

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 847**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.01.2011** **E 11700679 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014** **EP 2526425**

54 Título: **Método de diagnóstico para la receptividad endometrial**

30 Prioridad:

**21.01.2010 EP 10382011**

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

**14.08.2014**

73 Titular/es:

**EQUIPO IVI INVESTIGACIÓN SL (100.0%)**  
**C/ Guadassuar 1 Bajo**  
**46015 Valencia, ES**

72 Inventor/es:

**SIMÓN VALLÉS, CARLOS;**  
**PELLICER MARTÍNEZ, ANTONIO y**  
**BERLANGA ATIENZA, ÓSCAR**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 485 847 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico para la receptividad endometrial

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un método no invasivo para la detección de la receptividad endometrial para la implantación de un embrión. El método es especialmente aplicable para determinar el estado de fertilidad de una hembra de mamífero, preferiblemente una mujer.

10 Antecedentes de la invención

Se estima que el 12% de las parejas que intentan concebir sufren de infertilidad, y debido al aumento de la edad de gestación esta cifra va en aumento. La fertilización *in vitro* (IVF – siglas en inglés) se ha utilizado cada vez más para ayudar a las parejas no fértiles a quedar embarazadas. Desde el primer tratamiento de la IVF con éxito en 15 1978, el cual condujo al nacimiento de Louise Brown, muchos de los avances técnicos y médicos han contribuido a mejorar la eficiencia; hoy en día, alrededor del 70% de las mujeres sometidas a tratamiento de IVF tienen resultados exitosos. Aún así, aproximadamente el 50% de las pacientes no quedan embarazada o tienen pérdidas por un embarazo temprano, lo cual exige esfuerzos adicionales entre la comunidad científica para continuar la 20 investigación en este campo.

Generalmente, la IVF es un proceso multi-etapa que implica la recuperación de óvulos maduros de la paciente o de un donante; la incubación de los óvulos en medios de cultivo artificiales; la recogida de esperma del paciente o donante y la subsiguiente preparación; la fecundación del óvulo por el esperma; el seguimiento y la selección de 25 embriones de buena calidad; y la transferencia de éstos a la cavidad uterina. El embrión debe implantarse en el endometrio receptivo para que el embarazo pueda progresar. Está bien establecido que este paso particular es el responsable de un porcentaje importante de los fracasos y, por lo tanto, es clínicamente relevante para estudiar posibles causas y soluciones del problema.

La implantación del embrión transferido implica una diafonía sincronizada entre un endometrio receptivo y un blastocisto funcional [Wang, H., y Dey, SK. 2006. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. Nature Review Genetics. 7:185-199]. Este fenómeno sólo puede tener lugar durante la ventana de implantación, un período auto-limitado de receptividad endometrial que se extiende entre los días 19 y 23 del ciclo menstrual (mujeres). En los ciclos menstruales normales, esto se consigue a través de los efectos locales de los estrógenos y 35 la progesterona en los ovarios, que inducen una serie de eventos celulares y moleculares en el endometrio que conducen a una receptividad del endometrio apropiada. Esta última se evalúa utilizando los criterios de Noyes para datar el endometrio, que fueron propuestos hace más de 50 años [Noyes, RW., Hertig, AJ., y Rock, J. 1950. Dating the endometrial biopsy. Fertil Steril, 1:3-25], pero sigue siendo el método preferido utilizado en la actualidad para medir la receptividad endometrial. Hoy en día, a la luz de 15 años de experiencia con la IVF de óvulos de donante, 40 se acepta que la evaluación histológica añade poca información clínicamente significativa, y debe ser sustituida por el criterio funcional de la receptividad endometrial.

La era de la biología molecular y celular, y el desarrollo de nuevas técnicas analíticas, ha ayudado a la búsqueda de predictores más consistentes de un endometrio receptivo. Tras la inducción con hormonas esteroides, hasta la 45 fecha se ha identificado un gran número de mediadores estructurales y moleculares que producen biomarcadores potenciales de receptividad endometrial, incluida la presencia de pinópodos en la superficie de las células endometriales, moléculas de adhesión tales como integrinas, citoquinas, factores de crecimiento, lípidos y otros [Nikas, G., y Aghajanova. 2002. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? Reprod Biomed Online 4 Supl. 3:18-23; Lessey, BA. 2003. Two pathways of progesterone action in the human 50 endometrium: implications for implantation and contraception. Steroids. 68:809-815; Robb L, Dimitriadis E, Li R, Salamonsen LA., 2002 Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation. J. Reprod Immunol. 57: 129-141]. A modo ilustrativo, la producción de dos prostaglandinas (PGs), a saber, prostaglandina E2 (PGE2) y prostaglandina F2 alfa (PGF2α) aumenta en el endometrio humano en la fase luteal media en la que está situada la ventana de implantación [Hoozemans DA et al. Human embryo implantation: 55 current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. Reprod Biomed Online 2004, 9(6):692-715].

Además de ello, el análisis genético y proteómico han añadido nuevas herramientas interesantes para la evaluación de la receptividad endometrial, y se pueden utilizar muestras de biopsia endometrial para identificar

moléculas asociadas con la receptividad uterina para obtener una mejor comprensión de la implantación en seres humanos. Estos enfoques, sin embargo, aún no han dado resultados aplicables a la práctica clínica diaria de la IVF, ya que ningún factor específico ha sido identificado como crucial para la implantación en seres humanos [Strowitzki, T., Germeyer, A., Popovici, R., et al. 2006. The human endometrium as a fertility-determining factor. Human Reproduction Update. 12:617-630]. Además, un gran retroceso en la aplicación de técnicas biopsia-dependientes se encuentra en su naturaleza invasiva, y también en la necesidad de biopsias endometriales adecuadamente temporizadas que interrumpen el punto final necesario de la implantación [van der Gaast, MH., Beier-Hellwig, K., Fauser, BC., et al. 2003. Endometrial secretion aspiration prior to embryo transfer does not reduce implantation rates. Reprod Biomed Online. 7:105-109].

El análisis de las secreciones endometriales es una nueva posibilidad, no perjudicial, para la investigación de la receptividad endometrial. Es importante destacar que, la aspiración del fluido endometrial no afecta a las tasas de embarazo [van der Gaast et al., 2003, citado supra]. Este enfoque proporciona lecturas fiables de las proteínas individuales que se correlacionan con días de ciclo y ha demostrado ser eficaz en matrices de proteínas utilizando un sistema Luminex [Boomsma, CM., Kavelaars, A., Eijkemans, MJC., et al. 2009. Cytokine profiling in endometrial secretions: a non invasive window on endometrial receptivity. Reprod Biomed Online. 18:85-94], abriendo así el campo para una aplicación no invasiva.

Aunque se han descrito algunos marcadores bioquímicos mediante la evaluación de la receptividad endometrial [Giudice, L.C. 1999. Hum Reprod 14 Supl 2:3-16; Achache, H et al.; Human Reproduction Update, 2006; 12:731-46, Thomas, K et al.; Fertil. Steril. 2003; 80:502-507; documento WO03062832], existe la necesidad en la técnica de biomarcadores moleculares específicos y fiables para la detección de la receptividad endometrial para la implantación del embrión en mujeres, que pueden ser utilizados en la clínica.

La metabolómica es una disciplina dedicada al estudio sistemático de pequeñas moléculas (es decir, metabolitos) en las células, tejidos y fluidos biológicos. Los metabolitos son los productos finales de los procesos de regulación celular, y sus niveles pueden ser considerados como la respuesta amplificada de los sistemas biológicos a los cambios genéticos o medioambientales. Los médicos han confiado durante décadas en una pequeña parte de la información contenida en el metaboloma, por ejemplo midiendo la glucosa para vigilar la diabetes y medir el colesterol para la salud cardiovascular. Se han desarrollado ya nuevas plataformas de análisis metabolómicas sofisticadas y herramientas informáticas para proporcionar una medición extendida y sensible de la metaboloma.

