



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 909**

51 Int. Cl.:
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **95941229 .7**
96 Fecha de presentación : **21.12.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **0799058**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.1997**

54 Título: **Mejoras introducidas en la función endometrial.**

30 Prioridad: **24.12.1994 GB 9426380**
12.10.1995 GB 9520879

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2009

73 Titular/es:
Cambridge University Technical Services Limited
The Old Schools, Trinity Lane
Cambridge CB2 1TS, GB

72 Inventor/es: **Charnock-Jones, David, Stephen;**
Smith, Stephen, Kevin;
Sharkey, Andrew, Mark y
Heap, Robert, Brian

74 Agente: **Díez de Rivera y Elzaburu, Ignacio**

ES 2 323 909 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

Mejoras introducidas en la función endometrial.

5 **Campo de la invención**

Esta invención trata, entre otras cosas, de un método para alterar una o más características del tejido endometrial de mamíferos.

10 **Antecedentes de la invención***Fisiología del endometrio*

Se requieren dos eventos principales para que el embrión se establezca en el útero de los mamíferos: en primer lugar, la preparación del endometrio para hacerlo receptivo a la presencia del blastocisto, que podrá entonces implantarse y adquirir el soporte nutricional a través de la formación de la placenta; y en segundo lugar, la modificación de la actividad del miometrio que deberá transformarse en quiescente para, de esta manera, permitir que el blastocisto anide dentro de la cavidad uterina sin el peligro de su expulsión. Ambos eventos son controlados por la acción de las hormonas del embarazo, de las cuales estrógenos y progesterona son particularmente importantes. Estas hormonas esteroides actúan sobre el endometrio y el miometrio a través de sus receptores, localizados en el núcleo de las células blanco. Una vez activadas, el complejo esteroide-receptor nuclear interactúa con regiones específicas dentro del ADN para estimular, reprimir o des-reprimir genes que codifican proteínas y polipéptidos como enzimas o factores de crecimiento.

La iniciación de la implantación es desencadenada por una cascada de cambios bioquímicos y biofísicos. Se ha implicado a las moléculas de adhesión (por ejemplo CAM 105) en las fases tempranas de la adherencia del blastocisto a la pared del útero. Después, el blastocisto y el endometrio adoptan diversas estrategias para mejorar la intimidad entre los tejidos fetales y maternos. En los ungulados, las células trofoblásticas que forman la capa más exterior del blastocisto, migran hacia el epitelio uterino con el cual posteriormente se funden. La migración celular se produce en una etapa posterior en las mujeres, puesto que no migran solamente tipos celulares aislados o específicos, sino grandes áreas de trofoblasto que se insinúan entre las células epiteliales uterinas. Para realizar esto, algunas de las células trofoblásticas se funden entre ellas para formar un sincitio. El procedimiento es muy rápido y el embrión se establece en los tejidos uterinos sin una degeneración muy evidente en el epitelio uterino. En algunas especies el procedimiento de implantación se demora para esperar señales del medio ambiente que aseguren que los jóvenes nacerán en épocas favorables del año, o por factores fisiológicos tales como la lactancia, de manera que la madre haya terminado de destetar la cría anterior antes de que el próximo embarazo se haya establecido totalmente.

La preparación del útero para la implantación es regulada por la secreción de hormonas ováricas. El transporte del huevo fertilizado a través del oviducto tiene que ser precisamente cronometrado para que arribe en el útero en el momento correcto del desarrollo, cuando el útero está en condiciones adecuadas para recibirlo. En la mayoría de las condiciones el útero es hostil al embrión, de hecho más hostil que algunas otras áreas del cuerpo. El revestimiento epitelial del útero es, en la mayoría de las condiciones, resistente a la unión e invasión por el trofoblasto, y, sólo en estados hormonales muy precisos, se mitiga esa resistencia.

En ratones y ratas, los animales aislados no tienen un ciclo ovulatorio completo porque no forman un cuerpo lúteo secretor que produzca cantidades crecientes de progesterona. Si ocurre un encuentro sexual durante la ovulación, un momento en el que altos niveles de estrógenos son secretados por el folículo ovárico del que se ha desprendido el óvulo, se formará un cuerpo lúteo en el lugar del folículo roto, entonces se secretan concentraciones crecientes de progesterona, se produce la implantación y el embarazo progresa (duración, 21 días). Si el encuentro resulta estéril, se producen eventos similares excepto que el cuerpo lúteo sólo dura alrededor de 11 días y el pseudo-embarazo es interrumpido.

Los cambios celulares y bioquímicos que se producen en el endometrio han sido estudiados de manera más completa en el ratón y la rata, aunque la información sobre estos aspectos en mujeres se ha incrementado sustancialmente en los años recientes. El endometrio en todas las especies está compuesto de tres tejidos principales: epitelio luminal, epitelio glandular y estroma. La proliferación celular sucede en momentos diferentes en los tres tejidos. Las células lumbinales proliferan justo antes de la ovulación (preovulación) bajo la influencia de los niveles crecientes de estrógenos producidos por los folículos en el ovario. En el día 1 del embarazo (día de la copulación en roedores) dejan de dividirse, pero luego sufren un segundo, aunque más pequeño, brote de actividad en el día 3. Las células glandulares muestran la mayor actividad en el día 4 y luego declinan. Las células estromales no proliferan hasta el día 4, pero de allí en adelante, bajo la influencia de progesterona, alcanzan niveles altos de proliferación en el día 5. En mujeres, se conoce menos sobre estos cambios que preceden al procedimiento de implantación, pero parece haber un pico de proliferación en las células epiteliales durante la fase folicular del ciclo y en las células estromales durante la fase lútea o secretora, como en el ratón y la rata.

El propósito de la proliferación celular endometrial no se conoce completamente. Se cree que prepara el endometrio para la implantación a través del incremento del número de células que cumplirán una función nutricional y secretora (epitelio glandular), y que participa en las fases más tempranas de la placentación (decidualización). Como

prerrequisito para una implantación satisfactoria, la mitosis celular puede progresar hacia la diferenciación celular y, por lo tanto, representa un papel crucial en los momentos iniciales del establecimiento del embarazo. La evidencia que confirma este papel, es la producción endometrial de factores de crecimiento (mitógenos), citoquinas y oncogenes nucleares. Muchos de estos compuestos son producidos en concentraciones crecientes en respuesta a las hormonas ováricas que actúan a través de sus receptores.

Entre los factores de crecimiento, se presta mucha atención actualmente al factor de crecimiento epidérmico (FCE), al factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina (FCELH), factores de crecimiento ligados a amfiredulina e insulina (FCI-I y FCI-II). La evidencia acerca de la importancia de la acción local (parácrina) de al menos uno de estos factores de crecimiento, la amfiredulina, ha sido proporcionada por experimentos recientes en ratones. Se logró la inhibición del gen de amfiredulina que controla específicamente la implantación regulada por progesterona, a través del anti-progestínico RU466, obteniendo que se impida la implantación (Das *et al.* Molecular Endocrinology 9, 691-705, 1995).

Entre las citoquinas, estudios de eliminación de genes han demostrado que el factor inhibidor de leucemia (FIL) y el factor estimulante de colonias (FEC), que también son producidos por el útero del ratón al momento de la implantación, son indispensables, demostrando que su eliminación es incompatible con la implantación y la placentación normal (Stewart *et al.* Nature 359, 76-79, 1992; Pollard *et al.* Developmental Biology 148, 273-283, 1991).

Entre los oncogenes nucleares, los niveles de c-jun y c-fos (que son indicadores precoces de la transcripción de genes) aumentan en el útero después de la administración de estrógenos, y son inhibidos por progesterona.

