediatamente después del aislamiento del folículo (antes de Pre-MIV), los ovocitos mostraron un diámetro de 71,9+2,1 mm y después de 48 horas de cultivo, los diámetros de los ovocitos fueron los siguientes: 72,1+1,7 mm; 73,5+1,7 mm y 73,3+1,4 mm para CNP+E2, CNP+E2+FSH y CNP+E2+FSH+GDF9, respectivamente (Figura 4B).

25 Después de Pre-MIV, algunos COC fueron estimulados para la reanudación meiótica con EGF y su tasa de PB se evaluó después de 18 horas. Debido a un retraso en el reinicio meiótico por la presencia de CNP en medio MIV (ver experimento anterior: CNP mantiene eficientemente la detención meiótica y retrasa la reanudación meiótica dependiente de EGFR); Por razones prácticas, en el experimento actual se omitió CNP del medio MIV. Los ovocitos de 3 condiciones de cultivo mostraron una alta tasa de reanudación meiótica: la tasa de PB fue 79%, 78% y 82% de tasa de PB para CNP+E2, CNP+E2+FSH y CNP+E2+FSH+GDF9, respectivamente.

Pre-MIV en presencia de CNP, FSH y GDF9 mejora la calidad de los ovocitos y embriones

Se estudió la competencia de desarrollo de los ovocitos sometidos a un Pre-MIV, seguido de un período de cultivo MIV. Los ovocitos fueron fertilizados in vitro y los embriones se cultivaron hasta el día 5.

35 Para este experimento, se usó EREG como desencadenante meiótico durante la fase MIV y CNP y GDF9 solo se agregaron al medio Pre-MIV y se omitieron del medio MIV.

Después de los períodos de cultivo anteriores a MIV e MIV, las células del cúmulo de todos los tratamientos demostraron una expansión y mucificación profusas en respuesta a EREG.

40 La tasa de dos células (fertilización) no fue diferente entre los diferentes tratamientos (60%, 54% y 56% para CNP+E2, CNP+E2+FSH y CNP+E2+FSH+GDF9, respectivamente). En comparación con la condición CNP+E2, la tasa de blastocistos del día 5/2 células fue mayor para los ovocitos cultivados en medio que contenía FSH o FSH+GDF9; significativamente para este último (Figura 5).

Como referencia, la competencia de 1) COC inmaduros sometidos a MIV (sin un cultivo Pre-MIV) y 2) ovocitos cultivados in vivo después de la hiperestimulación ovárica con eCG seguido de hCG, se muestra en la Figura 5C.

45 Ejemplo 2

50 Los experimentos anteriores muestran que el uso de un medio de capacitación de acuerdo con la invención no solo mantiene los ovocitos bajo detención meiótica, sino que lo hace sin afectar la competencia de tales COC para someterse a MIV. Sin embargo, la acción del CNP no puede considerarse exclusivamente como su acción a través del efecto sobre las fosfodiesterasas (PDE, las enzimas responsables de la degradación del cAMP dentro del ovocito durante la reanudación meiótica); ya que la competencia en el desarrollo de los ovocitos durante la cultura de capacitación se mejoró considerablemente. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que a dosis "bajas", el CNP (en particular en el intervalo de concentración de 1 nM a 50 nM de CNP) tiene otro efecto (adicional) para mejorar la capacidad de desarrollo de los ovocitos al mantener una buena comunicación entre los ovocitos y las células del cúmulo.

En presencia de moduladores de cAMP (específicamente en cultivos de maduración previa que usan inhibidores de PDE3), se ha informado claramente que un problema de desconexión entre cúmulos-corona y ovocitos en cultivos a largo plazo es una limitación del método de inhibidor de PDE, cuando se cultivan COC (Nogueira et al., 2003, Nogueira et al., 2006, Vanhoutte et al., 2009a).

- 5 Para demostrar que el medio de capacitación que contiene CNP en realidad sostiene conexiones de cúmulos-ovocitos, los complejos de cúmulos-ovocitos (COC) de los folículos antrales tempranos de los ratones CBAB6F1 (supra), se colocaron en un medio de cultivo basal para el cultivo de COC y se expusieron a CNP y dos inhibidores de fosfodiesterasa conocidos, PDE3-I (Org9935 y Cilostamida) como comparadores.

#### Materiales y métodos

#### 10 Modelo animal

Los animales utilizados para el presente estudio fueron CBAB6F1 (híbridos F1 de C57Bl/6j x CBA/ca). Estos animales fueron alojados y criados siguiendo la legislación nacional y con el consentimiento del comité de ética de la Vrije Universiteit Brussel (número de proyecto: 14-216-1).

#### Cultivo de los COC

- 15 El medio de cultivo basal para el cultivo de COC (fases pre-MIV e MIV) consistió en  $\alpha$ -MEM, 2,5% de FBS (ambos de Life Technologies, Gante, Bélgica) y 5 ng/mL de insulina, 5 ug/mL de Apo-Transferrina, 5 ng/ml de selenito de sodio (todos de Sigma, Schnellendorf, Alemania). El medio de capacitación consistió en medio basal suplementado con 25 nM de CNP o 1 mM de Org9935 o 1  $\mu$ M de Cilostamida en combinación con 10 nM de 17- $\beta$ -estradiol E2. El CNP se obtuvo de Phoenix Europe (Karlsruhe, Alemania), mientras que la Cilostamida se obtuvo de Enzo Life Sciences (Amberes, Bélgica). Dado que el objetivo del experimento era hacer evidentes diferencias potenciales entre los inhibidores de CNP y PDE3, era crucial evitar la posible interferencia de FSH, por lo tanto, este último se omitió del medio de capacitación. Cuando se probó en presencia de FSH, este último enmascaró el efecto de CNP en la conexión entre el ovocito y las capas circundantes de células del cúmulo, al tener una contribución a dicha conexión que incluso es evidente en presencia de un inhibidor de PDE3 (datos no mostrados).

#### 25 Tinción y análisis de imagen

Las proyecciones transzonales (TZP, extensiones membranosas de la célula de la granulosa que se conectan con el ovocito) se evidenciaron marcando fluorescentemente F-actina con rojo Texas-faloidina o Actin green<sup>TM</sup>, y fueron visibles como filamentos que atraviesan la zona pelúcida (puntas de flecha).

#### Resultados

- 30 Si bien los tres compuestos pudieron mantener la detención meiótica de los ovocitos, el CNP reveló inesperadamente que era un factor capaz de preservar las proyecciones transzonales esenciales para la comunicación bidireccional entre los ovocitos y las capas circundantes de células del cúmulo (Figuras 6 y 7). En la Figura 7, se usó la intensidad de píxel promedio como herramienta para cuantificar la tinción de actina positiva (TZP) que atraviesa la zona pelúcida. El análisis de imagen se realizó con ImageJ y consistió en calcular la intensidad de píxel promedio en la región de interés (ROI) descrita entre las células de ovocitos y cúmulos, en el área donde se encuentra la zona pelúcida. Después del análisis de imagen, se observó que los COC expuestos al CNP mantenían mejor la conectividad entre los ovocitos y las células del cúmulo, a través de proyecciones transzonales (TZP). En la Figura 7(A), Org9935 se usó como inhibidor de PDE3 y los filamentos de actina se evidenciaron con faloidina unida al rojo Texas; mientras que en la Figura 7(B), la cilostamida se usó como inhibidor de PDE3 y los filamentos de actina se evidenciaron con Actin green<sup>TM</sup>.
- 40 Los grupos CNP y PDE3i se compararon estadísticamente utilizando una prueba de Mann Whitney con un valor P para el panel A de 0,0082 y un valor P para el panel B <0,0001.