Se sabe que los lípidos juegan un papel importante como componentes estructurales (p. ej., las membranas celulares), componentes de almacenamiento de energía y como moléculas de señalización. Los lípidos se definen en líneas generales como moléculas pequeñas hidrófobas o anfipáticas que pueden proceder, por completo o en parte, de una condensación de tioésteres basada en carbaniones y/o de una condensación de unidades de isopreno basada en la carbocación. La "lipidómica" se puede considerar como un sub-campo de la metabolómica que tiene por objeto aclarar los procesos biológicos en el contexto de los lípidos midiendo y caracterizando los perfiles de lípidos extendidos a nivel molecular (perfiles lipidómicos). Medidas de lípidos clínicas tradicionales cuantifican las cantidades totales de triglicéridos, colesterol o lipoproteínas. Sin embargo, el perfil de lípidos en suero es más complejo en el nivel molecular. Las actuales plataformas lipidómicas permiten una caracterización cuantitativa de centenares de diversas especies moleculares de lípidos a través de múltiples clases de lípidos tales como esfingolípidos, fosfolípidos, ésteres de esteroles, acilgliceroles, esteroides, ácidos biliares, ácidos grasos, eicosanoides, prostaglandinas y esteroides [Seppänen-Laakso, T y Oresic, M. 2009. How to study lipidomes. J Molec Endocr. 42: 185-190].

#### Sumario de la invención

La invención se refiere a un método para detectar la receptividad endometrial para la implantación del embrión en una hembra mamífera, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de prostaglandina E2 (PGE2) en una muestra de fluido endometrial obtenida de dicha hembra de mamífero; y
- b) identificar dicha hembra de mamífero como receptora a la implantación del embrión cuando el nivel de PGE2 en dicha muestra de fluido endometrial aumenta con relación a una muestra de referencia.

En una realización particular, se determina también el nivel de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) en la muestra de fluido endometrial obtenida de dicha hembra de mamífero.

Ventajosamente, dicha hembra de mamífero es una mujer.

De acuerdo con una realización, la muestra de referencia es una muestra de fluido endometrial obtenida de dicha hembra durante el periodo no fértil de dicha hembra.

De acuerdo con otra realización, la muestra de referencia es una muestra de fluido endometrial obtenida de una población de hembras de mamífero durante el periodo no fértil de dichas hembras.

En una realización particular, se mide el nivel tanto de PGE2 como de PGF2 $\alpha$ .

En una realización particular, se determinan los niveles de PGE2 y/o de PGF2 $\alpha$  mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas tándem.

La Figura 1 muestra los niveles de diferentes lípidos de muestras de fluidos endometriales de mujeres, durante su ciclo menstrual natural; los lípidos se identificaron por cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas tándem [A: N-araquidonoil-etanolamina (AEA); B: N-palmitoil-etanolamina (PEA); C: N-oleoil-etanolamina (OEA); D: 2-araquidonoil-glicerol (2-AG); E: N-estearoil-etanolamina (SEA); F: N-linoleoil-etanolamina (LEA); G: prostaglandina E2 (PGE2); H: prostaglandina alfa F2 (PGF2 $\alpha$ ); I: prostaglandina F1 alfa (PGF1 $\alpha$ ).

La Figura 2 muestra los niveles de prostaglandina E2 (PGE2) y prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) en muestras de fluido endometrial de mujeres, obtenidas a lo largo del ciclo menstrual [Grupo I (días 0-8); Grupo II (días 9-14); Grupo III (días 15-18); Grupo IV (días 19-23) y Grupo V (días 24-30)].

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un biomarcador específico y fiable para la detección de la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una mujer. El biomarcador puede utilizarse, por ejemplo, para detectar la receptividad endometrial a la implantación de un embrión en una hembra de mamífero, o para seleccionar la ventana de implantación de un embrión en una hembra de mamífero, o para evaluar el estado de fertilidad de una hembra de mamífero, o para evaluar si una hembra de mamífero está en condiciones adecuadas para la recepción y la implantación de un embrión, o para vigilar la maduración endometrial en una hembra de mamífero, o un método de fertilización *in vitro* en una hembra de mamífero. En una realización particular, dicho hembra de mamífero es una mujer. En una realización particular adicional, dicha mujer es una mujer sometida a un proceso de fertilización *in vitro* (IVF).

Los autores de la invención han encontrado ahora, sorprendentemente, que algunos compuestos lipídicos se pueden utilizar como biomarcadores para la receptividad endometrial para la implantación de un embrión. En particular, los autores de la invención han analizado los niveles de algunos lípidos en muestras de fluidos endometriales entre los días 19 y 21 del ciclo menstrual de una mujer, coincidente con la ventana de implantación.

Por lo tanto, ahora es posible identificar la ventana de implantación en una hembra de mamífero mediante la determinación del perfil de lípidos en muestras de fluidos endometriales a lo largo del ciclo menstrual. El método se basa en la comparación del perfil de lípidos establecido a partir de una hembra de mamífero a marcadores lipídicos de referencia. En una realización particular preferida, dicho mamífero hembra es una mujer.

En una realización particular, los autores de la invención han observado que la concentración de prostaglandina PGE2 está significativamente incrementada en muestras de fluidos endometriales entre los días 19 y 21 del ciclo menstrual de una mujer, coincidente con la ventana de implantación. Por lo tanto, ahora es posible identificar la ventana de implantación en una mujer determinando el nivel de PGE2, posiblemente en combinación con PGF2 $\alpha$  en muestras de fluidos endometriales a lo largo del ciclo menstrual.

PGE2, ácido 7-[3-hidroxi-2-(3-hidroxi-oct-1-enil)-5-oxo-ciclopentil]hept-5-enoico, es una prostaglandina que se produce de forma natural, también conocida en medicina como "dinoprostona"; tiene efectos importantes en el parto (suaviza el cuello uterino y provoca la contracción del útero) y también estimula los osteoblastos para liberar factores que estimulan la resorción ósea por los osteoclastos). Al igual que otras prostaglandinas, dinoprostona se puede utilizar como un abortivo, ya que es un vasodilatador directo, relajando los músculos lisos, e inhibe la liberación de noradrenalina de los terminales nerviosos simpáticos.

PGF2 $\alpha$ , ácido (Z)-7-[(1R,2R,3R,5S)-3,5-dihidroxi-2-[(E,3S)-3-hidroxi-oct-1-enil]ciclopentil]hept-5-enoico, es también una prostaglandina que se produce de forma natural, también conocida en medicina como "dinoprost"; que se

utiliza en la medicina para inducir el parto y como un abortivo.

Por lo tanto, dicha prostaglandina PGE<sub>2</sub>, cuando se determina en muestras de fluido endometrial, se puede utilizar como un biomarcador de la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una hembra de mamífero, preferiblemente una mujer. Además, el uso de dicha prostaglandina PGE<sub>2</sub>, en particular cuando dicha prostaglandina se determina en una muestra de fluido endometrial de una hembra de mamífero, preferiblemente una mujer, como un biomarcador de la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en dicha hembra de mamífero, constituye un aspecto de esta invención. Un "biomarcador", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier lípido, por ejemplo una prostaglandina tal como PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>α cuyo nivel (concentración) en el fluido endometrial está alterado con relación a una condición fisiológica de interés.