Existen diferencias importantes entre distintas especies en la magnitud de la invasión trofoblástica al momento de la implantación. En las mujeres, el trofoblasto inicial es altamente invasor mientras que en cerdos, que tienen una forma no invasora de implantación, el epitelio endometrial nunca se rompe a lo largo de los tres meses del periodo de gestación. El fracaso de la implantación en ambas especies es alto, alcanzando alrededor de 60 y 30%, respectivamente. Las razones para este alto índice de fracasos son complejas y no se comprenden completamente. En mujeres, aproximadamente la mitad de las pérdidas son atribuibles a anomalías genéticas, pero en cerdos, como en otros ungulados donde la pérdida es también alta, los defectos genéticos sólo constituyen un pequeño porcentaje del total.

Después del fracaso de la implantación en mujeres, una disminución en la secreción de progesterona provoca sangrado, como al final del ciclo menstrual normal; esto no sucede en la mayoría del resto de los animales. Los trastornos en la menstruación y de la implantación son comunes. Además, el sangrado menstrual como consecuencia de la terapia hormonal secuencial, o en conjunción con la terapia hormonal de reemplazo combinada continua o anticonceptivos progestínicos de acción prolongada, es una causa significativa de problemas de salud en mujeres. Las razones subyacentes de este sangrado son motivo de muchos estudios actuales acerca de los mecanismos bioquímicos (por ejemplo prostaglandinas, enzimas, polipéptidos y proteínas, compuestos vasoactivos tales como el factor activador de plaquetas FAP y el factor de crecimiento del endotelio vascular FCEV) y celulares (por ejemplo, células migratorias que se establecen en el útero y producen compuestos inmunosupresores).

El conocimiento actual de los procedimientos reproductivos se centra ampliamente en el control de la producción de hormonas esteroides y las acciones de esas hormonas en los tejidos diana. Sin embargo, los factores parácrinos y autócrinos son vistos crecientemente como mediadores importantes de la función reproductiva, aunque interactuando con esteroides (Benton, 1981 Current Opinion in Cell Biology 3, 171-175; Rozengurt. 1992 Current Opinion in Cell Biology 4, 161-165; Tartakovsky *et al.*, 1991 Developmental Biology 146, 345-352; Robertson *et al.*, 1992 Current Opinion in Immunology 4, 585-590; Smith, 1994 Human Reproduction 9, 936-946; y Tabibzadeh, 1994 Human Reproduction 9, 947-967). El ejemplo más claro de esto, se ve en el ratón ooforectomizado. En este modelo, el útero sufre un crecimiento notable en respuesta a una dosis única de estradiol. Este efecto puede ser bloqueado por el anticuerpo anti-FCT α (FCT es "factor de crecimiento transformante") sugiriendo que los efectos mitógenos del estrógeno en ese tejido son mediados por FCT α (Nelson *et al.*, 1992 Endocrinology 131, 1657-1664).

En consecuencia, la intervención médica en Ginecología está ampliamente basada en la regulación esteroidea/anti-esteroidea del útero (Yen & Jaffe, 1991 in "Reproductive Endocrinology", Eds. Yen, Jaffe & Benton, Pub. WB Saunders, Philadelphia; Baird, 1993 British Medical Bulletin 49, 73-87). A pesar del indudable éxito de este acercamiento, no se han producido adelantos conceptuales en la tecnología anticonceptiva durante 20 años, ni se han identificado medios para mejorar la implantación, ni se hicieron adelantos en la promoción del crecimiento y desarrollo placentarios, ni se lograron nuevas estrategias para tratar la enfermedad ginecológica benigna (disfunción menstrual y fibromas).

Se han realizado una cantidad de publicaciones en relación con el uso de la "transferencia de genes" en mamíferos para alterar el genotipo de por lo menos algunas células en un determinado tejido o tejidos. En especial, es conocido el intento de la "terapia génica" en humanos a través de la introducción de secuencias de ácidos nucleicos en un receptor, con el propósito de superar una deficiencia genética del receptor, a través de la expresión de polipéptidos codificados por las secuencias de ácidos nucleicos introducidas. Se han realizado estudios clínicos de terapia génica en los que, por ejemplo, secuencias de ADN (incorporadas dentro de vectores virales) fueron introducidas en las vías aéreas de los pacientes con fibrosis quística, para alterar el fenotipo de por lo menos algunas de las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio de los pacientes. Hasta ahora, no ha habido intentos publicados de introducir ADN en el endometrio de mamíferos, a pesar de la disponibilidad de técnicas adecuadas para esto.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un método para alterar una o más características de al menos algunas de las células del tracto reproductivo de un individuo mamífero, a través de la introducción en dichas células de un ácido nucleico.

En un segundo aspecto de la invención, proporciona una composición que comprende un ácido nucleico, para usar en la alteración de una o más características de al menos algunas células del tracto reproductivo de un individuo mamífero.

En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de una composición que comprende un ácido nucleico, para alterar una o más características de al menos algunas células del tracto reproductivo de un individuo mamífero.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona el uso de una composición que comprende un ácido nucleico en la preparación de una sustancia para alterar una o más características de al menos algunas células del tracto reproductivo de un individuo mamífero.

En un quinto aspecto, la invención proporciona un método de preparación de una composición para usar en la alteración de una o más características de al menos algunas células del tracto reproductivo de un individuo mamífero, que comprende la mezcla de un ácido nucleico con una sustancia transportadora fisiológicamente aceptable.

La presente invención no puede ser considerada de ninguna manera una extensión obvia de técnicas de terapia genética ya conocidas por tener éxito al menos parcialmente cuando se aplican a los pacientes con fibrosis quística. Se estima que ningún trastorno genético hereditario es el responsable de ninguna de las enfermedades conocidas del endometrio, por lo que no habría ningún incentivo para aquellos expertos en la materia en aplicar técnicas de terapia génica al endometrio. Además, el epitelio del endometrio es de un tipo diferente (cuboide, derivado del epitelio celómico) comparado con el epitelio del pulmón (que es estratificado) y por lo tanto se podría haber supuesto que no se comportarían de manera análoga. Además, al menos en los primates, existe un derrame cíclico del epitelio endometrial que tendería a provocar la pérdida de cualquier célula transfectada. Finalmente, los inventores han descubierto que no hubo ninguna transferencia del ADN introducido hacia los órganos de la madre ni hacia la placenta del embrión, ninguna de las cuales podría haber ocurrido ni provocado dificultades prácticas.

Típicamente, el ácido nucleico es introducido en un mamífero de sexo femenino (preferentemente una mujer) y, en especial, en las células endometriales de ella. De preferencia, el ácido nucleico se introduce en el epitelio glandular del endometrio. El ácido nucleico puede codificar un polipéptido que ya es naturalmente sintetizado por las células en las que el ácido nucleico es introducido, de modo que el nivel de expresión de ese polipéptido se incrementa por el efecto de la dosificación de genes. Alternativamente, el método puede ser usado para inducir a las células que expresen un polipéptido que no fuera previamente sintetizado por aquellas células. El polipéptido podría ser, por ejemplo, un polipéptido recombinante "artificial" que no exista en la naturaleza, como un polipéptido quimérico formado por, totalmente o en parte, dominios funcionales de dos o más proteínas diferentes.

El ácido nucleico es preferentemente ADN, pero uno podría buscar introducir ARN (cadenas con o sin sentido). Una molécula antisentido podría usarse para inhibir o interferir de algún modo con la expresión de un polipéptido en las células en las cuales el ácido nucleico es introducido. La secuencia de ácido nucleico introducida puede ser ARN antisentido, o puede ser una secuencia de ADN que dirija la síntesis, intracelularmente, de un ARN antisentido. Otro modo de lograr esa inhibición, es introducir en las células una secuencia que dirija la síntesis de una ribozima, que romperá específicamente el ARNm que se necesita para sintetizar el polipéptido cuya expresión se busca inhibir.

Los presentes inventores han encontrado que el momento de la administración del ácido nucleico (en relación con el estadio del ciclo reproductivo) afecta enormemente a la eficiencia de captación del ácido nucleico. Los inventores han encontrado que, en general, con el objeto de obtener el grado óptimo de captación del ácido nucleico administrado, es necesario que la administración se realice en el período que sigue a la ovulación, hasta e incluyendo el día en el que se produce un pico en el nivel de progesterona en sangre. El nivel de progesterona normalmente hace un pico aproximadamente al mismo tiempo que el punto en el cual un embrión, si se encuentra en el útero, podría implantarse.