#### Ejemplo 3

- 45 Cuando los resultados anteriores demuestran que el CNP mejora la conectividad entre los ovocitos y las células del cúmulo en los COC, los siguientes resultados tuvieron como objetivo determinar si esto tendría un impacto en la competencia de desarrollo de dichos COC cultivados a partir de los primeros folículos antrales. En este estudio, se evaluaron los efectos diferenciales de CNP y PDE3i presentes durante un cultivo de capacitación sobre la competencia de desarrollo de los ovocitos encerrados en cúmulos de ratón de los folículos antrales tempranos. Dado que el objetivo del experimento era hacer evidentes diferencias potenciales entre los inhibidores de CNP y PDE3, era crucial evitar la posible interferencia de la FSH; por lo tanto, también en este experimento, este último se omitió del medio de capacitación.

#### Preparación:

Se aislaron complejos de cúmulos-ovocitos inmaduros de folículos antrales tempranos (de ratones no estimulados de 19-20 días de edad). Los COC se colocaron en medio de cultivo basal durante un periodo de 48 horas en presencia de CNP o Cilostamida (inhibidor de PDE3); similar al ejemplo 2.

Se incluyeron dos controles de referencia:

1) Una condición de control donde no se realiza cultivo de capacitación antes de MIV,

2) Un control estándar in vivo, ovocitos maduros completamente desarrollados de ratones de 26 a 27 días de edad. Estos COC se obtuvieron mediante la administración de 48 h de PMSG seguido de hCG a ratones de 23-24 días de edad (protocolo de FIV).

Después del cultivo de capacitación, los COC se maduraron en presencia de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y se fertilizaron in vitro. Se evaluó el desarrollo embrionario posterior a la fertilización.

La adquisición de la competencia de los ovocitos en cada condición se evaluó por su capacidad para madurar, fertilizar (tasa de 2 células) y producir blastocisto de buena calidad (para el día 5 de cultivo de embriones).

10 Análisis estadístico

Las diferencias en la tasa de fertilización y formación de blastocistos entre los grupos CNP y Cilostamida se evaluaron por chi-cuadrado.

Resultados

15 Si bien no se observaron diferencias en la tasa de fertilización de ambos tratamientos (ver Figura 8(A)), la cantidad de blastocisto formado por huevo fertilizado fue significativamente mayor después del cultivo de capacitación en presencia de CNP (ver Figura 8(B)).

Conclusión de los ejemplos 2 y 3

20 Las diferencias inesperadas observadas en la calidad de ovocitos y embriones en estos dos estudios complementarios que comparan inhibidores de PDE y CNP pueden atribuirse a CNP. Estos resultados sugieren que el CNP tiene acciones que se extienden más allá de las mediadas por la regulación de la fosfodiesterasa tipo 3. Además de inhibir la acción de PDE3, el CNP aumenta la conectividad física entre los ovocitos y las células del cúmulo mejorando la adquisición de los factores esenciales para completar el desarrollo final de los ovocitos (maduración citoplasmática).

Ejemplo 4

25 En el Ejemplo 1, se ha demostrado que CNP-22 tenía un efecto dependiente de la dosis en el mantenimiento de la detención meiótica. En el siguiente estudio, se realizaron experimentos adicionales que incluyen un intervalo más amplio de intervalos de CNP.

Preparación:

30 Los materiales y métodos utilizados en este ejemplo adicional son, en consecuencia, comunes con los materiales y métodos utilizados en el Ejemplo 1. Los complejos de cúmulos y ovocitos de ratones de 24 a 26 días de edad se aislaron de folículos antrales crecidos in vivo después de la estimulación con gonadotropina crónica equina 48 h (eCG, Folligon, Intervet, Oss, Países Bajos). Los ratones fueron inyectados con 2,5 UI de eCG cuando tenían 22-24 días de edad. Los COC intactos con al menos 2 capas de células cúmulos se pusieron en cultivo durante un período de 18 horas en presencia de las siguientes dosis de CNP:

- Control (sin CNP)\*

35 - 0,1 nM\*\*

- 1 nM

- 10 nM

- 50 nM\*\*

- 100 nM

40 - 1 μM\*\*

\* Una condición de control, en la que el CNP no está presente en los medios de cultivo.

\*\* 0,1 nM, 50 nM y 1 μM, nuevas dosis probadas (incluidas en las reivindicaciones).

Los COC se recolectaron y cultivaron de acuerdo con los experimentos de dosis anteriores en ratones, proporcionados en el Ejemplo 1.

45 Análisis estadístico

ANOVA evaluó las diferencias en la tasa de reanudación meiótica de ovocitos (por etapa meiótica) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey,  $p < 0,01$ . Los porcentajes de datos se transformaron (arcoseno) antes de realizar el análisis estadístico.

Resultados:

- 5 En general, los experimentos complementarios actuales confirmaron que CNP-22 tenía un efecto dependiente de la dosis en el mantenimiento de la detención meiótica. La detención meiótica de los ovocitos se confirmó por la presencia de una vesícula germinal intacta (GV) bajo el microscopio invertido.

10 La Figura 9A muestra que las dosis de 1 nM, 10 nM, 50 nM y 100 nM mantienen la detención meiótica de los ovocitos a una tasa  $\geq 80\%$  (80%, 98%, 94% y 87%, respectivamente). Sin embargo, solo las dosis de 10 nM y 50 nM fueron significativamente más altas en comparación con la condición de control sin CNP (98%, 94% vs. 50%, respectivamente,  $p < 0,01$ ).

No se registraron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos en la etapa de descomposición de vesículas germinales (GVBD) (Figura 9B).

15 La baja proporción o falta de ovocitos que extruden el primer cuerpo polar (tasa de PB, Figura 9C) a dosis de CNP de 1 nM, 10 nM, 50 nM y 100 nM (los tres últimos son significativamente diferentes en comparación con la condición de control sin CNP,  $p < 0,001$ ), coincidió con los hallazgos de que a estas dosis el CNP muestra un efecto más potente en el mantenimiento de la detención meiótica de los ovocitos.

Inesperadamente, no solo dosis muy bajas como 0,1 nM, sino también dosis muy altas como 1  $\mu\text{M}$  demostraron ser subóptimas en el mantenimiento de los ovocitos detenidos en la etapa de GV.