En una realización particular, la invención se basa en el descubrimiento de que el nivel de una prostaglandina seleccionada del grupo que consiste en prostaglandina PGE<sub>2</sub>, posiblemente en combinación con PGF<sub>2</sub>α, en una muestra de fluido endometrial procedente de una hembra de mamífero, p. ej. una mujer, se puede utilizar como un biomarcador de la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una hembra de mamífero, p. ej. una mujer.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "fluido endometrial" se refiere a una secreción del epitelio glandular que contiene todos los compuestos secretados al lumen del útero [Aplin JD et al. The Endometrium, 2<sup>a</sup> ed.: INFORMA healthcare; 2008]. En síntesis, el endometrio constituye el tejido de la superficie que reviste la pared uterina (miometrio o capa media de la pared uterina que consiste en células de la musculatura lisa y que soportan el tejido del estroma y vascular) de una hembra de mamífero tal como una mujer o un ser humano o primate no humano o, en otras palabras, la membrana interna del útero del mamífero. El endometrio es extremadamente sensible a las hormonas estrógeno y progesterona y está constituido por varias capas funcionales. La arquitectura del tejido del endometrio comprende una capa de células externa, que constituye el epitelio, que está en contacto directo con el lumen del útero, y una capa de células interna, denominada estroma, que constituye alrededor del 80% del grosor del endometrio. Además, el endometrio contiene vasos sanguíneos y células especializadas que confieren sus características funcionales al endometrio. El epitelio endometrial constituye una capa de células continua que está organizada en dos regiones: epitelio luminal (células epiteliales que revisten la superficie del endometrio) y epitelio glandular (células epiteliales que forman glándulas por debajo de la superficie del endometrio), siendo dichas regiones físicamente diferentes y molecularmente reconocibles [Brown SE et al. Endometrial glycodelin-A expression in the phase of stimulated ovarian cycles. Fertil Steril 2000, 74(1):130-133]. El epitelio luminal representa una barrera física contra los ataques de patógenos y desarrolla estructuras, denominadas pinópodos, en su superficie apical, que son las responsables de la absorción del material del lumen uterino; sin embargo, el epitelio glandular es el responsable de las secreciones que forman el fluido endometrial, que contiene todos los compuestos secretados al lumen del útero [Aplin JD et al. (2008) citado *supra*].

La relevancia de dichas secreciones por parte de células endometriales se demuestra en un modelo de animales de granja, en que la inhibición en la formación de dichas glándulas hace imposible el comienzo del embarazo [Gray CA et al. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. Reproduction 2002, 124(2):289-300]. Así, se ha propuesto que una actividad de la glándula endometrial deficiente puede provocar fallos en el embarazo, a pesar de que no existan evidencias directas en seres humanos [Burton GJ et al. Human early placental development: potential roles of the endometrial glands. Placenta 2007, 28, Supl A:S64-69]. Por lo tanto, de manera interesante, la composición del fluido endometrial depende de la actividad de la glándula endometrial en lugar del endometrio como un todo tal como se ha reseñado previamente [van der Gaast et al. The feasibility of a less invasive method to assess endometrial maturation-comparison of simultaneously obtained uterine secretion and tissue biopsy. BJOG 2009, 116(2):304-312] – van der Gaast et al. muestran algunas proteínas cuyos niveles en el tejido endometrial frente al fluido endometrial son diferentes y no se corresponden entre sí.

Por lo tanto, la presente sección describe métodos para detectar la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una hembra de mamífero; métodos para seleccionar la ventana de implantación de un embrión en una célula de mamífero; métodos para evaluar si una hembra de mamífero se encuentra en condiciones adecuadas para recibir e implantar un embrión; métodos para vigilar la maduración endometrial; y métodos para la fertilización *in vitro* en una hembra de mamífero. En un aspecto particular, dicha hembra de mamífero es una hembra de un ser humano o primate no humano, preferiblemente una mujer. En un aspecto particular adicional, dicha mujer es una mujer sometida a un proceso de fertilización *in vitro* (IVF). En otro aspecto particular, los métodos comprenden detectar el nivel de una prostaglandina seleccionada del grupo que consiste en PGE<sub>2</sub>, posiblemente en combinación con PGF<sub>2</sub>α, en una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de

mamífero, en que el nivel de dicha prostaglandina se correlaciona con la receptividad endometrial para la implantación de un embrión. En otro aspecto, los métodos comprenden detectar el o los niveles de PGE2 y, posiblemente, PGF2α en una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero, en una o más muestras de fluido endometrial obtenidas a partir de una pluralidad de fases del ciclo menstrual de una hembra de mamífero. En un aspecto, los métodos se basan en el descubrimiento de que los niveles de dicha prostaglandina PGE2 siguen un modelo temporal en el fluido endometrial durante el ciclo menstrual, y de que los niveles de dicha prostaglandina en dicho fluido endometrial se incrementan durante la ventana de implantación, es decir, la ventana de tiempo durante el cual el endometrio uterino es receptivo para la concepción.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para detectar la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una hembra de mamífero, al que se alude en lo que sigue en esta memoria como "método de la invención [1]", comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) determinar el nivel de prostaglandina E2 (PGE2) en una muestra de fluido endometrial de dicha hembra de mamífero; y
- b) correlacionar el nivel de dicha prostaglandina en dicha muestra de fluido endometrial con la receptividad endometrial para la implantación de un embrión.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "receptividad endometrial para la implantación de un embrión" se refiere al estado del endometrio durante la ventana de la receptividad endometrial. La expresión "ventana de la receptividad endometrial" se refiere al período de tiempo entre los días 19 y 21 de un ciclo menstrual de un ser humano de 28 días ideal. Para otros mamíferos se conocen ciclos similares, y se encuentra dentro de la experiencia ordinaria en la técnica adaptar los métodos descritos en esta memoria a dichos ciclos.

Además, el término "mamífero", tal como se utiliza en esta memoria, incluye cualquier mamífero, por ejemplo seres humanos y primates no humanos, ganado vacuno, cabras, ovejas, caballos, cerdos, perros, etc. En una realización particular preferida, dicho mamífero es una mujer. El término "mujer" se refiere a una hembra humana. En algunas realizaciones, la hembra de mamífero dentro de los métodos de la presente invención es una mujer y las fases del ciclo menstrual se seleccionan del grupo que consiste en la fase secretora temprana y la fase secretora media.

De acuerdo con la presente invención, el nivel de PGE2, posiblemente en combinación con PGF2α, se determina en una muestra de fluido endometrial procedente de la hembra de mamífero (p. ej. mujer) sometida a estudio. La muestra de fluido endometrial puede tomarse de dicha hembra de mamífero por medios convencionales. A modo ilustrativo, una muestra de fluido endometrial procedente de una mujer puede obtenerse tal como se menciona en el Ejemplo 1, es decir, introduciendo suavemente por vía transcervical en la cavidad uterina un catéter flexible vacío y aplicando gradualmente una succión con una jeringa. Dado que un reto principal estriba en la recogida de muestras de pureza adecuada, para prevenir la contaminación por parte del mucus cervical durante la separación del catéter, la vaina externa del catéter de transferencia de un embrión se hace avanzar hasta una profundidad apropiada desde el orificio cervical externo, tras la aplicación de succión; después, se aspira mucus cervical antes de la aspiración de la secreción endometrial. Además, a pesar de que generalmente el fluido endometrial no contiene células que pudieran afectar a los resultados, en una realización, una vez que se ha extraído la muestra de fluido endometrial, la muestra se somete a centrifugación con el fin de separar cualquier componente celular eventual que pudiera estar presente en la muestra. Para evitar resultados falsos será suficiente un número satisfactorio de muestras de fluido endometrial combinadas con una buena práctica de recogida de muestras.