De este modo, por ejemplo, los inventores han encontrado que la captación máxima del ADN administrado por parte del endometrio del ratón, ocurre en el día 2-3 del ciclo (tomando el día 1 como el día en el que se detecta por primera vez una unión vaginal). En humanos, la ovulación ocurre típicamente en el día 14 del ciclo, y se calcula que la implantación generalmente ocurre en el medio de la fase luteínica (aunque el momento exacto es pobremente definido en humanos).

El ácido nucleico puede ser administrado en una forma desnuda, o puede unirse o asociarse con otras sustancias (por ejemplo liposomas). Convenientemente, el ácido nucleico se introduce en las células del mamífero receptor por simple transfección (con o sin liposomas), lo que ha sido encontrado por los presentes inventores como sorprendentemente efectivo, sin necesidad de que la secuencia se introduzca dentro de un vector viral. Sin embargo, los vectores virales pueden ser deseables, especialmente aquellos que pueden ser dirigidos a ciertos tipos celulares (por ejemplo, como se describe en el documento WO 93/20221).

El ácido nucleico puede introducirse convenientemente como parte de una estructura (por ejemplo, un plásmido, cósmido o similar), cuya estructura comprende provechosamente un promotor, funcional en un mamífero, que provoque la transcripción de al menos parte del ácido nucleico introducido. El promotor puede ser constitutivo o, preferentemente, inducible, para permitir un mayor control de la expresión de la secuencia introducida.

En un método particular realizado de acuerdo con la invención, la introducción de una molécula de ácido nucleico en las células endometriales de un individuo mamífero de sexo femenino, permite la regulación en más o en menos de la fertilidad del individuo. La invención puede ser usada especialmente para proporcionar un método de anticoncepción para mascotas (por ejemplo gatos y perros) para evitar crías no deseadas. En otras formas de realización, la invención proporciona un método para mejorar la fertilidad de diversas especies de ganado, como cerdos, vacas, ovejas, y similares.

El ácido nucleico es introducido en el tracto reproductivo preferentemente a través de la vagina, lo que evita la necesidad de un procedimiento quirúrgico invasivo. Sin embargo, si fuera necesario, el ácido nucleico podría ser introducido por medio de un procedimiento quirúrgico directamente en el tracto reproductivo (por ejemplo en el útero). La invención ofrece la posibilidad de alterar una o más características a través de la introducción de una o más secuencias de ácido nucleico de un gran número de diferentes secuencias posibles.

En una forma de realización, la secuencia introducida en las células del tracto reproductivo dirige la expresión (preferentemente a niveles altos) de una porción efectiva de una citoquina o factor de crecimiento (una porción efectiva es la parte de la molécula que retiene la actividad biológica especialmente asociada con el todo, por ejemplo, la unión a un ligando específico, etc.). Ejemplos de estos polipéptidos que podrían ser expresados por la secuencia introducida incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: interleuquinas, factor inhibidor de leucemia (FIL), factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV), factor de crecimiento epidérmico (FCE), factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina (FCELH), factores de crecimiento ligados a insulina I y II (FCI-I y FCI-II), anfieregulina, factor estimulante de colonias (FEC) y factor de necrosis tumoral (FNT).

En otra forma de realización, la secuencia introducida puede dirigir la expresión de una porción efectiva de un antagonista de una citoquina o factor de crecimiento, como el antagonista del receptor de IL-1. De manera provechosa, el antagonista puede ser un receptor soluble para la citoquina o factor de crecimiento. Ejemplos adecuados incluyen receptores solubles para los siguientes: factor de crecimiento de transformación α (FCT α), factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), interleuquina 6 (IL-6), y FCEV.

En otra forma de realización, la secuencia introducida puede dirigir la expresión de una porción efectiva de un polipéptido que tenga un efecto inmunológico. En especial, el polipéptido puede poseer actividad inmunogénica, por lo que serviría para estimular una respuesta inmunológica local, por lo que la invención podría ser usada para proporcionar un método novedoso de inmunización. Sería ventajoso que el polipéptido inmunogénico fuera un antígeno de un patógeno de las mucosas. En razón de que las mucosas comparten un sistema inmunológico común, la estimulación de la producción de anticuerpos en el tracto reproductivo puede ocasionar la producción de los correspondientes anticuerpos en sitios mucosos distantes, como el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, las glándulas lacrimales y similares. Preferentemente, sin embargo, el antígeno sería de un patógeno que invada y/o colonice el tracto reproductivo, típicamente un patógeno que cause una enfermedad de transmisión sexual. Algunos ejemplos incluyen virus como el VIH, papiloma virus (por ejemplo, VPH de distintos tipos), clamidia, y bacterias (por ejemplo, *N. gonorrhoea*). Alternativamente, el polipéptido que tiene un efecto inmunológico puede ser una inmunoglobulina o una porción efectiva de la misma (como un fragmento FAB, FV o scFv, o un anticuerpo de cadena única). La inmunoglobulina o porción efectiva de la misma puede estar dirigida contra un patógeno (como los mencionados anteriormente), o puede estar dirigida contra algún otro antígeno, como un esteroide u otra hormona. Esas inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas, podrían ser expresadas localmente para proporcionar protección contra una enfermedad o para regular la fertilidad.

En otra forma de realización, la secuencia introducida puede dirigir la expresión de un polipéptido, o una porción efectiva del mismo, que tenga un efecto sobre la menstruación.

En otra forma de realización, el ácido nucleico introducido puede dirigir la expresión, sobre la superficie de las células del tracto reproductivo, de una porción efectiva de una molécula de receptor. El receptor podría ser un receptor para una citoquina, una hormona esteroide o un factor de crecimiento (como el receptor de FCE, el receptor de FCT α o el receptor de FCEV). Se conocen una cantidad de receptores descritos como receptores "huérfanos", en los que el ligando que se une al receptor es desconocido. Estos receptores huérfanos son de considerable interés para la industria farmacéutica, dado que pueden proporcionar blancos para nuevos compuestos terapéuticos o profilácticos.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención proporciona un método para caracterizar las propiedades biológicas de un polipéptido, que comprende la introducción de una secuencia codificadora del polipéptido que va a ser caracterizado dentro de las células del tracto reproductivo de un mamífero, y la evaluación de los efectos del polipéptido expresado. Preferentemente el mamífero es un animal de laboratorio, como un ratón o una rata. Convenientemente, el polipéptido que va a ser caracterizado sería un receptor huérfano y típicamente, al menos parte de la caracterización del mismo, comprendería la identificación del ligando del mismo. Generalmente el método incluye el análisis de secciones histológicas tomadas del mamífero de laboratorio y el procesamiento de las mismas a través de cualquiera de las distintas técnicas habituales (por ejemplo, tinciones histoquímicas, hibridación *in situ*, tinciones inmunológicas, etc.).

La presente invención también ofrece una nueva alternativa para la regulación esteroidea de la función endometrial (y por lo tanto de la capacidad reproductiva o fertilidad) a través de la transferencia directa de genes *in vivo*. Para lograr esto, se diseñarían estructuras genéticas para modular específicamente la acción de citoquinas. Esto puede lograrse de diversas maneras. Por ejemplo, podría impedirse que células que producen una citoquina, sinteticen el factor, bloqueando la transcripción y translación con un promotor que lleve una estructura génica antisentido o ribozimas. De forma alternativa, la acción del factor secretado puede ser bloqueada por antagonistas del receptor. Naturalmente existen receptores solubles que rastrean y neutralizan ligandos bioactivos por medio de lo cual actúan como antagonistas competitivos del receptor. Alternativamente, existen antagonistas naturales de receptores, por ejemplo IL-1Ra (antagonista del receptor de interleuquina 1). La administración por vía intraperitoneal de estas proteínas bloquea la implantación del blastocisto en el ratón (Simon *et al.*, 1994, citado en otra parte).