20 Conclusión:

En conjunto, estos datos sugieren que CNP-22 es capaz de mantener la detención meiótica en ovocitos preovulatorios a una tasa superior al 80% en un intervalo de dosis que varía de 1 nM a 100 nM, y está de acuerdo con la afirmación de que es preferible utilizar una dosis de CNP para mantener todos los ovocitos detenidos en la etapa de GV sería de 10-50 nM, más preferiblemente una dosis de 10-25 nM. Como tal, este comportamiento es diferente del uso de inhibidores de PDE3 donde el aumento de las dosis mantuvo a los ovocitos continuamente detenidos.

Ejemplo 5

30 Para respaldar que los efectos CNP anteriores no se limitan a CNP-22 per se, se realizó un experimento adicional para probar si estos efectos pueden reproducirse mediante análogos de CNP. Se realizó un experimento adicional para probar el efecto del análogo CNP: CNP-53. Similar al CNP-22, el CNP-53 es una de las principales formas endógenas de péptido natriurético C-TYPE, que contiene una secuencia de 53 aminoácidos.

Preparación:

35 Los materiales y métodos usados en este ejemplo adicional son consecuentemente comunes con los materiales y métodos usados en el Ejemplo 4 pero para el uso de CNP-53 en su lugar. Los complejos de cúmulos-ovocitos de ratones de 24-25 días de edad se aislaron de folículos antrales crecidos in vivo después de la estimulación con eCG 48 h. Los ratones fueron inyectados con 2,5 UI de eCG cuando tenían entre 22 y 23 días de edad. Los COC intactos se pusieron en cultivo durante un período de 18 horas en presencia de las siguientes dosis de CNP-53:

- control (sin CNP)\*

- 0,1 nM

- 1 nM

40 - 10 nM

- 50 nM

- 100 nM

- 1  $\mu\text{M}$

- control de 25 nM de CNP-22\*

45 \* Se incluyeron dos condiciones de control: 1) 25 nM de CNP-22 (dosis estándar conocida y utilizada en experimentos previos para mantener la detención meiótica), 2) una condición de control donde el CNP no está presente en los medios de cultivo.

Análisis estadístico

ANOVA evaluó las diferencias en la tasa de reanudación meiótica de ovocitos (por etapa meiótica) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey,  $p < 0,001$ . Los porcentajes de datos se transformaron (arcoseno) antes de realizar el análisis estadístico.

Resultados:

- 5 Similar a los resultados encontrados en los experimentos complementarios usando CNP-22, CNP-53 demostró tener un efecto dependiente de la dosis inesperado (máximo) en el mantenimiento de la detención meiótica de ovocitos.

La Figura 10A muestra que las dosis de CNP-53 de 1 nM, 10 nM, 50 nM y 100 nM mantienen los ovocitos bajo detención meiótica a una tasa significativamente mayor en comparación con la condición de control sin CNP (66%, 98%, 72% y 69% vs. 18%, respectivamente;  $p < 0,001$ ) y comparable al control de CNP-22 (75%,  $p < 0,01$ ).

- 10 No se registraron diferencias significativas en el porcentaje de ovocitos en la etapa de descomposición de vesículas germinales (GVBD) (Figura 10B).

La proporción de ovocitos que extruden el primer cuerpo polar (etapa PB) en dosis de 1 nM, 10 nM, 50 nM y 100 nM fueron significativamente diferentes en comparación con la condición de control sin CNP ( $p < 0,001$ ) y coincidieron con los hallazgos que en estas dosis específicas CNP-53 muestra un efecto más potente en el mantenimiento de la detención meiótica de ovocitos (Figura 10C).

- 15 Inesperadamente, no solo dosis muy bajas como 0,1 nM, sino también dosis muy altas como 1  $\mu$ M demostraron ser subóptimas en el mantenimiento de los ovocitos detenidos en la etapa de GV.

Conclusión:

- 20 En general, estos datos indican que, en comparación con CNP-22, CNP-53 es capaz de mantener una detención meiótica en ovocitos preovulatorios a una velocidad elevada. Además, las dosis a las que CNP-53 es eficiente son similares a las de CNP-22: 1 nM, 10 nM, 50 nM y 100 nM, expresadas de manera diferente en un intervalo de 1 nM a 100 nM de CNP; con un óptimo en un intervalo de dosis de 10 nM a 50 nM para mantener la detención meiótica en todos los ovocitos preovulatorios.

Ejemplo 6

- 25 El hecho de que el medio de capacitación de la presente invención tenga efectos inesperados sobre la maduración de los ovocitos de los folículos pequeños se deduce de los resultados de un seguimiento preclínico. En este estudio, se ha evaluado si un método MIV que utiliza el medio de capacitación de la aplicación instantánea tendría un efecto en el potencial de desarrollo de los ovocitos, si producen ovocitos fertilizables y si hay un aumento en su potencial de formación de blastocistos.

- 30 Población de pacientes:

Los pacientes sometidos a tratamiento MIV involucrados en el estudio (N=15) consintieron en donar una proporción de sus ovocitos para la generación de embriones de investigación y tenían las siguientes características: edad, <37 años; historia clínica del síndrome de ovario poliquístico (PCO o PCOS) según los criterios de Rotterdam (Rotterdam ESHRE/ASRM-patrocinado por el grupo de taller de consenso PCOS, 2004).

- 35 En caso de que los pacientes tuvieran 30 o más folículos en la última ecografía antes de la recuperación de los ovocitos, una parte de estos (generalmente entre 5 y 10) se asignaron al nuevo método MIV; el resto se asignó al protocolo clínico de rutina MIV como parte del tratamiento del paciente.

Todas las pacientes recibieron un protocolo de estimulación personalizado que consiste en una dosis acumulativa de 600 UI de HP-hMG (gonadotrofinas menopáusicas humanas altamente purificadas, de Ferring Pharmaceuticals SA).

- 40 Tan pronto como la paciente demostró al menos 1 folículo principal con diámetros promedio en el intervalo de 10-12 mm en la ecografía, se planificó la extracción del óvulo (OPU) 42 horas después de la última inyección de HP-hMG.

Esta prueba de estudio de principio reclutó 15 casos de hermanos:

Tratamiento experimental = capacitación de COC (utilizando el medio de capacitación de acuerdo con la invención) + MIV

- 45 Brazo clínico de rutina = MIV convencional (Metodología Origio® MIV, adaptada a VUB)

Recuperación de ovocitos inmaduros, cultivo de capacitación, MIV e ICSI

Los complejos de cúmulo-ovocito (COC) se recuperaron de folículos de 2-10 mm con una aguja de un solo lumen de calibre 17 a una presión de aspiración de 70 mmHg, y se recogieron en un "medio de recolección" que contenía 50  $\mu$ M de IBMX (Sigma) suplementado con heparina a 25 UI/ml (Heparin Leo, Leo Pharma, Bélgica).

Los aspirados foliculares en la recolección se diluyeron instantáneamente en medio de recolección (3 ml de llenado previo de medio de recolección por tubo). El contenido de los tubos de recolección se filtró de células sanguíneas contaminantes (filtro de células Falcon; tamaño de malla de 70  $\mu$ m) y los COC se recogieron de la placa de cultivo y se mantuvieron en medios de recolección durante un tiempo máximo de 1 hora. Luego, los COC se lavaron y se cultivaron a 37°C, 6% de CO<sub>2</sub> en aire, en grupos de 10 COC por pocillo como máximo en platos de FIV de 4 pocillos (Nunc; Thermo Fisher Scientific; Dinamarca), cada pocillo contenía 500  $\mu$ l de medio "Nuevo cultivo de capacitación" con 25 nM de CNP (es decir, un medio de capacitación de acuerdo con la invención).