Con el fin de obtener una detección más fiable de la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una hembra de mamífero, es preferible determinar los niveles de PGE2 y/o PGF2α en las muestras de fluido endometrial a lo largo del ciclo menstrual. Por lo tanto, el método de la invención [1] se puede realizar diariamente, o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 días, de modo que a lo largo de todo el ciclo menstrual se puede determinar el perfil de expresión de dichas prostaglandinas PGE2 y/o PGF2α en muestras de fluido endometrial. Típicamente, en mujeres, las muestras de fluido endometrial se pueden obtener durante la fase proliferativa (días 1-14 del ciclo menstrual o antes del pico LH), en la fase secretora temprana (días 15-19 del ciclo menstrual o días 1-5 después del pico LH), en la fase secretora intermedia (días 20-24 del ciclo menstrual o días 6-10 después del pico LH) y en la fase secretora tardía (días 25-28 del ciclo menstrual o días 11-14 después del pico LH). De acuerdo con la presente invención, los niveles de PGE2 y/o PGF2α en el fluido endometrial durante la receptividad endometrial para la implantación de un embrión son los más elevados durante todo el ciclo menstrual.

La determinación de la receptividad del endometrio a un implante de un embrión es particularmente importante en

un lote de técnicas tales como IVF, transferencia del embrión, etc., así como para determinar el período óptimo para la concepción en parejas que tratan de concebir de un modo natural.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término “nivel” pretende ser amplio y puede significar una cantidad cuantitativa (p. ej. peso o moles), una cantidad semi-cuantitativa, una cantidad relativa (p. ej. % en peso o % en moles dentro de una clase o una relación), una concentración y similares. En una realización particular, los niveles de PGE2 y PGF2 $\alpha$  se expresan en moles/gramo de fluido [en ese caso, a pesar de que las muestras eran líquidas, debido al pequeño volumen de las mismas, las muestras se pesaron y las concentraciones de dichos compuestos se expresaron con referencia a dicho peso – los valores fueron debidamente normalizados].

La determinación de los niveles de PGE2 y/o PGF2 $\alpha$  en la muestra de fluido endometrial se puede determinar utilizando cualquier método adecuado a la vista de los lípidos a detectar y, opcionalmente, cuantificar; métodos ilustrativos y no limitativos incluyen cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida (LC), espectrometría de masas (MS), espectrometría de RMN, etc., y combinaciones de los mismos (p. ej., LC/MS o similar). En una realización particular, dichos lípidos (PGE2 y PGF2 $\alpha$ ) se identificaron mediante LC combinada con MS tándem [LC/MS/MS]. Espectrómetros de masas tándem incluyen cuadrupolo triple, trampa de iones e instrumentos de cuadrupolo/tiempo de vuelo, entre otros. Estos instrumentos utilizan típicamente la tecnología del cuadrupolo para aislar un compuesto basado en su peso molecular antes de la activación de la colisión (fragmentación) y el análisis de masas de los componentes fragmentados. Esto significa que la mezcla ha de ser purificada sólo hasta el punto en el que la muestra aplicada al espectrómetro de masas está exenta de otros compuestos con la misma masa. A menudo, esto se puede conseguir con una extracción líquido-líquido a partir del tejido, seguido de métodos de extracción en fase sólida. La tecnología del cuadrupolo proporciona aproximadamente una resolución de 1 amu; el aislamiento mejorado dentro del espectrómetro de masas se consigue utilizando instrumentos TOF/TOF que permiten una resolución mucho más fina.

Se han descritos métodos alternativos para determinar el nivel de PGE2 y PGF2 $\alpha$  a partir de muestras biológicas, véase, p. ej., Voyksner & Bush, quienes describieron que el análisis por HPLC/MS de termopulverización de los metabolitos de ácido araquidónico, incluidas las prostaglandinas PGE2 y PGF2 $\alpha$ , entre otras, demostró ser sensible y específico [Voyksner, R.D. y Bush, E.D. Determination of prostaglandins, and other metabolites of arachidonic acid by thermospray HPLC/MS using post column derivatization. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, Volumen 14, Ejemplar 5: 213-220 (publicado en línea: 13 de abril de 2005)]; Surrenti et al., quienes describieron un método rápido y práctico para la separación y cuantificación de PGE2 en jugo gástrico humano mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) [Surrenti C. et al., High Performace Liquid Chromatographic Method for Prostaglandin E2 Determination in Human Gastric Juice Without Derivatization. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, Volumen 7, Ejemplar 12, octubre de 1984, páginas 2409-2419]; y Bastani et al., quienes desarrollaron un método analítico basado en LC con ionización por electroyección negativa (ESI) acoplada a la detección espectrométrica de masas tándem (LC/MS/MS) para la determinación de concentraciones de derivados de PGF2 $\alpha$  en diferentes muestras biológicas [Bastani, N.E., et al. Determination of 8-epi PGF2 $\alpha$  concentrations as a biomarker of oxidative stress using triple-stage liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, Volumen 23 Ejemplar 18, páginas 2885 – 2890 (publicado en línea: 10 de agosto de 2009)]. Otro método adecuado para detectar y, opcionalmente, cuantificar lípidos en una muestra biológica, emplea trazadores de isótopos estables para marcar los lípidos.

En una realización particular, niveles de PGE2 y PGF2 $\alpha$  se miden utilizando cromatografía líquida (LC) combinada con espectrometría de masas tándem (MS) [LC/MS/MS].

Los niveles de PGE2 y, opcionalmente, PGF2 $\alpha$  se pueden basar en análisis cuantitativos y/o semi-cuantitativos. Por ejemplo, se pueden utilizar métodos semi-cuantitativos para determinar un nivel de uno o más metabolitos de lípidos particulares (PGE2 y, opcionalmente, PGF2 $\alpha$ ), por encima de un valor umbral o para determinar relaciones de diferentes metabolitos de lípidos, sin asignar un valor numérico absoluto o relativo. Se pueden utilizar métodos cuantitativos para determinar una cantidad relativa o absoluta de uno o más metabolitos de lípidos particulares en la muestra biológica.

En métodos semi-cuantitativos, un valor umbral o de corte se puede determinar por cualesquiera medios conocidos en la técnica, y opcionalmente es un valor predeterminado. En realizaciones particulares, el valor umbral se predetermina en el sentido de que es fijado, por ejemplo, en base a una experiencia previa con el ensayo y/o una población de hembras de mamífero (p. ej. mujeres). Alternativamente, la expresión valor “predeterminado” puede también indicar que el método de alcanzar el umbral se predetermina o fija incluso si el valor particular varía

entre ensayos o puede incluso determinarse para cada operación del ensayo.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar la ventana de implantación de un embrión en una hembra de mamífero, al que se alude aquí en lo que sigue como el “método de la invención [2]”, que comprende determinar el nivel de PGE2 o el nivel tanto de PGE2 como de PGF2α en una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero, en donde dicha ventana de implantación se selecciona cuando el nivel de al menos una de dichas prostaglandinas PGE2 y, posiblemente, de PGF2α en dicha muestra aumenta con relación a una muestra de referencia.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “método de selección” se refiere a un método para determinar la probabilidad de que una hembra de mamífero (p. ej. una mujer) sea receptiva en un período para la implantación de un embrión. La persona experta en la técnica observará que dicha predicción no puede ser correcta para el 100% de las hembras de mamíferos (p. ej. mujeres) sometidas a estudio. Sin embargo, dicha expresión requiere que el método de predicción proporcione resultados correctos para una parte estadísticamente significativa de hembras de mamíferos (p. ej. mujeres) que puede determinarse utilizando técnicas estadísticas convencionales tales como la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test t de Student, o el test de Mann-Whitney, según se explica por Dowdy y Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Intervalos adecuados de confianza son al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, o más preferiblemente, al menos 95%. Preferiblemente, los valores p son 0,2, 0,1, o lo más preferiblemente 0,05.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “ventana de implantación” abarca la ventana de tiempo durante el cual el endometrio uterino es receptivo para la concepción; en seres humanos, esto se produce en la fase secretora del ciclo menstrual. La implantación se define como los días 6-8 post día del pico de la hormona luteinizante (LH). La ventana de implantación puede ser estimada sobre la base de un modelo menstrual regular como aproximadamente 7 días antes del primer día esperado del período menstrual, es decir, corresponde, por lo tanto, a los días 19-21 de un ciclo menstrual ideal de 28 días en seres humanos. Se han descrito ciclos similares en otros mamíferos, de modo que el método de la invención podría adaptarse a cualquier hembra de mamífero.