Existe evidencia considerable que muestra que factores de crecimiento solubles secretados por el epitelio del oviducto y del útero, pueden controlar el desarrollo del embrión de mamíferos antes de la implantación, actuando directamente sobre los receptores expresados en el embrión (Pampfer *et al.*, 1990 *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 26, 944-946). A su vez, los embriones en desarrollo producen factores de crecimiento que pueden actuar en forma autócrina, o sobre el endometrio para influir sobre su receptividad. Por ejemplo, en ratones, la expresión de FIL (de los tejidos maternos) está ampliamente aumentada en el epitelio glandular en el día 4, justo antes de la implantación. FIL puede actuar sobre los blastocistos antes de la implantación, los cuales expresan el receptor de FIL (FIL-R). Esta expresión materna de FIL es vital para la implantación dado que, en ratones privados de FIL, los embriones no se implantarán, aunque sí lo harán si se transfieren a hembras pseudo-preñadas (Stewart *et al.*, 1992 citado en otra parte).

Los inventores han extendido su trabajo a humanos y han demostrado por RT-PCR que los embriones humanos expresan el ARNm que codifica el FIL-R, pero no expresan FIL por sí mismos. FIL actúa uniéndose a un receptor FIL-R de baja afinidad. Las uniones de alta afinidad se producen cuando el complejo FIL/FIL-R interactúa con la proteína accesoria de transducción de señal gp130. Los embriones humanos también contienen ARNm que codifica esta proteína (Sharkey *et al.*, 1995 *Biology of Reproduction* 53, 955-962). Los inventores también han demostrado que la secreción de FIL en el epitelio glandular humano es regulada por esteroides, siendo esta secreción máxima en la fase lútea (cerca del momento en que se espera la implantación. Charnock-Jones *et al.*, 1994 citado en otra parte). Además, se ha informado que la administración de FIL a embriones humanos aún no implantados *in vitro*, mejora el desarrollo. Toda esta evidencia confirma la idea que FIL puede ser importante en la implantación humana del mismo modo que lo es en el ratón. Claramente, las citoquinas pueden mediar comunicaciones importantes entre el embrión en la cavidad uterina y el endometrio (en ambas direcciones). La presente invención permite el uso de la transferencia de genes para interrumpir o incrementar esta comunicación, conduciendo a nuevos métodos anticonceptivos o, por el contrario, a mejorar la implantación.

La mayoría de los estudios actuales acerca de la regulación parácrina y autócrina de la función reproductiva, se limitan a un análisis descriptivo por la ausencia de métodos efectivos para modular los niveles locales de citoquina/receptor. La evidencia presentada en esta solicitud indica que la transfección del epitelio uterino *in vitro* es posible. Esto permite manipular el endometrio experimentalmente y ofrece nuevas estrategias terapéuticas. El trabajo siguiente describe en líneas generales el uso de un gen indicador para demostrar que es posible la transferencia de genes al útero *in vivo*. En la práctica, podría usarse cualquier gen (u otra estructura de ADN), capaz de alterar la función uterina. Ejemplos de estos incluyen antagonistas de receptores (por ejemplo IL-1Ra, receptores solubles de FCEV, etc.), citoquinas y factores de crecimiento naturales o modificados, inhibidores de proteasa o receptores de esteroides, y una variedad de ribozimas y estructuras genéticas antisentido. Este trabajo muestra que se pueden transferir genes al endometrio *in vivo* y que esto puede resultar útil en muchas enfermedades endometriales (y placentarias), por ejemplo mejorando la implantación tanto en animales como en humanos, interrumpiendo la implantación (es decir, como anticoncepción), endometriosis y menorragia, hiperplasia y adenocarcinoma.

Usando los protocolos que hemos desarrollado se obtienen los resultados descritos más adelante. Los resultados demuestran que se pueden transferir estructuras genéticas al endometrio tanto *in vivo* (en ratones) como *in vitro*, y que estas estructuras genéticas son activas en la transcripción (y en la translación).

La invención se describirá además por medio de ejemplos ilustrativos y con referencia a los gráficos adjuntos, en los que:

las Figuras 1A y 1B muestran microfotografías de secciones histológicas de endometrio de ratón transfectado con (A) una estructura de plásmido que dirige la expresión de un gen indicador de β -galactosidasa, o (B) un plásmido similar sin el gen indicador. Las células traansfectadas pueden ser claramente identificadas por la intensa tinción oscura (azul) dentro del citoplasma, ausente en la sección B;

la Figura 2 es una microfotografía de células endometriales humanas *in vitro* que han sido transformadas con el mismo plásmido que en la Figura 1A: la tinción oscura (azul) se debe a la expresión del gen indicador fundamentalmente asociada a estructuras glandulares remanentes, mientras que las células que las rodean se tiñen más débilmente;

la Figura 3 es un diagrama de barras que muestra los resultados de un análisis de CAT (en cuentas por tubo) de células endometriales transfectadas exitosamente con un gen que codifica cloranfenicol acetiltransferasa (pcDNA3CAT), comparadas con células transfectadas con un plásmido control (pcDNA3); y

la Figura 4 es un diagrama de barras que muestra los resultados de un análisis de luciferasa (en unidades de luz relativa) de células endometriales exitosamente transfectadas con un gen codificador de luciferasa (pcDNA3LUC) comparadas con células transfectadas con un plásmido control (pcDNA3).

5 Ejemplos

Ejemplo 1

Ratones

10

Se alojaron ratones BALB/cJ maduras nulíparas en una Pequeña Casa para Animales con luz (14 h de luz, 10 h de oscuridad; luces apagadas a las 20.00 h) y temperatura (22°C) controlados, y se alimentaron con comida para ratones y ratas (Labsure; Christopher Hill Group, Poole, Dorset, GB). Se pusieron junto con machos vasectomizados del mismo grupo durante la noche y se examinaron a la mañana siguiente para observar la presencia de apareamiento vaginal. Se estima que el apareamiento ocurrió a las 02:00 h, contándose como hora 0 y día 1 el día en que se detectó el apareamiento por primera vez. Las hembras servidas se alojaron individualmente antes de la experimentación. Se realizó una laparotomía usando procedimientos asépticos bajo anestesia con Metafano (metoxifluorano, C-Vet Ltd., Bury St. Edmunds). Los cuernos uterinos fueron expuestos a través de incisiones ventrales medianas o bilaterales. Se realizaron inyecciones en el extremo del cuerno a nivel de la unión tubo-uterina, o en la base del cuerno a nivel de la unión útero-cervical. Estudios repetidos demostraron que esta última técnica ofrece el mejor método de administración pero, para algunos propósitos, se prefirió la primera cuando fue necesario minimizar las alteraciones del tracto reproductivo.

20

Se realizaron inyecciones de complejos ADN/liposoma (estructura pcDNA3, \pm gen indicador de β -galactosidasa), ADN desnudo o soluciones control (25-100 μ l), a través de la inserción de la extremidad de un Stratapip plano en la base del cuerno. Previamente se colocaron las soluciones dentro del dispositivo a través de un aplicador Travesty que también se utilizó para controlar la inyección lenta de las soluciones dentro del cuerno.

25

Después de la inyección, la incisión se cerró usando sutura de puntos separados, y se permitió que los ratones retornaran a sus jaulas y se les proporcionó comida y agua a gusto.

30

Estructuras de plásmido

Los plásmidos descritos en esta aplicación (a modo de ejemplo) se basan en el vector disponible comercialmente pcDNA3 (Catálogo No. V790-20, de Invitrogen, San Diego, California, USA). El plásmido pcDNA3, sin ningún gen indicador, se usó como control negativo. Los plásmidos experimentales pcDNA3- β gal, pcDNA3-CAT, y pcDNA3-Luc contenían los genes indicadores β -galactosidasa, cloranfenicol acetiltransferasa y luciferasa respectivamente. Estos plásmidos contenían los siguientes elementos genéticos: gen de resistencia a la ampicilina, iniciador de replicación ColE1, promotor CMV (gen indicador), sitio de adición poliA de hormona de crecimiento bovina, iniciador de replicación fl, iniciador de replicación SV40, gen de resistencia a la neomicina y sitio de adición poliA de SV40, en una relación funcional tal que el gen indicador pudiera expresarse en células eucariotas después de la introducción del plásmido. Los plásmidos de ADN fueron purificados de *E. coli* por lisis alcalina y purificados después usando una columna de intercambio iónico Qiagen (de acuerdo con las instrucciones del fabricante).