Después de 22-26 horas de cultivo de capacitación, los COC se lavaron a fondo y se transfirieron a medio MIV que contenía 100 ng/ml de anfirregulina recombinante humana (rhAREG) y 100 mUI/ml de FSH recombinante (Gonal-F), y se incubaron durante 30 horas en las mismas condiciones de incubadora para permitir que ocurra la maduración meiótica in vitro.

Treinta horas después del cultivo MIV, los ovocitos se liberaron mecánica y enzimáticamente de sus capas de cúmulos bajo un estereomicroscopio usando hialuronidasa (Cook Medical) y se evaluó la maduración de los ovocitos bajo el microscopio invertido.

Los ovocitos maduros (PB extruidos) involucrados en el brazo de investigación fueron microinyectados con espermatozoides de un donante común y se evaluó el desarrollo del embrión hasta el día 5 (y eventualmente el día 6) después de ICSI.

La fecundación y el desarrollo embrionario se registraron en los puntos de tiempo de evaluación estándar. Embriones del día 3 con buena morfología y considerados transferibles [según el número de blastómeros (al menos 5 células), tasa de fragmentación (máximo 20%), sin evidencia de multinucleación de los blastómeros y/o compactación temprana] fueron clasificados como 'embriones de buena calidad' (GQE).

#### Resultados:

Las Figuras 11 y 12 comparan los resultados del "Nuevo Cultivo de Capacitación + MIV" con el "MIV de rutina" en ovocitos hermanos, confrontados con datos de ICSI europeos (de ciclos normalmente estimulados) y MIV aplicado de forma rutinaria en UZBrussel (2014-2015).

En el primer conjunto de datos (Regular ICSI (Megaset)), se publican resultados de ICSI de rutina convencionales en 374 pacientes superovuladas con HP-hMG y se les han recolectado sus ovocitos de folículos grandes (Estudio Megaset®: (Fuente: Devroey et al. Fertil Steril 2012 Mar; 97(3): 561-71).

El segundo conjunto de fechas (MIV convencional (Origio)) son datos UZBrussel de 413 pacientes que se sometieron a tratamientos MIV convencionales utilizando medios Origio® MIV.

El conjunto de datos final y tercero (capacitación COC + MIV) son resultados del "Nuevo cultivo de capacitación + MIV" (método de la solicitud de patente instantánea) en comparación con sus ovocitos hermanos tratados con los medios Origio® MIV.

La aplicación del método de cultivo de capacitación (es decir, un medio de capacitación de acuerdo con la invención) antes de la MIV humana, indicaba importantes beneficios para el cultivo de COC inmaduros: mayores tasas de maduración nuclear y mayor rendimiento de embrión y blastocisto de día 3 de buena calidad.

La flecha (1) en la Figura 11 muestra que las tasas de maduración de los ovocitos están altamente mejoradas en comparación con la MIV convencional. La flecha (2) en la Figura 11 muestra que las tasas de fertilización son iguales a los ciclos regulares de ICSI o MIV convencional. La flecha (3) en la Figura 11 muestra que el rendimiento de embriones de buena calidad en el día 3 (GQE D3) por número de COC iniciales es casi el doble que en la MIV convencional, comparable a la tasa de embriones de buena calidad obtenidos de ovocitos maduros de ciclos ICSI de folículos grandes.

La flecha (4) en la Figura 12 se refiere al rendimiento de blastocistos de buena calidad en el día 5 o 6 de cultivo, ya sea por número de óvulos fertilizados (2PN) o por ovocitos MII. Los resultados del "cultivo de capacitación" son ligeramente más altos que los de MIV convencional. Sin embargo, el hecho de que los blastocistos de MIV convencionales crezcan aún más solo si la embriología del día 3 es favorable (4 o más embriones excelentes en el día 3) afecta esos resultados de manera positiva. Por lo tanto, cuando se aplica el mismo enfoque al CNP (barra blanca punteada), los resultados son muy superiores a cualquiera de los otros grupos.

La flecha (5) en la Figura 12 se refiere al rendimiento de blastocistos de buena calidad en el día 5 o 6 de cultivo, por número de COC iniciales, en el grupo CNP, son más altos que el MIV convencional (a pesar del sesgo de selección positivo en ese grupo) y más comparable a los ciclos regulares de ICSI. Nuevamente, la política de  $\geq 4$  GQE en el día 3 aplicada al grupo CNP arroja los mejores resultados entre todos los grupos.

#### Conclusión

La aplicación de la etapa de cultivo "nuevo cultivo de capacitación" como parte del tratamiento MIV mejora la maduración de los ovocitos de los folículos pequeños hasta un grado similar a los ovocitos crecidos in vivo (obtenidos

de los folículos grandes después de la estimulación). Los efectos de esta mayor maduración se mantienen durante la embriogénesis temprana, lo que lleva a una cantidad doble de embriones de buena calidad en comparación con la MIV convencional. El logro de un efecto tan sostenido durante la embriogénesis temprana fue más allá de lo esperado y crea un método MIV flexible en comparación con los métodos MIV utilizados actualmente.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un medio de capacitación para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro, en el que el medio comprende 1 - 50 nM de péptido natriurético tipo C (CNP), estradiol y hormona folículo estimulante (FSH).
- 5 2. El medio de capacitación de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medio también comprende 0,1 - 10 ng/ml de insulina.
3. El medio de capacitación de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho medio comprende un factor secretado por ovocitos; en particular, seleccionado del grupo que consiste en GDF-9, BMP-15, FGF-8, sus análogos o cualquier combinación de los mismos.
- 10 4. Un método in vitro para la maduración de un complejo cúmulo-ovocito inmaduro de mamífero, que comprende recolectar un complejo cúmulo-ovocito inmaduro en un medio de recolección, contactar el complejo cúmulo-ovocito de mamífero con un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y contactar, además, los complejos cúmulo-ovocito de mamífero con un medio de maduración.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el complejo cúmulo-ovocito de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación durante un período de mínimo 2 horas a máximo 96 horas.
- 15 6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en el que el complejo cúmulo-ovocito de mamífero se pone en contacto con el medio de capacitación en una placa de cultivo no adherente o adherente; en particular, en una placa de cultivo no adherente.
7. Un kit para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro, que comprende un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 8. Un kit para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro, que comprende:
  - (a) un medio de recolección que comprende compuestos químicos naturales o artificiales que inhiben las fosfodiesterasas naturales o los inhibidores naturales de la meiosis de los ovocitos;
  - (b) un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
  - (c) un medio de maduración;
  - 25 (d) placas de cultivo no adherentes o adherentes; y
  - (e) instrucciones de uso del kit.
- 30 9. Uso de un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro; o el uso de un kit de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro, en el que el complejo cúmulo-ovocito de mamífero se pone en contacto in vitro con el medio de capacitación durante un período de 2 h como máximo a 96 h.
- 35 10. Uso de un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro; o el uso de un kit de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro, en el que el complejo cúmulo-ovocito de mamíferos se pone en contacto con el medio de capacitación en una placa de cultivo no adherente o adherente; en particular, con una placa de cultivo no adherente.
- 40 11. Uso de un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; o el uso de un kit de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, para mantener el ovocito de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero in vitro en detención meiótica.
- 45 12. Uso de un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la maduración in vitro de un complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro; o el uso de un kit de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8 en el que el complejo cúmulo-ovocito de mamífero inmaduro es adecuado para una tecnología de fertilización in vitro o tecnología ICSI.
13. Uso de un medio de capacitación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; o el uso de un kit de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en métodos de preservación de la fertilidad in vitro; en particular en los métodos de preservación de la fertilidad in vitro, incluida la criopreservación de pequeños folículos antrales.
14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el medio de capacitación se usa para la maduración in vitro de dichos folículos antrales pequeños criopreservados.