Los niveles de PGE2 y, posiblemente, de PGF2α se determinan en una muestra de fluido endometrial procedente de la hembra de mamífero sometida a estudio. En una realización particular preferida, dicha hembra de mamífero es una mujer. La muestra de fluido endometrial puede tomarse de dicha hembra de mamífero por medios convencionales según se menciona en relación con el método de la invención [1]. Además, la determinación del nivel de PGE2 y, posiblemente, de PGF2α en la muestra de fluido endometrial se puede determinar utilizando cualquier método adecuado según se discute en relación con el método de la invención [1]. En una realización particular, los niveles de PGE2 y, posiblemente, de PGF2α se miden utilizando cromatografía líquida (LC) combinada con espectrometría de masas tándem (MS) [LC/MS/MS].

De acuerdo con el método de la invención [2], la determinación de los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α necesita correlacionarse con el nivel de dichas prostaglandinas en una muestra de referencia. De manera eficaz, la ventana de implantación se selecciona cuando el nivel de al menos una de dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α en la muestra de fluido endometrial analizada se incrementa en relación con una muestra de referencia. El nivel de una prostaglandina tal como PGE2 o PGF2α en la muestra de fluido endometrial procedente de la hembra de mamífero sometida a estudio se “incrementa en relación con” el nivel de dichas prostaglandinas en una muestra de referencia de acuerdo con la presente invención, cuando el nivel de dichas prostaglandinas en la muestra de fluido endometrial sometida a estudio es de al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más con respecto a la muestra de referencia.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “muestra de referencia” se refiere a una muestra de fluido endometrial obtenida de una hembra de mamífero, p. ej., una mujer, durante el período no fértil de dicho mamífero. Debido a la eventual variabilidad que puede existir entre diferentes hembras de mamíferos (p. ej., mujeres) en cuanto a la producción de dichas prostaglandinas durante el período no fértil, la muestra de referencia puede obtenerse típicamente combinando las mismas cantidades de muestra de una población de hembras de mamífero. En una realización particular, muestras de referencia típicas se obtendrán a partir de mujeres clínicamente bien documentadas. En dichas muestras, se pueden determinar concentraciones normales (es decir, concentraciones de referencia) del biomarcador (PGE2 y, opcionalmente, PGF2α), por ejemplo estableciendo la concentración media basada en la población de referencia. Con el fin de determinar la concentración de referencia del biomarcador, deberían tenerse en cuenta algunas consideraciones, p. ej., edad, etc. A modo ilustrativo, como



grupo de referencia se pueden tomar las mismas cantidades de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100, preferiblemente más de 1000 hembras de mamífero, p. ej., mujeres, preferiblemente clasificadas teniendo en cuenta las consideraciones arriba mencionadas (p. ej., edad, etc.).

5 En una realización particular, la muestra de referencia se obtiene a partir del fluido endometrial de una mujer o a partir de una población de mujeres, durante el período no fértil de dicha mujer/mujeres. A pesar de que la muestra de referencia se puede obtener en cualquier día durante el período no fértil de dicha mujer/mujeres, en una realización particular dicha muestra de referencia se obtiene antes del 15º día del ciclo menstrual, típicamente entre los días 5-11 del ciclo menstrual. El valor predeterminado se puede calcular utilizando las muestras de fluido endometrial de la fase del ciclo menstrual según se define arriba.

Alternativamente, con el fin de obtener una determinación más fiable de la ventana de implantación, es preferible determinar los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α a lo largo del ciclo menstrual. Así, el método de la invención [2] se puede realizar diariamente o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ó 28 días, de modo que se puede determinar el perfil de expresión de dichas prostaglandinas PGE2 y/o PGF2α a lo largo de todo el ciclo menstrual. Típicamente, en mujeres, muestras de fluido endometrial se pueden obtener durante la fase proliferativa (días 1-14 del ciclo menstrual o antes del pico LH), en la fase secretora temprana (días 15-19 del ciclo menstrual o días 1-5 después del pico LH), en la fase secretora intermedia (días 20-24 del ciclo menstrual o días 6-10 después del pico LH) y en la fase secretora tardía (días 25-28 del ciclo menstrual o días 11-14 después del pico LH). De este modo, la ventana de implantación óptima corresponderá al período de tiempo en el que los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α son los más elevados durante todo el ciclo menstrual.

En una realización particular, la muestra de referencia se obtiene a partir de la misma hembra de mamífero (p. ej., mujer) sometida a estudio durante sus días no fértiles con el fin de cuantificar los niveles de dichas prostaglandinas (PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α); esta información se puede utilizar como un valor de referencia.

En otra realización particular, la muestra de referencia se obtiene a partir de una población de hembras de mamífero generalizada (p. ej., una población de mujeres) durante sus días no fértiles y el o los niveles de dichas prostaglandinas (PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α) se cuantifican y combinan para establecer el valor de referencia.

De acuerdo con la presente invención, lípidos bioactivos en secreciones endometriales se analizan para determinar sus niveles relativos y establecer una correlación con el resultado de la implantación y del embarazo.

Por lo tanto, en otro aspecto, la descripción se refiere a un método para evaluar el estado de fertilidad de una hembra de mamífero, en el que dicho método comprende:

- 40 - determinar el nivel de PGE2 o el nivel tanto de PGE2 como de PGF2α en una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero,
- correlacionar el nivel de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2α con el estado de fertilidad.

45 Los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α en una muestra de fluido endometrial procedente de la hembra de mamífero sometida a estudio, obtenidos como se menciona arriba, se pueden determinar utilizando cualquier método adecuado tal como se discute en relación con el método de la invención [1].

Este método pretende evaluar niveles de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2α en muestras de fluido endometrial durante la ventana de implantación en el endometrio de dicha hembra de mamífero. Los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α en el fluido endometrial se correlacionan con la receptividad endometrial y la probabilidad de la concepción. Por lo tanto, de acuerdo con este método, conociendo los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α en una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero, es posible conocer los días más fértiles de su ciclo menstrual, en donde se satisfacen las condiciones óptimas para quedar embarazada.

En un aspecto particular preferido de este método, dicha hembra de mamífero es una mujer.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para evaluar si una hembra de mamífero se encuentra en

condiciones adecuadas para recibir e implantar un embrión, en el que dicho método comprende:

- determinar el nivel de PGE2 o el nivel tanto de PGE2 como de PGF2α en una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero, y
- correlacionar el nivel de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2α con las condiciones para recibir e implantar un embrión.