35

40

Preparación del liposoma

45

El liposoma usado fue una formulación lipídica 3:1 (p/p) de DOPSA (2,3-dioleiloxi-N-[2(espermine-carboxamido)etil]-N-N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato) y DOPE (dioleoilfosfatidil etanolamina) (LipofectAMINE; Gibco BRL Paisley, Scotland). Se usaron una variedad de proporciones ADN:lípido y diferentes volúmenes de inyección como se observa en la Tabla 1. El complejo ADN/liposoma fue constituido inmediatamente antes de cada experimento. Se añadieron 10 μ l de solución de ADN a una solución de lípidos de 10 μ l, se mezcló suavemente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se agregaron 80 μ l de PBS para obtener una concentración final de ADN y lípidos como se presenta en la Tabla 1. Ésta se inyectó entonces en el útero de las ratones pseudo-preñadas (ver la sección anterior con detalles sobre los ratones y el procedimiento quirúrgico).

50

55 *Localización histoquímica de β -galactosidasa*

Los animales fueron sacrificados por inhalación de dióxido de carbono, y se resecaron los cuernos uterinos libres de grasa y mesenterio. Cada cuerno se dividió en 3 secciones, los extremos superior e inferior se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C antes de la cuantificación del contenido de β -galactosidasa. La sección media de cada cuerno se fijó en glutaraldehído al 1,25% en PBS durante 15 minutos, enjuagado en PBS dos veces, y colocado en solución de tinción X-gal (1 mg/ml de X-gal, $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM, $K_4Fe(CN)_6$ 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, NP 40 al 0,02% y deoxicolato de sodio al 0,01%) durante 24 h a temperatura ambiente. Luego las secciones se enjuagaron con PBS/DMSO al 3% (2 x 5 minutos), en etanol al 70% (2 x 5 minutos) y se colocaron en etanol al 100%. Los tejidos fueron embebidos en resina de glicol metacrilato y se cortaron secciones de 7 μ m que fueron teñidas con rojo neutral previo a su examen microscópico.

65

Resultados

La Tabla 1 muestra las diferentes condiciones empleadas y los resultados de la intensidad de tinción de las secciones uterinas después de la administración de los complejos ADN/liposoma. Los resultados expuestos en la Tabla demuestran lo importante del momento de la administración del ADN (plásmido), siendo la administración en el día 2 la que ofrece los mejores niveles de expresión, la administración en el día 3 niveles razonables, y la administración en el día 4 resultó en una expresión muy baja del gen indicador, presumiblemente debido a que las células endometriales ya no tomarían la estructura de ADN en este momento, por razones que aún no han sido dilucidadas completamente.

TABLA 1

Día de la administración (día de la autopsia)	ADN ($\mu\text{g/ml}$)	Lípidos ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de inyección (μl)	Intensidad de tinción histoquímica
2(5)	2	20	50	++
3(5)	2	20	50	++
4(6)	2	20	50	-
2(6)	28	20	50	+++
2(5)	830	20	20	++
4(6)	2	20	50	-
4(6)		20	50	+
4(6)		60	50	
Intensidad de tinción +++ fuerte, ++ moderada, + débil, - ninguna				

Controles

Un ratón seudo-preñado 6 días antes, no inyectado, en el que no se observó tinción de actividad de β -galactosidasa en el útero.

Un ratón seudo-preñado (administración día 2; autopsia día 6) inyectado con 50 μl de pcDNA3 sin galactosidasa (2 $\mu\text{g/ml}$) y lípidos (20 $\mu\text{g/ml}$), en el que no se observó tinción de actividad de β -galactosidasa en el útero.

El examen de las secciones histológicas después de la tinción con X-gal reveló que el epitelio glandular estaba fuertemente teñido y que el epitelio luminal también estaba teñido pero menos intensamente. La tinción óptima se observó en animales transfectados con 2 $\mu\text{g/ml}$ de ADN y 10 $\mu\text{g/ml}$ de lípidos en 50 μl , administrados en el día 2 del seudo-preñado. La Figura 1a muestra una sección de ese animal, y la Figura 1b una sección del animal control que recibió (bajo las mismas condiciones) un plásmido sin el gen β -gal.

Ejemplo 2

Transfección de genes a cultivos primitivos de endometrio humano

Los inventores han demostrado también que las células epiteliales de endometrio humano pueden ser transfectadas *in vitro* con gran eficiencia.

Se usaron el mismo plásmido (pcDNA3 \pm gen indicador de β -galactosidasa) y lípidos del modo ya descrito. Las células endometriales se prepararon por el método de Smith y Kelly (Smith *et al.*, 1987 Prostaglandins 34, 553-561). Una vez que el cultivo estuvo estabilizado, se usó el siguiente protocolo de transfección. Se diluyeron ADN (2 μg) y liposomas (8 μg) cada uno en 100 μl de un medio libre de suero (Opti-MEM1 BRL), se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se agregaron 800 μl de Opti-MEM1. Las células (en placas de 24 pocillos) se lavaron con PBS seguido de un lavado con Opti-MEM1. La mezcla del complejo ADN/liposoma (0,5 ml) se añadió después a las células y se incubó a 37°C durante 3 h en una incubadora de CO₂, después de lo cual se añadió 0,5 ml de medio de cultivo que contenía 20% de suero fetal de becerro. Las células se fijaron (gluteraldehído al 0,1%), se enjuagaron, y se tiñeron con X-gal 24 h después de la transfección.

Este trabajo muestra que los genes pueden ser transferidos al endometrio *in vivo*, a lo que podrá encontrarse utilidad en muchos trastornos endometriales (y placentarios), como por ejemplo mejorar la implantación tanto en

ES 2 323 909 T3

animales como en humanos, alterar la implantación (es decir, anticoncepción), endometriosis, menorragia, hiperplasia y adenocarcinoma.

- Se obtuvieron datos adicionales en relación con la transfección *in vitro* a células epiteliales uterinas humanas purificadas. Esto complementa el trabajo *in vivo* sobre ratones y muestra que, células similares, después de un tiempo mínimo en cultivo, pueden ser transfectadas eficientemente con los mismos liposomas y ADNs usados *in vivo*.

Ejemplo 3

10 Transfección de epitelio endometrial humano *in vitro*

- Se aislaron células epiteliales primitivas humanas de endometrio y se cultivaron de acuerdo con el método de Zhang *et al.*, (J. Cell Science, 1995; 108:323-331). Las células se depositaron en placas convencionales de cultivo de tejido de 6 pocillos para obtener una densidad de 50% de confluencia al día siguiente. Las células se cultivaron durante 15 5 días, después se traspasaron a placas de 24 pocillos, a una densidad de 60.000 células por pocillo. Al día siguiente, las células fueron transfectadas con complejos de ADN/liposoma (ADN/LC). Éstos fueron preparados de la forma siguiente:

Procedimiento de transfección

- 20 Aparato

LipofectAMINE (Catálogo Gibco No. 18324-012). Opti-MEM1 (Catálogo Gibco No. 51985-018). Plato de cultivo de 24 pocillos.

- 25 Medio de cultivo celular según fue descrito por Zhang *et al.* (citado anteriormente).

- Este está formado por DMEM/HEPES, FCS al 10%, suplemento de crecimiento celular endotelial (Catálogo Sigma No. E-2759) a 30 $\mu\text{g/ml}$, heparina (Catálogo Sigma No. H-3149) a 90 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina (Catálogo Sigma No. G-1272) a 5 $\mu\text{g/ml}$, y fungizona (Catálogo Gibco No. 15290-018) a 1 $\mu\text{g/ml}$. También se usaron Mg^{++} , PBS libre de Ca^{++} y un tubo Eppendorf de 2 ml.