Figura 1

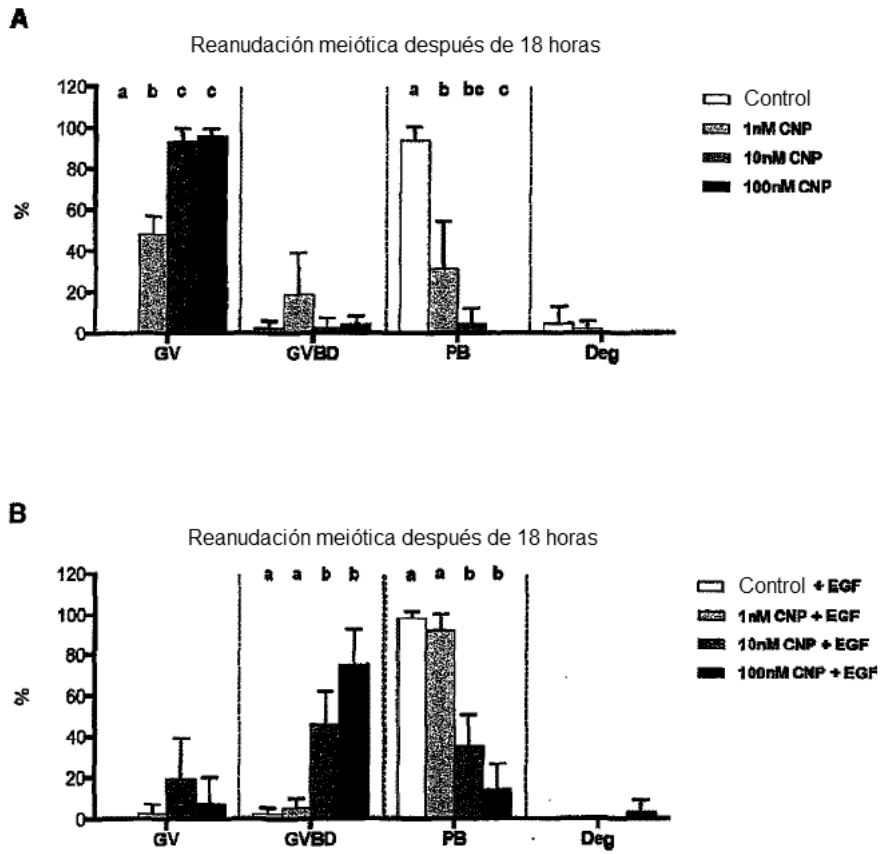


Figura 2

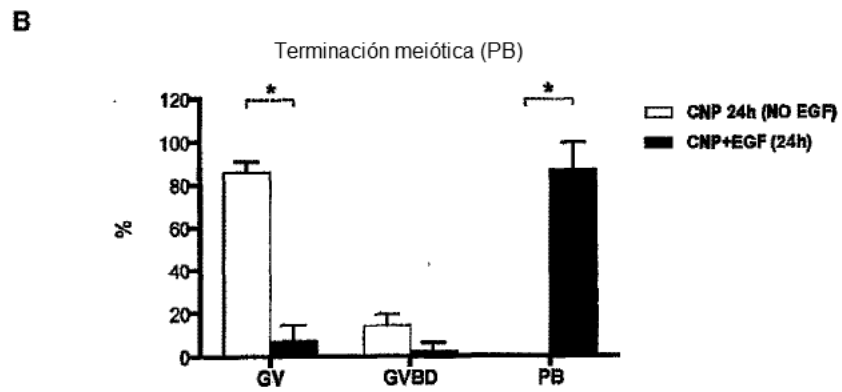
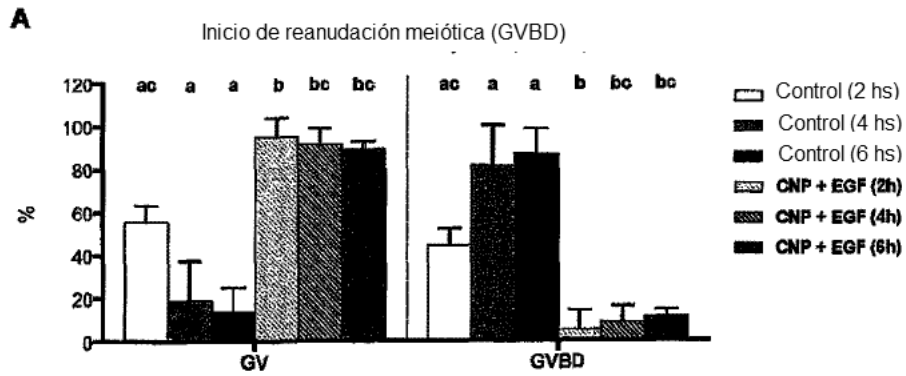