Los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α en una muestra del fluido endometrial procedente de la hembra de mamífero sometida a estudio, obtenido según se menciona arriba, se pueden determinar utilizando cualquier método adecuado tal como se discute en relación con el método de la invención [1]. Este método también tiene como objetivo evaluar niveles de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2α durante la ventana de implantación en el endometrio de dicha hembra de mamífero. Los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α se correlacionan con las condiciones de las hembras de mamífero receptoras para recibir e implantar un embrión y la probabilidad de la concepción. De nuevo, de acuerdo con este método, conociendo los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α en una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero, es posible conocer los días más adecuados para que una hembra de mamífero reciba y le sea implantado un embrión.

En un aspecto particular, dicha hembra de mamífero es una mujer, preferiblemente una mujer sometida a un proceso de fertilización *in vitro* (IVF). En ese caso, los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α se correlacionan con las condiciones de la mujer receptora para recibir e implantarla un embrión y la probabilidad de la concepción. La muestra de fluido endometrial de dicha mujer puede obtenerse en cualquier instante antes de implantar el embrión, p. ej., desde algunos minutos (p. ej., 15 minutos) hasta algunas horas (p. ej., 4-6 horas) o incluso algunos días (p. ej., 1, 7, 14 o incluso más) antes de la transferencia del embrión. En una realización particular, este método está planeado para ser realizado en el fluido endometrial obtenido de un modo no disruptivo 5-6 horas antes de la transferencia del embrión.

Tal como se discute anteriormente, la capacidad de identificar mediadores de lípidos específicos en secreciones endometriales que actúan como biomarcadores de la receptividad endometrial es de gran importancia para el proceso IVF. Al eliminar la necesidad de obtener biopsias endometriales, se evita una etapa llena de estrés para la mujer. Además de ello, la datación endometrial correcta se obtiene de manera errónea, a pesar del desarrollo de técnicas no invasivas tales como ecografía por ultrasonidos o resonancia magnética, que únicamente proporcionan información morfológica del útero la cual ha demostrado no ser fiable. La presente invención proporciona un método para determinar las características bioquímicas del útero y un endometrio receptivo apropiado unas pocas horas antes de la transferencia del embrión, aumentando así las probabilidades de una implantación con éxito del embrión. Por lo tanto, al optimizar el factor endometrial, las tasas de implantación se podrían mejorar en al menos 5%, típicamente en al menos 10%.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un método para vigilar la maduración endometrial en una hembra de mamífero, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) determinar el o los niveles de PGE2 y, posiblemente, de PGF2α en muestras de fluido endometrial procedentes de dicha hembra de mamífero obtenidas de una pluralidad de fases del ciclo menstrual de dicha hembra de mamífero; y
- b) correlacionar el o los niveles de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2α con la maduración endometrial.

Alternativamente, de acuerdo con este aspecto, el método para vigilar la maduración endometrial en una hembra de mamífero comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero;
- b) determinar el o los niveles de PGE2 y, posiblemente, de PGF2α en dicha muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero;
- c) repetir las etapas a) y b) con muestras de fluido endometrial obtenidas de una pluralidad de fases del ciclo menstrual de dicha hembra de mamífero; y
- d) correlacionar el o los niveles de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2α con la maduración endometrial.

Los niveles de PGE2 y, opcionalmente, de PGF2α en dichas muestras de fluido endometrial de la hembra de

mamífero sometida a estudio, obtenidas como se menciona anteriormente, se pueden determinar utilizando cualquier método adecuado tal como se comenta en relación con el método de la invención [1].

De acuerdo con este método, muestras de fluido endometrial se obtienen de una pluralidad de fases del ciclo menstrual de la hembra de mamífero sometida a estudio, por ejemplo en el caso de un ciclo menstrual idealizado de una mujer, durante la fase proliferativa (días 1-14 del ciclo menstrual), en la fase secretora temprana (días 15-19 del ciclo menstrual), en la fase secretora intermedia (días 20-24 del ciclo menstrual) y en la fase secretora tardía (días 25-28 del ciclo menstrual) con el fin de ser capaz de correlacionar los niveles de dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2 $\alpha$  con la maduración endometrial, conociendo así el estado del endometrio a lo largo del ciclo menstrual.

En un aspecto particular, dicha hembra de mamífero es una mujer, p. ej., una mujer sometida a un proceso IVF.

También se describe un método de fertilización *in vitro* en una hembra de mamífero, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) determinar el o los niveles de PGE2 y, posiblemente, de PGF2 $\alpha$  en muestras de fluido endometrial procedentes de dicha hembra de mamífero obtenidas de una pluralidad de fases del ciclo menstrual de dicha hembra de mamífero;
- b) correlacionar el o los niveles de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2 $\alpha$  en una o más muestras de fluido endometrial de la etapa b) con la maduración endometrial; y
- c) introducir un embrión en el útero de dicha hembra de mamífero cuando dicho endometrio está maduro.

Alternativamente, de acuerdo con este aspecto, el método de fertilización *in vitro* en una hembra de mamífero comprende las etapas de:

- a) obtener una muestra de fluido endometrial de dicha hembra de mamífero;
- b) determinar el o los niveles de PGE2 y, posiblemente, de PGF2 $\alpha$  en dicha muestra de fluido endometrial procedente de dicha hembra de mamífero;
- c) repetir las etapas a) y b) con muestras de fluido endometrial obtenidas de una pluralidad de fases del ciclo menstrual de dicha hembra de mamífero;
- d) correlacionar el o los niveles de dicha o dichas prostaglandinas PGE2 y, opcionalmente, PGF2 $\alpha$  en una o más muestras de fluido endometrial de la etapa c) con la maduración endometrial; y
- e) introducir un embrión en el útero de dicha hembra de mamífero cuando dicho endometrio está maduro.

Los niveles de PGE2 y, opcionalmente, PGF2 $\alpha$  en dichas muestras de fluido endometrial de la hembra de mamífero sometida a estudio, obtenidas como se menciona anteriormente, se pueden determinar utilizando cualquier método adecuado tal como se comenta en relación con el método de la invención [1].

De acuerdo con este método, se obtienen muestras de fluido endometrial de una pluralidad de fases del ciclo menstrual de la hembra de mamífero sometida a estudio, tal como se discute anteriormente, y una vez que el endometrio está maduro, un embrión se introduce en el útero de dicha hembra de mamífero.

En particular, dicha hembra de mamífero es una mujer, p. ej., una mujer sometida a un proceso IVF.

Por lo tanto, según se ha mencionado previamente, la invención proporciona un cierto número de métodos de diagnóstico no invasivos, basados en la identificación del perfil de lípidos en el fluido endometrial durante la ventana de implantación. En una realización particular, dicho perfil de lípidos comprende PGE2, posiblemente en combinación con PGF2 $\alpha$ .

Se espera que los métodos proporcionados por la presente invención aumenten las actuales tasas de implantación en al menos un 5%, preferiblemente en al menos un 10%. Una mejora de las tasas de implantación es de beneficio tanto para la comunidad médica como para las pacientes al proporcionarles una mejor asistencia médica con posibilidades incrementadas de resultados de éxito. Al aumentar las tasas de embarazo, un porcentaje significativo de pacientes que tienen ahora que pasar a través de una segunda ronda de tratamiento evitarán dicha necesidad, evitando así la ansiedad y el problema económico que esto puede representar.

Además, los métodos proporcionados por la presente invención proporcionarán a la comunidad médica una

herramienta poderosa en el diagnóstico de la receptividad endometrial antes de la transferencia de un embrión en tratamientos de IVF. Dichos métodos eliminarán la necesidad de estrategias invasivas, y mejorarán las tasas de implantación actuales, ofreciendo lecturas bioquímicas en tiempo real de la receptividad endometrial sólo unas pocas horas antes del proceso de transferencia del embrión. Por consiguiente, los pacientes evitan procesos de recolección de biopsias traumáticos.