- Se usaron dos estructuras de plásmidos diferentes que contenían diferentes genes indicadores. El pcDNA3CAT se obtuvo de Invitrogen Corporation, y contiene un gen indicador que codifica la enzima cloranfenicol acetiltransferasa. El segundo plásmido, pcDNA31uc comprende el mismo vector, pero el gen CAT fue reemplazado con el gen codificador de la enzima de luciérnagas luciferasa. La preparación a gran escala de los vectores se realizó con el sistema Qiagen midiprep. Como control negativo se usó pcDNA3 sin ningún gen indicador.

40 Preparación de los complejos ADN/Liposoma

1) Solución A

- Diluir 1 μg de ADN en 100 μl de Opti-MEM1 en un tubo Eppendorf. Usar ADN a una concentración final de 1 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de transfección

2) Solución B

- Diluir 4 μl de LipofectAMINE en 100 μl de Opti-MEM1 en un tubo Eppendorf. Usar lipofectAMINE a una concentración final de 8 $\mu\text{g/ml}$ en el medio de transfección.

3) Combinar las dos soluciones A y B en un nuevo tubo y mezclar suavemente.

4) Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

55 Enjuague celular

1) Antes de la transfección, enjuagar fuertemente la monocapa celular tres veces con PBS FRESCO sin suero.

- 2) Volver a enjuagar la monocapa celular dos veces con Opti-MEM1.

Transfección

- 1) Agregar 800 μl (total 1,0 ml) de Opti-MEM a cada tubo que contiene la mezcla de ADN-lípido. Concentración final de ADN 1 $\mu\text{g/ml}$, y concentración de lipofectAMINE 8 $\mu\text{g/ml}$.

2) Quitar el Opti-MEM1 de la monocapa celular.

ES 2 323 909 T3

3) Mezclar la mezcla ADN/LC suavemente y cubrir las células lavadas con la solución del complejo diluída, 0,5 ml/24 pocillos.

4) Incubar la monocapa celular durante 3 horas a 37°C en incubador de CO₂.

Cultivo celular posterior

1) 3 horas después, quitar la mezcla de transfección y agregar 2 ml del medio de Zhang a cada pocillo, y cultivar.

Análisis cuantitativo

Las células son extraídas y analizadas su actividad indicadora para CAT o luciferasa a las 24 a 48 horas después de la transfección, según corresponda.

1. Enjuagar las células tres veces en PBS.

2. Extraer las células con 300 microlitros de tampón Lysis (Catálogo Promega No. E-3871), quitar completamente las células hacia un tubo Eppendorf.

3. Congelar el extracto rápidamente a -70°C y almacenar hasta el análisis.

4. Para realizar el análisis, descongelar el extracto y centrifugar a 13.000 g durante 5 minutos.

5. Repetir el ciclo congelado/descongelado/centrifugado una vez más.

6. Analizar la actividad del gen indicador luciferasa usando el kit de análisis Luciferasa de Tropix (Catálogo No. BC 100L). Usar 40 µl de cada extracto por tubo.

7. La actividad del gen indicador CAT se analiza usando el kit Quan-I-CAT de Amersham (Catálogo No. TRK 1012).

Resultados

Se transfectaron células epiteliales endometriales primitivas en placas de 24 pocillos como se describió anteriormente. Las transfecciones se realizaron en pocillos triples con pcDNA3 (como control), pcDNACAT, y pcDNA3LUC. Después de 48 horas se recolectaron las células y se analizó la actividad de luciferasa o CAT.

La enzima CAT cataliza la transferencia de grupos acetilo de la acetil coenzima A al cloranfenicol. El uso de acetil coA tritiada provoca la transferencia del radiomarcador al cloranfenicol. La actividad de CAT en una muestra es directamente proporcional a la cantidad de cloranfenicol tritiado producido. Por lo tanto, los resultados se expresan como cpm por tubo. Se puede producir una curva patrón usando un tampón de lisis que contiene cantidades conocidas de CAT purificado.

Los resultados se exponen en la Figura 3, un diagrama de barras que muestra la media \pm sem para determinaciones triples de un experimento típico. Los resultados en forma numérica son los que se observan debajo, con la actividad CAT en las células tratadas con pcDNA3CAT aproximadamente 6 veces más grande que en las muestras de control, lo que demuestra una transfección exitosa a las células endometriales.

pcDNA3	pcDNA3CAT
710	4480
616	4134
662	3234
media 662 \pm 271	3951 \pm 372

En el análisis para luciferasa, el extracto celular conteniendo luciferasa es mezclado con su sustrato luciferina, lo que provoca la emisión de luz. La intensidad de la señal luminosa es proporcional a la enzima luciferasa presente en el extracto, y puede ser medida con un luminómetro. Los resultados iniciales se obtienen como unidades de luz relativa.

Los resultados se exponen en la Figura 4, un diagrama de barras que ilustra la media \pm sem para determinaciones triples de un experimento típico. Los resultados en forma numérica son los que se muestran abajo. La señal de las

células tratadas con pcDNA3LUC fue 30 veces más grande que la señal basal de las muestras control, demostrando nuevamente una transfección exitosa a las células endometriales.

Ejemplos de posibles aplicaciones de la transferencia de genes endometriales

Al menos siete diferentes tipos de estructuras génicas podrían ser transfectados en el endometrio para obtener una variedad de diferentes efectos. Seguidamente, se describirán cada uno de estos diferentes tipos.

1) *Sobreexpresión de citoquinas y factores de crecimiento*

Estas son, conceptualmente, el tipo de estructuras más simples, diseñadas para sobreexpresar una citoquina o un factor de crecimiento en las células epiteliales endometriales. Ejemplos de ADNc apropiadas para esta sobreexpresión incluyen los que codifican FIL, FCVE, FCE, FEC, FNT, Amfiredulina, y una variedad de interleuquinas y factores estimulantes de colonias. Se ha observado que éstos se expresan naturalmente en el endometrio y se cree que son importantes en la regulación de la función endometrial (Stewart *et al.*, 1992, *Nature*, 359, 76-79; Charnock-Jones *et al.*, 1994, *Journal of Reproduction and Fertility*, 101, 421-426; Charnock-Jones *et al.*, 1993, *Biology of Reproduction*, 48, 1120-1128; Das *et al.*, 1995, *Molecular Endocrinology*, 9, 691; Tabibzadeh (1994, *Human Reproduction Update*, 9, 947-967) ha publicado una revisión extensa en este campo). Cada uno de estos agentes afecta a diferentes aspectos de la función reproductiva incluyendo implantación, desarrollo de vasos sanguíneos y biología leucocitaria. Por lo tanto, las posibles indicaciones para la administración de estas estructuras serán las que se deseen para mejorar la fertilidad, especialmente en especies de ganado, o prevenir la concepción en humanos y sus mascotas, y también para tratar una variedad de trastornos de la menstruación en humanos.

Un ejemplo de un experimento diseñado para mejorar la fertilidad del ganado

Se ha demostrado que FIL es esencial para el procedimiento de implantación (Stewart *et al.*, citado anteriormente). Este factor es producido por el endometrio en el momento de la implantación. Por lo tanto, es posible que en especies donde los índices de pérdida de embriones son altos, incrementar los niveles de expresión de FIL del endometrio al momento de la implantación pueda reducir esos índices de pérdida. Por lo tanto, la transfección de una estructura génica diseñada para dirigir la síntesis de FIL por el endometrio al momento de la implantación, pueda mejorar los índices de fertilidad en esta especie. Las estructuras transfectadas en el endometrio necesitarán contener secuencias reguladoras que aseguren que la proteína FIL sea producida en el momento apropiado. Es probable que esto pueda lograrse usando un promotor del gen FIL de la especie en cuestión.