Figura 3

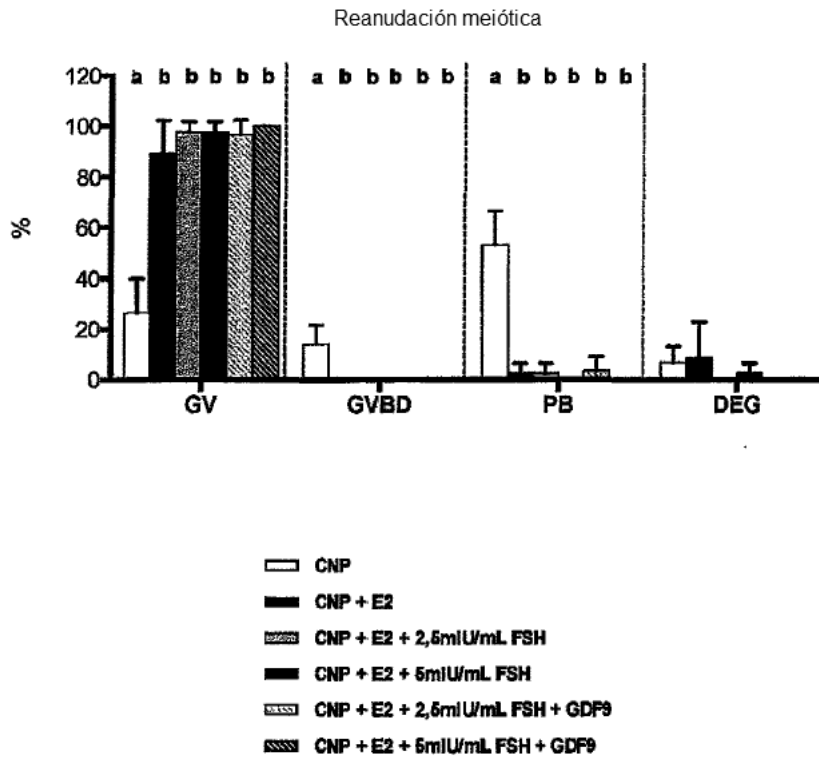
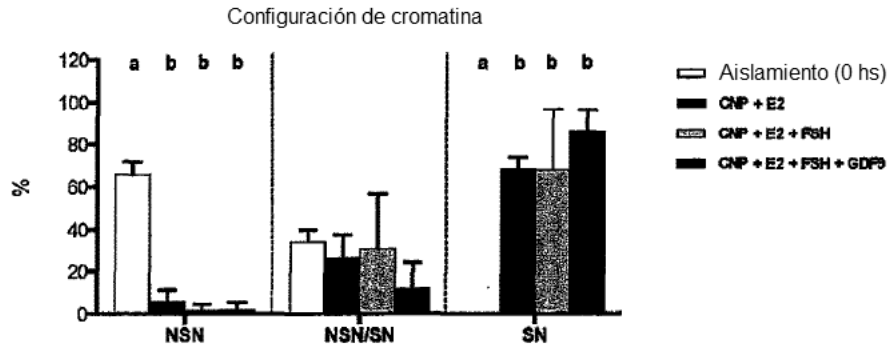