El siguiente ejemplo ilustra la invención, pero no pretende limitar el alcance de la invención.

## EJEMPLO 1

### La concentración de PGE2 y PGF2 $\alpha$ se incrementa significativamente durante la ventana de implantación

#### 1.1 Materiales

Metanol de calidad HPLC y acetonitrilo, utilizados para los estudios de espectrometría de masas, se adquirieron de VWR international (Plainview, NY). Agua de calidad HPLC, espectrometría de masas/ácido acético de calidad HPLC, ácido fórmico y acetato de amonio se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

#### 1.2 Metodología

**Diseño.** Los autores de la invención realizaron un estudio ciego sencillo en 39 mujeres donantes sanas después de obtener el consentimiento informado, firmado. Todas las muestras se recogieron de las mujeres durante su ciclo menstrual natural; a aspirados endometriales se les asignó un número de identificación y se conservaron utilizando métodos estándar antes del análisis.

**Proceso de aspiración de secreciones del endometrio.** Con el paciente tumbado en posición ginecológica, el cuello uterino fue limpiado después de la inserción del espéculo. Un catéter flexible vacío (Wallace, Smith Medical International) se introdujo suavemente 6 cm por vía transcervical en la cavidad uterina y se aplicó gradualmente succión con una jeringa de 10 ml. Para evitar la contaminación por el moco cervical durante la retirada de la sonda, la vaina externa del catéter de transferencia de embriones se hizo avanzar a una profundidad de 4 cm del orificio cervical externo, tras la aplicación de succión. El moco cervical fue aspirado antes de la aspiración de las secreciones endometriales para la comparación dentro del paciente, con el fin de verificar si los aspirados representaban el moco cervical en lugar de las secreciones endometriales.

**Análisis de las muestras.** Lípidos procedentes de extractos de fluido endometrial se identificaron por cromatografía líquida (LC) combinada con espectrometría de masas (MS) tándem. Agua de calidad HPLC se añadió a las muestras para hacer una disolución orgánica al 30%. Los lípidos fueron parcialmente purificados en columnas de extracción en fase sólida C18 tal como se describe previamente [Bradshaw, HB., Rimmerman, N., Krey, JF y Walker, JM. 2006. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 291: R349-358]. En síntesis, cada una de las columnas de 500 mg se acondicionó con 5 ml de metanol y 2,5 ml de agua seguido por la carga de la disolución de agua/sobrenadante. Las columnas se lavaron a continuación con 2 ml de agua y 1,5 ml de metanol al 55%. Los compuestos se eluyeron con 1,5 ml de metanol. Los eluyentes se sometieron a un vórtice a la velocidad máxima antes del análisis de espectrometría de masas. Espectrómetros de masa tándem incluyen el cuadrupolo triple, trampa de iones y cuadrupolo/instrumentos de tiempo de vuelo, entre otros. Estos instrumentos utilizan típicamente tecnología de cuadrupolo para aislar un compuesto sobre la base de su peso molecular antes de la activación de colisión (fragmentación) y del análisis de masas de los componentes fragmentados. Esto significa que la mezcla debe ser purificada sólo hasta el punto en el que la muestra aplicada al espectrómetro de masas esté libre de otros compuestos con la misma masa. A menudo, esto se puede lograr con una extracción líquido-líquido del tejido, seguido de métodos de extracción de fase sólida. La tecnología cuadrupolo proporciona una resolución de aproximadamente 1 amu; el aislamiento mejorado dentro del espectrómetro de masas se consigue utilizando instrumentos TOF/TOF, que permiten una resolución mucho más fina. Específicamente, se obtuvo una rápida separación de analitos utilizando inyecciones de 10  $\mu$ l (automuestreador de la serie Agilent 1100, Wilmington, DE) en una eclipse Zorbax XDB 2,1 x 50 mm columna de fase inversa. La elución en gradiente (200  $\mu$ l/min) se formó a presión en un par de bombas Shimadzu (Columbia, Maryland) 10ADvp. El análisis de espectrometría de masas se realizó con un espectrómetro de masas triple cuadrupolo API 3000 de Applied Biosystems/MDS Sciex (Foster City, CA) equipado con una fuente de ionización por electrospray. Los niveles de cada uno de los compuestos fueron analizados por monitorización de reacciones múltiples (MRM – siglas en

inglés) en el sistema LC/MS/MS.

**Cuantificación de espectrometría de masas.** La cuantificación de analitos se logró utilizando el software Analyst (Applied Biosystems-MDS Sciex; Framingham MA), que cuantifica la cantidad de analito en la muestra en base a un ajuste de potencia de una regresión lineal de concentraciones conocidas de patrones sintéticos. Las diferencias estadísticas se determinaron utilizando ANOVA con LSD post-hoc de Fisher utilizando un intervalo de confianza del 95% para la media (software SPSS, Chicago, IL).

### 1.3 Resultados

Un total de 39 muestras de fluidos endometriales obtenidas a lo largo del ciclo menstrual [Grupo I (días 0-8) (n = 8); Grupo II (días 9-14) (n = 8); grupo III (días 15-18) (n = 8); Grupo IV (días 19-23) (n = 8) y Grupo V (días 24-30) (n = 7)] se analizaron en cuanto a cambios en la concentración de lípidos en dos experimentos independientes simple ciego. En el primer experimento (n = 13), los autores de la invención encontraron un aumento significativo en la concentración de dos lípidos específicos (PGE2 y PGF2 $\alpha$ ) entre los días 19 y 21 del ciclo menstrual, coincidente con la ventana de implantación. Ninguno de los lípidos restantes identificadas en las muestras [N-araquidonoil-etanolamina, N-palmitoil-etanolamina, N-oleoil-etanolamina, 2-araquidonoil-glicerol, N-estearoil-etanolamina, N-linoleoil-etanolamina, PGF1 $\alpha$ ] sufrió cambios significativos durante el ciclo menstrual (Figura 1). Un segundo experimento (n = 26) confirmó el pico de los mismos lípidos reseñados en el primer experimento. Los resultados combinados de los dos experimentos (n = 39) demuestran un aumento del pico de 2 veces y de 20 veces en la concentración de cada uno de los lípidos, respectivamente, durante la ventana de implantación clínica (Figura 2). Estos resultados sugieren que PGE2 y/o PGF2 $\alpha$  podrían ser biomarcadores importantes de la receptividad endometrial humana durante la ventana de implantación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar la receptividad endometrial para la implantación de un embrión en una hembra mamífera, que comprende las etapas de:
  - a) determinar el nivel de prostaglandina E2 (PGE2) en una muestra de fluido endometrial obtenida de dicha hembra de mamífero; y
  - b) identificar dicha hembra de mamífero como receptora a la implantación del embrión cuando el nivel de PGE2 en dicha muestra de fluido endometrial aumenta con relación a una muestra de referencia.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que también se determina el nivel de prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) en la muestra de fluido endometrial obtenida de dicha hembra de mamífero.
3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha hembra de mamífero es una mujer.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de referencia es muestra de fluido endometrial obtenida de dicha hembra durante el periodo no fértil de dicha hembra.
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de referencia es muestra de fluido endometrial obtenida de una población de hembras de mamífero durante el periodo no fértil de dichas hembras.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se mide el nivel tanto de PGE2 como de PGF2 $\alpha$ .
7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los niveles de PGE2 y/o PGF2 $\alpha$  se determinan mediante cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas tándem.