También pueden concebirse tratamientos diseñados para aliviar la disfunción menstrual en mujeres, usando transferencia de genes del endometrio. Un ejemplo de esto sería alterar el desarrollo de los vasos sanguíneos dentro del endometrio, mediante la transfección de un gen que codifique factores de crecimiento angiogénico, por ejemplo FCEV. Se podría esperar que un aumento local en la producción de FCEV aumentara el crecimiento capilar y, por lo tanto, estimulara el engrosamiento del endometrio. Igualmente, el incremento de los niveles de FCEV puede facilitar la reparación de los capilares después de la menstruación y, por consiguiente, los patrones de sangrado de las pacientes tratadas con este tipo de estructuras.

2) *Sobreexpresión de receptores*

Podría anticiparse que el incremento del número y tipo de receptores expresados por el epitelio del útero, tendría consecuencias biológicas significativas. Los tipos de receptores que uno puede querer sobreexpresar incluyen, pero no se limitan a, receptores de factores de crecimiento y citoquinas para, por ejemplo, FCE, FCT α , FCEV y una variedad de factores estimulantes de colonias e interleuquinas. También los receptores de hormonas esteroides son adecuados para su expresión en las células epiteliales. Podría esperarse que esta transfección fuera útil cuando uno quiere mejorar la fertilidad, prevenir la concepción, tratar trastornos menstruales y también elucidar la función de receptores huérfanos (receptores huérfanos son receptores en los cuales el ligando no está actualmente identificado). Los receptores huérfanos representan un área de gran interés para la industria farmacéutica, dado que la caracterización del ligando puede conducir a la generación de nuevos fármacos.

Cada vez más se reconoce que el desarrollo del endometrio es un procedimiento complejo mediado por la interacción de muchas citoquinas y sus receptores, y que los efectos estimulantes de los esteroides ováricos son mediados frecuentemente por estas citoquinas. En especial, se ha demostrado (Nelson *et al.*, 1992, *Endocrinology*, 131, 1657-1644) que el FCT α es un potencial mediador de la acción de los estrógenos en el útero del ratón. Por lo tanto, podría esperarse que la transfección de estructuras dirigidas a la síntesis de este factor, promoviera el crecimiento endometrial y, de esta manera, podría aumentar la fertilidad en situaciones en las que el endometrio no se hubiera desarrollado adecuadamente. De la misma manera, podría anticiparse que este factor promovería la reparación de la superficie epitelial después de la menstruación y, de este modo, sería útil en el tratamiento de la menorragia.

Existen distintos miembros de la super-familia de las hormonas esteroides para los que el ligando es actualmente desconocido. La transfección de esos ADNc al endometrio, podría ser de gran beneficio para elucidar la función biológica de estos receptores y, por lo tanto, poder encontrar una aplicación en la investigación de nuevos agentes farmacéuticos que actuaran sobre estos receptores (Evans 1966, *Science* 240, 889-895).

3) Transfección de estructuras diseñadas para bloquear o impedir la acción de citoquinas, factores de crecimiento y otras hormonas

La transfección de antagonistas naturales de citoquina y factores de crecimiento, abre la posibilidad para la modulación de la función endometrial. Un ejemplo de estos antagonistas sería el antagonista del receptor de la interleuquina 1 (Hannun *et al.*, 1990 Nature 343, 336). Se ha demostrado que la administración de esta proteína bloquea el embarazo en ratones (Simon *et al.* 1994 Endocrinology 134, 521-528). Se han descrito receptores solubles en una variedad de sistemas de factores de crecimiento/citoquinas. Por ejemplo FNT (Engelmann *et al.*, 1990, J. Biol. Chem. 265, 14497-14504), FCF (Givol *et al.*, 1992, FASEB Journal, 6, 3362-3369), FCDP (Tiesman & Hart. 1993. J. Biol. Chem. 268, 9621-9628) e IL-6 (Novick *et al.*, 1989, J. Exp. Med. 170, 1409-1414). La característica común es que el dominio de unión del ligando extracelular del receptor, es liberado de la célula como un factor soluble libre. Esto se logra por proteólisis o por el empalme alternativo que genera una molécula de proteínas truncadas sin los dominios de transmembrana e intracelular. Kendall y Thomas (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 10705-10709) describieron una variante soluble del encastre del receptor de FCEV. Esta proteína fue capaz de bloquear la acción del FCEV *in vitro*. Hemos aislado otras tres variantes solubles que codifican ADNc (ver el documento PCT/GB95/01213). El uso de estos agentes naturales tiene diversas ventajas sobre otros antagonistas (por ejemplo anticuerpos anti-FCEV). Dado que ellos se encuentran naturalmente en el cuerpo, uno podría anticipar que no provocarían una respuesta inmunológica y deberían ser bien tolerados. Además, dado que son derivados del receptor asociado a membranas, las características de unión serán muy similares y será completada de manera muy efectiva por el ligando. Es posible que otros receptores soluble existan naturalmente o que puedan ser diseñados por ingeniería *in vitro*. También es posible que si el dominio de unión del ligando de un miembro de la familia de receptores de hormonas esteroides fuera expresado, actuaría como un receptor dominante negativo que completaría al ligando si se expresara dentro de la célula en niveles suficientemente altos. Alternativamente, un "receptor" no-activante pero que se una al ADN, podría ser usado para bloquear la transcripción génica. Esta aplicación sería útil para antagonizar la acción sobre esteroides naturales incluyendo aquellos que son ligandos aún no identificados de receptores huérfanos (Pemrick *et al.*, 1994, Leukemia 8, 1797-1806). Los receptores de señal deficiente de la familia de siete receptores de dominio de transmembrana podrían también ser diseñados por ingeniería y transferidos.

Se ha demostrado que el antagonista soluble del receptor de interleuquina 1 (Eisenberg *et al.*, 1990 Nature 343, 341) antagoniza las acciones de IL-1 *in vivo* (Simon *et al.* 1994 Endocrinology 134, 521-528). Se esperaría que la transfección al endometrio con una estructura de ADNc diseñada para dirigir la síntesis del antagonista, bloqueara el embarazo en ratones.

Otros factores que podrían antagonizar la acción de factores de crecimiento o citoquinas incluyen variantes solubles de receptores naturales, por ejemplo la variante soluble del receptor de FCEV que ha sido descrita por Kendall & Thomas (1993, citado anteriormente) y también por Brocock *et al.* (1995 J. Natl. Cancer Ins. 87, 506-516). Podría esperarse que la producción local de estos productos antagonizara las acciones del FCEV y condujera a un uso terapéutico útil en situaciones donde existe hiperproliferación de células endoteliales, por ejemplo, en una variedad de trastornos menstruales en los que se quiere reducir la densidad de los capilares del endometrio. Esto incluiría enfermedades malignas.

4) Uso de métodos antisentido para evitar la producción local de una proteína (o enzima) específica

Un acercamiento alternativo para bloquear la acción de citoquinas, factores de crecimiento y hormonas, sería el uso de tecnología antisentido o de ribozimas para bloquear la producción de los ligandos o la producción de los receptores en las células correspondientes (James, 1991 Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 2,191-214; Albert & Morris, 1994 Trends in Pharmacological Sciences 15, 250-254).

La tecnología antisentido se basa en la unión de los llamados oligonucleótidos o polinucleótidos antisentido al ARNm celular. Esta unión evita la translación de este RNAm y, por lo tanto, reduce la cantidad producida por la célula de la proteína correspondiente. Se han usado exitosamente oligonucleótidos o polirribonucleótidos sintéticos para este propósito. Se puede esperar que la transfección mediada por liposomas de oligonucleótidos o la transfección mediada por liposomas de estructuras de ADN que dirigen la síntesis de polirribonucleótidos antisentido más largos, disminuyan específicamente y selectivamente la reducción de proteínas por las células transfectadas. Las ribozimas también impiden la producción de proteínas a través de la ruptura selectiva del ARN que codifica la proteína específica en cuestión. También pueden ser transferidas como polirribonucleótidos o como estructuras de ADN que dirigen la síntesis de esos polinucleótidos (por revisiones, ver James 1991, y Albert & Morris 1994, ambos citados anteriormente). Un ejemplo de este uso de una ribozima antisentido para impedir la fertilidad, podría ser del modo siguiente. Ya se ha mostrado que el FIL es esencial para el procedimiento de implantación en el embarazo de mamíferos (Stewart *et al.*, 1992, citado previamente). Por lo tanto, la transfección de oligonucleótidos o estructuras de ADN que dirigen la síntesis de polirribonucleótidos antisentido, o de ribozimas dirigidas contra el ARNm del FIL, podrían impedir la síntesis de este factor. La falta de este factor conduciría al fracaso de la implantación y, de este modo, la concepción sería bloqueada.