Figura 4

**A**



**B**

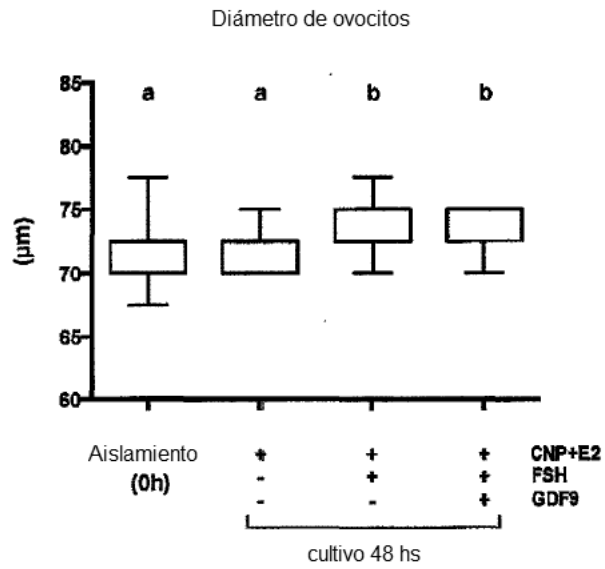


Figura 5

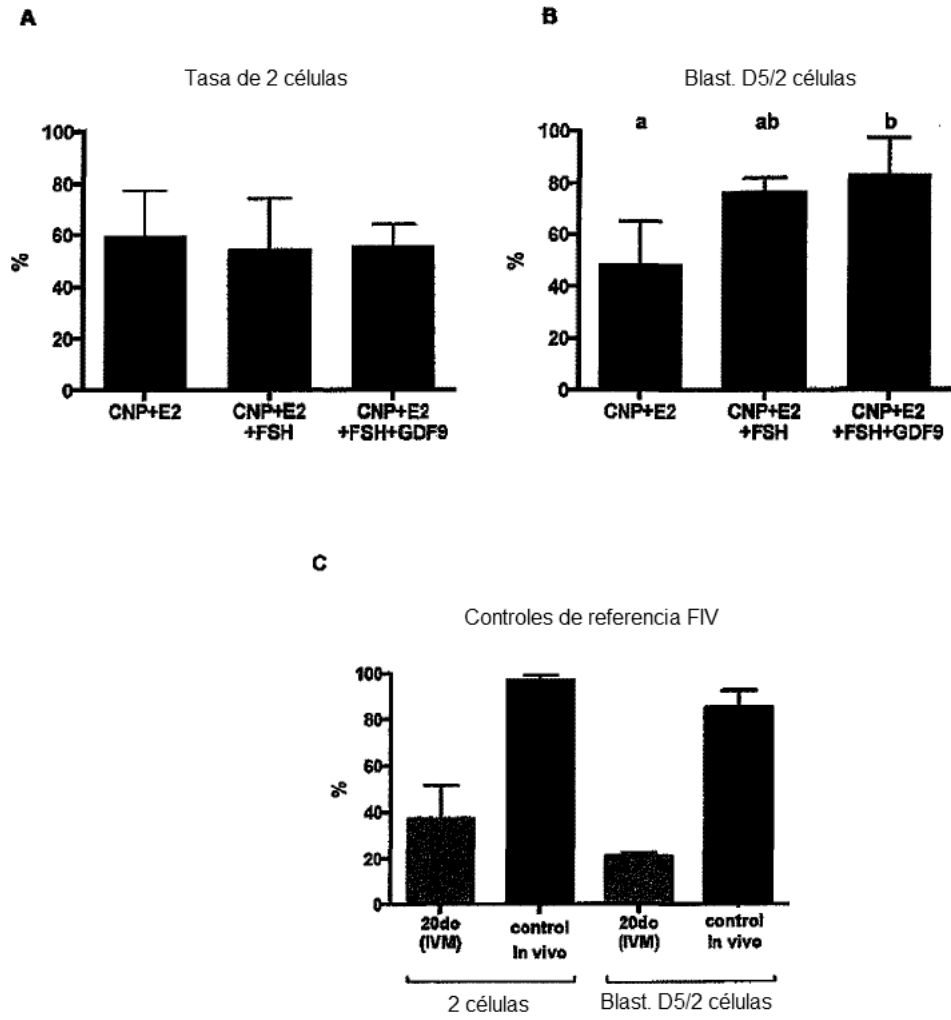


Figura 6

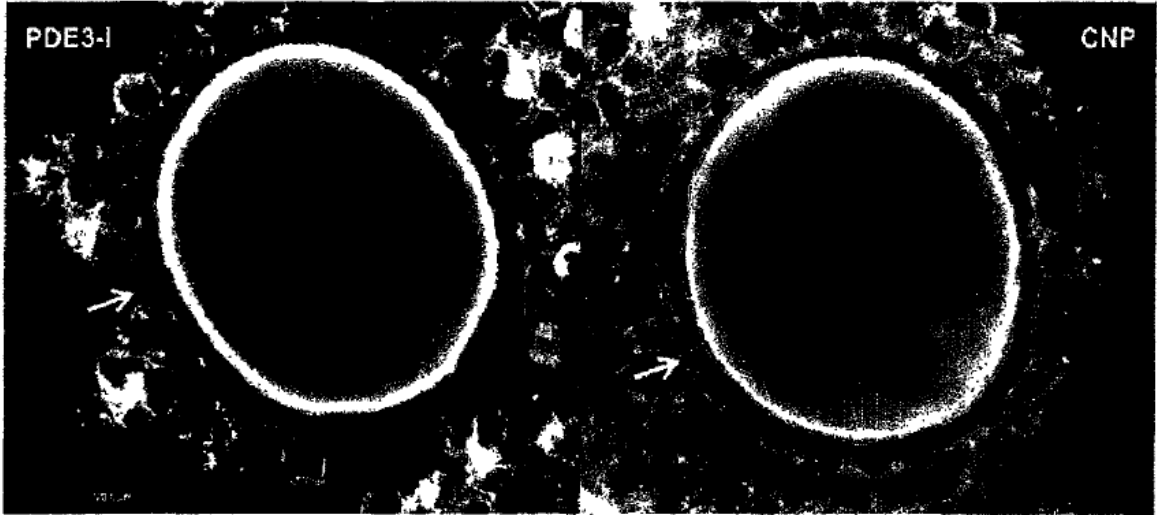


Figura 7

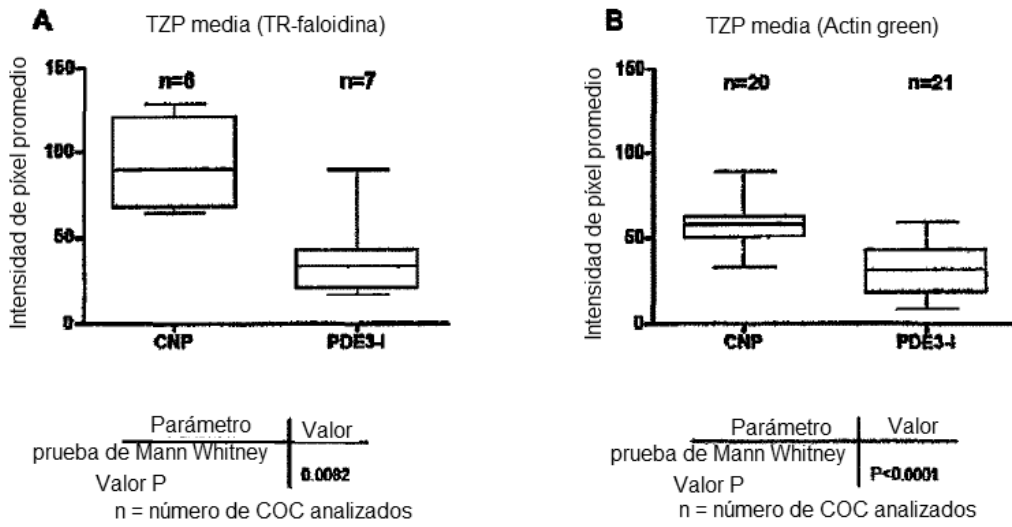


Figura 8

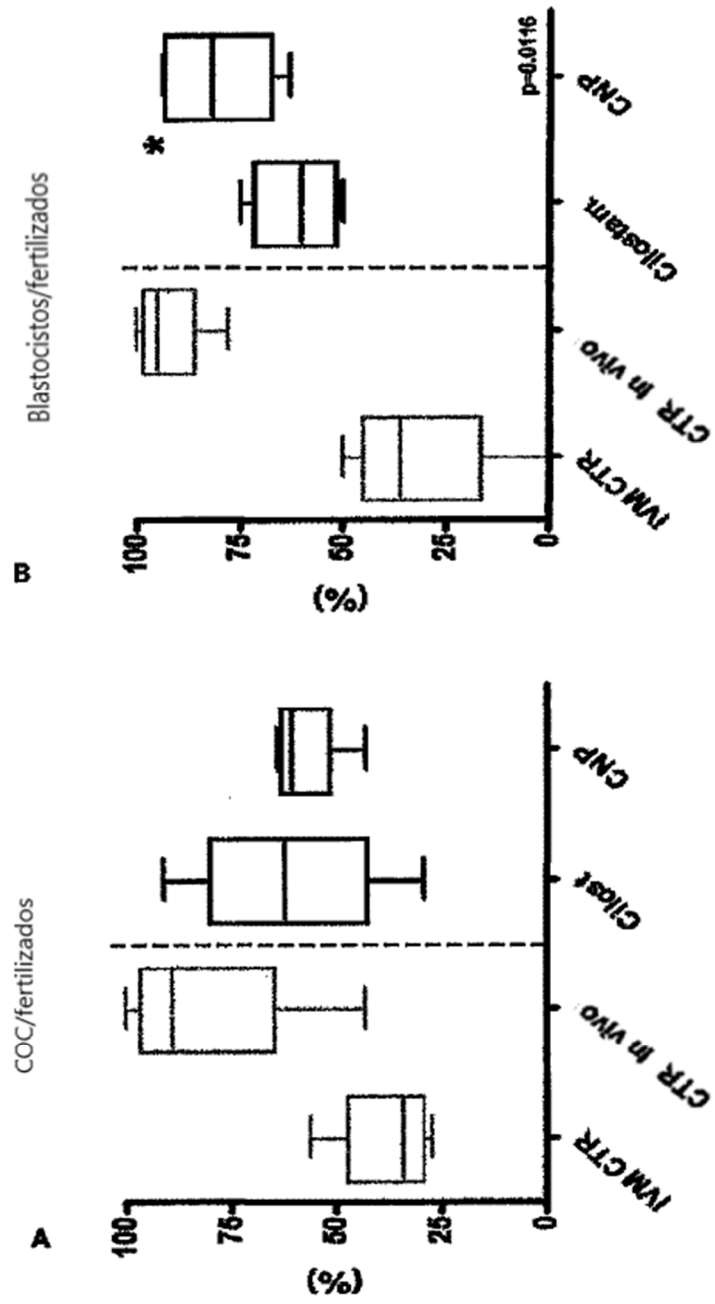