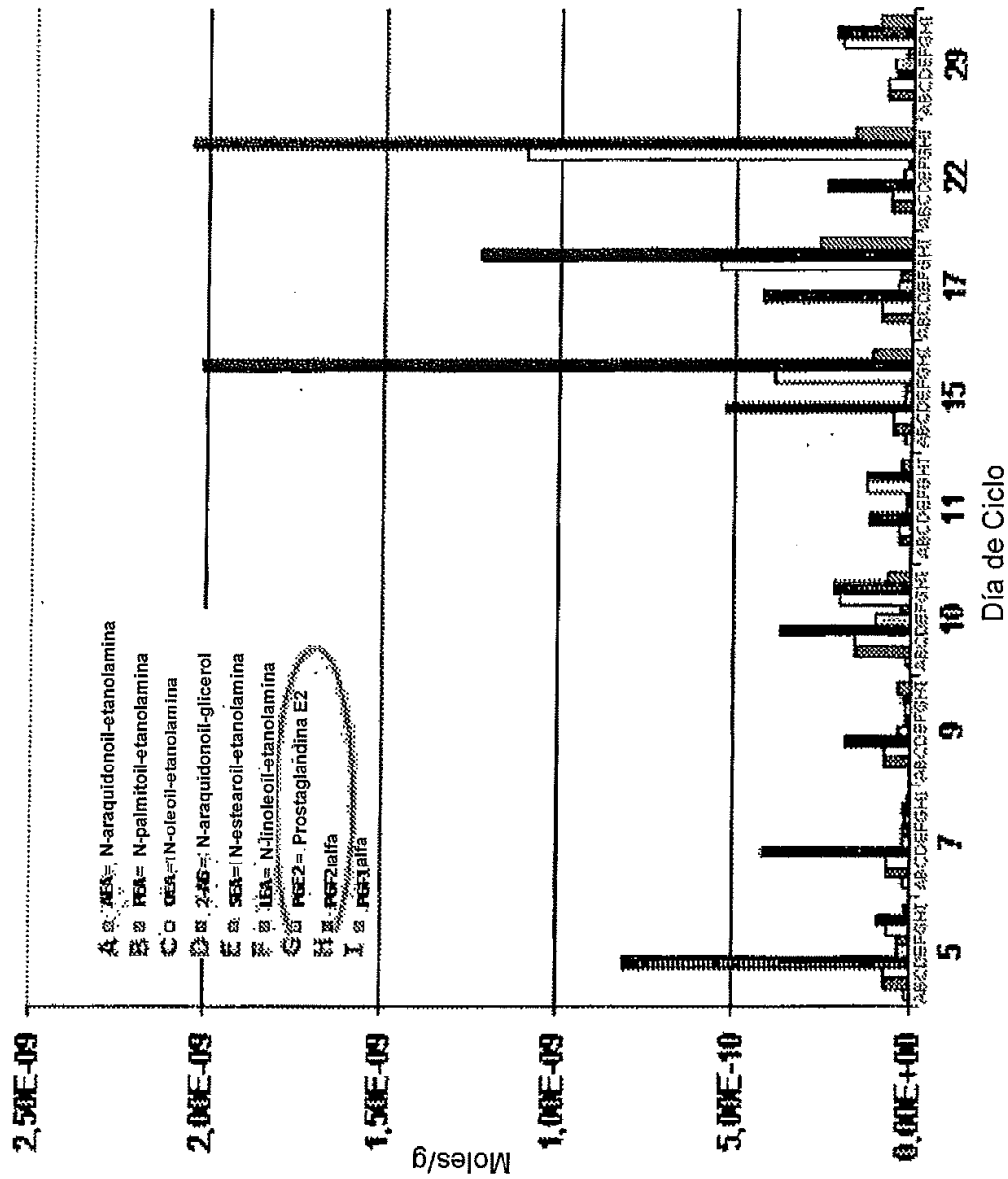


Figura 1

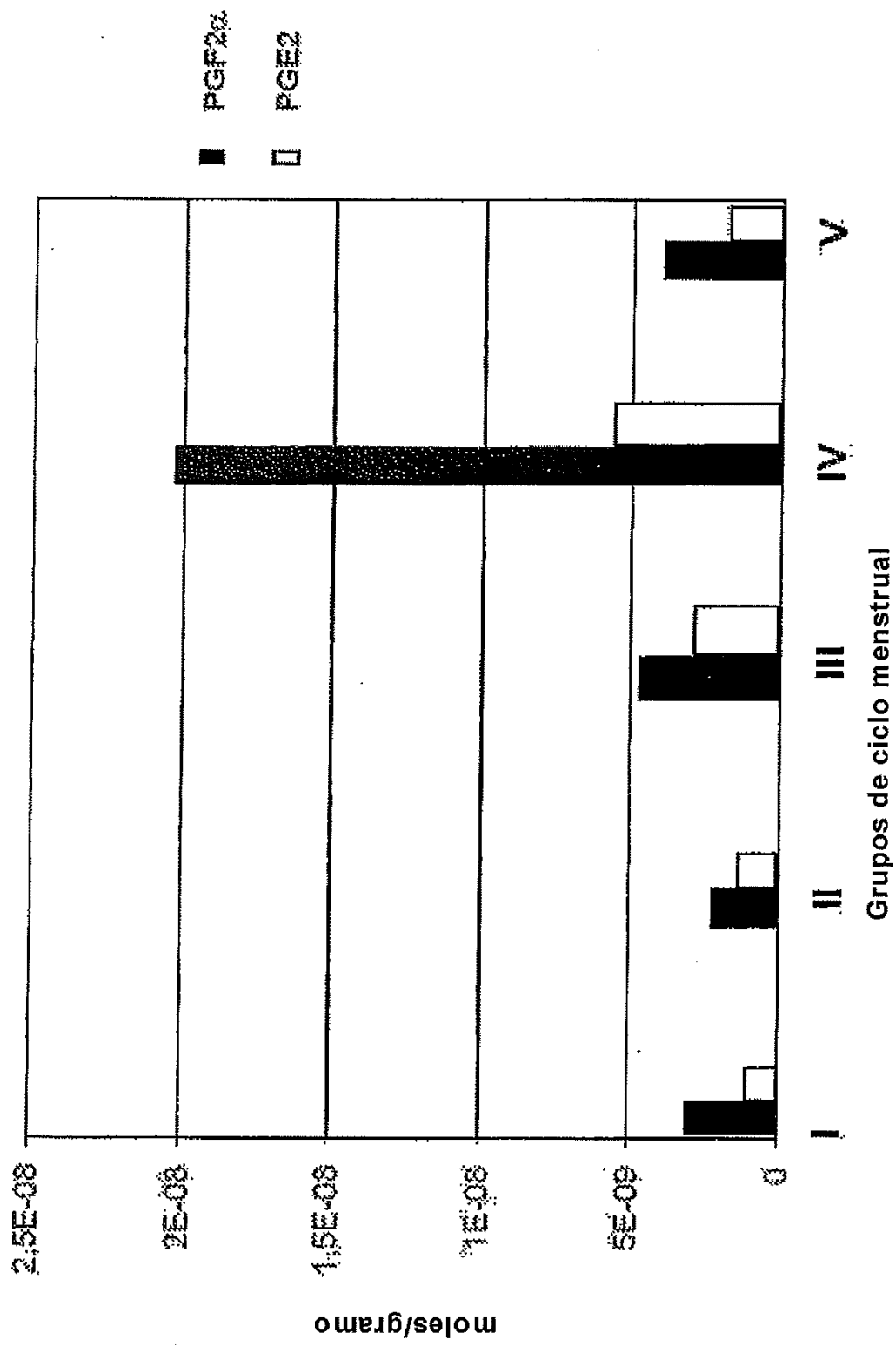


Figura 2