Podría usarse un acercamiento similar para bloquear la producción de factores de crecimiento angiogénico, por ejemplo FCEV, que impediría la proliferación de las células endoteliales necesaria para el crecimiento tumoral. Sin embargo, este tipo de tratamiento sería particularmente provechoso donde se trata la enfermedad maligna.

5) *Producción local de inmunoglobulinas y fragmentos de ellas*

Es posible usar la moderna tecnología de recombinación de ADN para generar anticuerpos de cadena única que tengan características de unión casi idénticas al anticuerpo monoclonal completo del cual derivan. Estos anticuerpos de cadena única han sido expresados exitosamente en bacterias (He *et al.*, 1995 *Immunology* 84, 662-668). Es posible, en principio, diseñar una estructura que dirija la expresión de un anticuerpo de cadena única y lo exprese en células epiteliales. Si esto fuera realizado en el endometrio *in vivo*, uno podría suponer que los anticuerpos de cadena única dirigidos contra una hormona esteroide se unirían al esteroide y evitarían su acción sobre las células epiteliales. Un ejemplo de un anticuerpo así, podría ser el anticuerpo de cadena única derivado del anticuerpo monoclonal anti-progesterona DB3 (He *et al.*, 1995, citado anteriormente). Si este anticuerpo fuera secretado dentro de la cavidad uterina, podría también unirse a la progesterona y tener acción en cualquier parte del compartimiento uterino. Los anticuerpos dirigidos contra factores de crecimiento y citoquinas reconocidas como activas en el endometrio, podrían de igual manera bloquear su función si se produjeran localmente de este modo.

Una aplicación adicional de los anticuerpos de cadena única producidos localmente sería evitar o tratar enfermedades de transmisión sexual. En esta situación, los anticuerpos dirigidos contra el agente en cuestión (por ejemplo papiloma virus, VIH, clamidia) serían secretados dentro de la cavidad uterina y evitarían la infección por el agente en cuestión. Podría suponerse que anticuerpos dirigidos contra antígenos del esperma o el óvulo, tendrían un papel en la anticoncepción.

6) *Inmunización activa para lograr inmunidad mucosa*

Otro método que podría usarse para lograr inmunidad local, sería el diseño de estructuras que dirijan la secreción de un antígeno dentro de la cavidad. Esto provocaría una respuesta inmunológica y se lograría una inmunidad mucosa sitio-específica. Se ha sabido durante muchos años (Howe, 1967 *Journal of Reproduction and Fertility* 13, 563-566) que la cavidad uterina contiene muchos leucocitos. Es posible que los antígenos producidos por células endometriales transfectadas sean captados por estos leucocitos y posteriormente presentados para provocar una respuesta inmunológica. La liberación de antígenos en la cavidad intestinal ha logrado esa inmunidad y, en algunas circunstancias, ha demostrado ser muy efectiva (por ejemplo la vacunación contra la poliomielitis).

7) *Bloqueo de sitios de unión de patógenos*

La unión de patógenos a la superficie mucosa es frecuentemente un requisito esencial para el establecimiento de la infección. El bloqueo de la unión de los patógenos a estos sitio puede ser un método de protección de humanos y animales contra enfermedades, especialmente enfermedades de transmisión sexual. Esto se aplica no sólo para patógenos bacterianos (como ciertas cepas patógenas de *E. coli* y *N. gonorrhoea*), sino también para patógenos virales. Muchos virus, cuando infectan una célula, se unen a un "receptor" de la superficie celular. La producción local de receptores solubles podría competir con las moléculas de la superficie celular e impedir la infección viral. Igualmente, la saturación de los receptores de la superficie celular con imitadores virales (que actúen como el "ligando" viral), podría también bloquear la infección, así como la producción local de inmunoglobulinas específicas o segmentos de unión de las mismas efectivos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un ácido nucleico en la preparación de un medicamento para transfectar al menos algunas células del tracto reproductivo de un individuo humano de sexo femenino, a través de la introducción en dichas células del ácido nucleico.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medicamento es administrado al individuo en el período que sigue a la ovulación, hasta e incluyendo el momento, en el mismo ciclo menstrual, en el que se produce un pico en el nivel de progesterona en sangre.
- 15 3. Uso de un ácido nucleico en la preparación de un medicamento para transfectar al menos algunas de las células del tracto reproductivo de un individuo mamífero, a través de la introducción en dichas células del ácido nucleico, en el que el medicamento es administrado al individuo en el período que sigue a la ovulación, hasta e incluyendo el momento, en el mismo ciclo menstrual, en el que se produce un pico en el nivel de progesterona en sangre.
- 20 4. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en el que el ácido nucleico es introducido dentro de células endometriales.
- 25 5. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico es introducido dentro del epitelio glandular del endometrio.
- 30 6. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico introducido es ADN.
- 35 7. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico es introducido en un liposoma, virus, u otra partícula portadora.
- 40 8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico es introducido como un plásmido u otra estructura.
- 45 9. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico introducido comprende un promotor funcionalmente unido a una secuencia que va a ser transcrita en una célula eucariota.
- 50 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el promotor es inducible.
- 55 11. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la secuencia de ácido nucleico introducida comprende una porción funcionalmente unida en orientación antisentido a un promotor, para inhibir la expresión de un polipéptido en las células en las que se introdujo la secuencia.
- 60 12. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la introducción de la secuencia del ácido nucleico provoca una alteración de la fertilidad del individuo.
- 65 13. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de al menos una porción efectiva de una citoquina o factor de crecimiento.
14. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de al menos una porción efectiva de uno de los siguientes: una interleuquina; factor de inhibición de leucemia (FIL); factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV); factor de crecimiento epidérmico (FCE); factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina (FCELH); factores de crecimiento ligados a insulina I y II (FCI-I y FCI-II); amfiredulina; factor estimulante de colonias (FEC); factor de necrosis tumoral (FNT); factor de crecimiento de hepatocitos (FCH); y factor de crecimiento de fibroblastos (FCF).
15. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de al menos una porción efectiva de un antagonista de una citoquina o un antagonista de un factor de crecimiento.
16. Uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de un antagonista del receptor de interleuquina-1 o un receptor soluble de uno de los siguientes: factor de crecimiento transformante (FCT) α ; factor de crecimiento de fibroblastos (FCF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP); interleuquina-6; factor de crecimiento del endotelio vascular (FCEV); o factor de crecimiento de hepatocitos (receptor "Met").
17. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión en y/o sobre la célula de al menos una porción efectiva de un receptor de un factor de crecimiento, una citoquina u hormona esteroide.

ES 2 323 909 T3

18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la secuencia de ácido nucleico introducida dirige la expresión de al menos una porción efectiva de un receptor para alguno de los siguientes: FCE, factor de crecimiento transformante (FCT) α , o FCEV.

5 19. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de al menos una porción efectiva de un polipéptido que tiene un efecto inmunológico local.

10 20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de al menos una porción efectiva de un antígeno de un patógeno.

21. Uso de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de al menos una porción inmunogénica de un polipéptido de uno de los siguientes: VIH, papiloma virus, clamidia o *N. gonorrhoea*.

15 22. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el ácido nucleico introducido dirige la expresión de una inmunoglobulina o una porción efectiva de ella.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