Figura 9

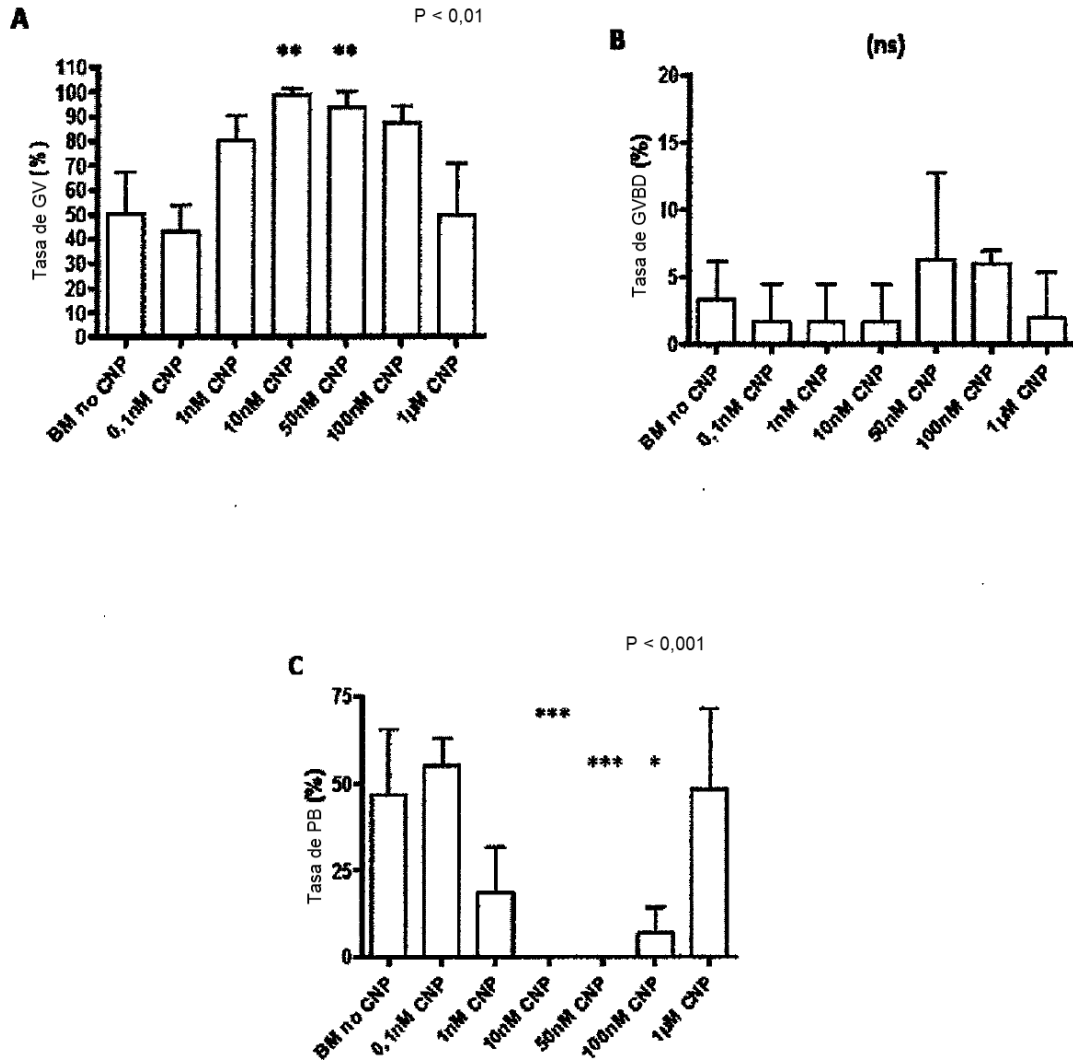




Figura 10

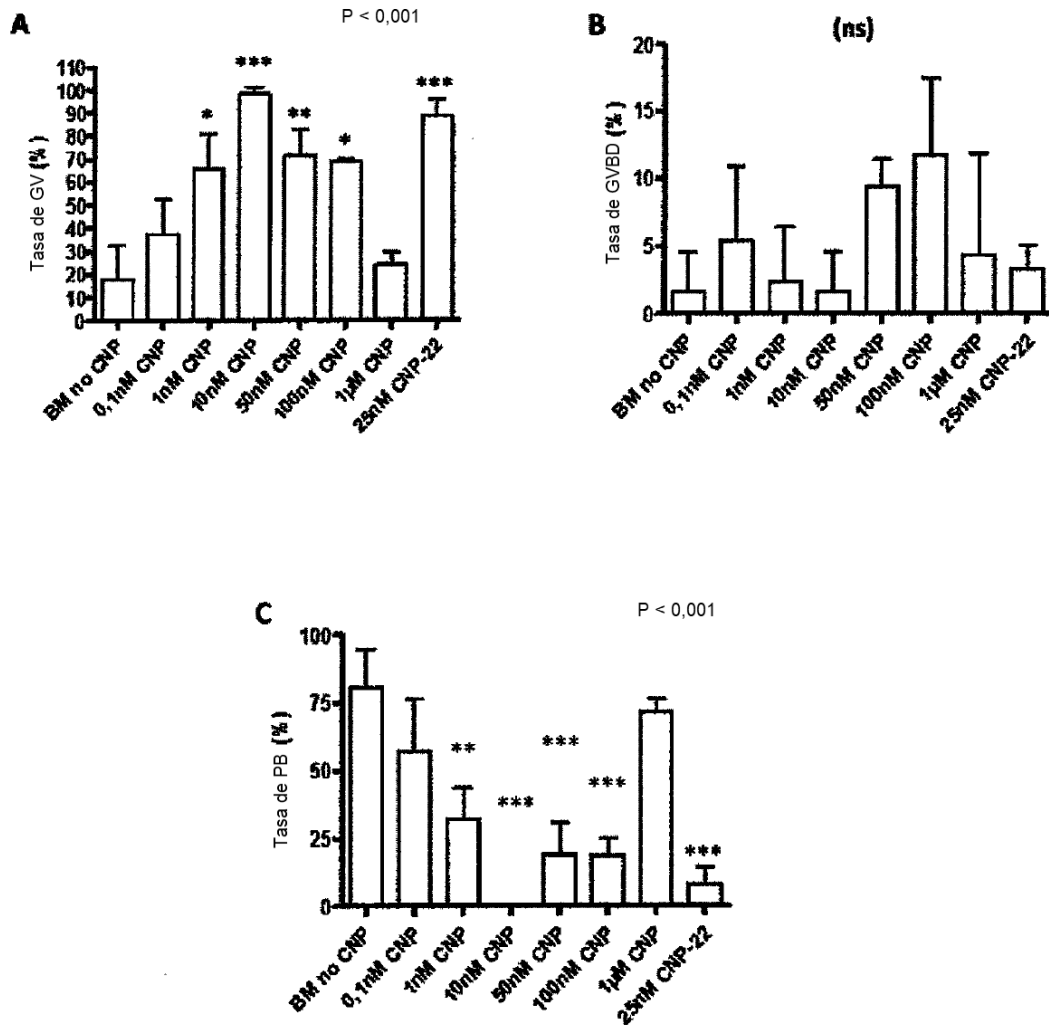


Figura 11

Tasa de maduración y número de embriones de buena calidad (GQE) en D3

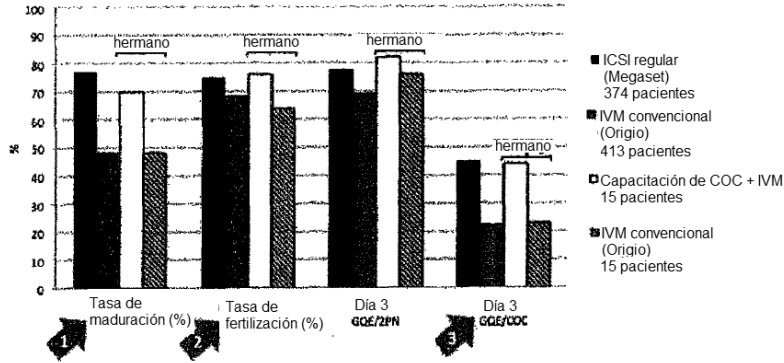


Figura 12

Formación de blastocistos en D5-6

