

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 584**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2011 E 11776143 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2630500**

54 Título: **Métodos para seleccionar ovocitos competentes y embriones competentes con alto potencial para un resultado de embarazo**

30 Prioridad:

**18.10.2010 EP 10306132**

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

**20.11.2015**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris , FR;  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (33.3%) y  
UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HAMAMAH, SAMIR;  
ASSOU, SAID y  
DE VOS, JOHN**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

**ES 2 551 584 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

Métodos para seleccionar ovocitos competentes y embriones competentes con alto potencial para un resultado de embarazo

5

**Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para seleccionar un ovocito competente o un embrión competente.

10

**Estado de la técnica**

En la tecnología de reproducción asistida (ART), las tasas de embarazo y nacimiento después de intentos de fertilización in vitro (IVF) siguen siendo bajas. De hecho, 2 de cada 3 ciclos IVF no logran producir embarazo (SART 2004) y más de 8 de cada 10 embriones transferidos no logran implantarse (Kovalevsky y Patrizio, 2005). Además, más del 50% de los niños nacidos por IVF son de gestaciones múltiples (Reddy *et al.*, 2007). Los partos prematuros que resultan de embarazos múltiples causados por ART se estima que representan aproximadamente 890 millones de dólares en costes por cuidados sanitarios en Estados Unidos anualmente (Bromer y Seli, 2008).

15

Los parámetros morfológicos subjetivos siguen siendo un criterio principal para seleccionar embriones sanos usados para programas IVF e ICSI. Sin embargo, dichos criterios no predicen realmente la competencia de un embrión. Muchos estudios han demostrado que una combinación de varios criterios morfológicos diferentes conduce a una selección más precisa de embriones (Balaban y Urman, 2006; La Sala *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2000). Los criterios morfológicos para la selección de embriones se evalúan en el día de la transferencia, y se basan principalmente en escisión embrionaria prematura (25-27 horas post-inseminación), la cantidad y tamaño de blastómeros en el día dos o día tres, el porcentaje de fragmentación y la presencia de multinucleación en la fase de 4 u 8 células (Fenwick *et al.*, 2002).

20

25

Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la selección de ovocitos para inseminación no mejora el resultado de ART en comparación con la transferencia de todos los embriones disponibles, independientemente de su calidad (La Sala *et al.*, 2008). Existe la necesidad de identificar embriones viables con el mayor potencial de implante para aumentar las tasas de éxito de IVF, reducir la cantidad de embriones para remplazo nuevo y tasas inferiores de embarazo múltiple.

30

Por todas estas razones, actualmente se están investigando varios biomarcadores para selección de embriones (Haouzi *et al.*, 2008; Pearson, 2006). Como los embriones que producen embarazo difieren en sus perfiles metabólicos en comparación con embriones que no, algunos estudios están intentando identificar una firma molecular que pueda detectarse por evaluación no invasiva del medio de cultivo del embrión (Brison *et al.*, 2004; Gardner *et al.*, 2001; Sakkas y Gardner, 2005; Seli *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007).

35

La genómica también está proporcionando un conocimiento vital de la función genética y celular durante el desarrollo embrionario. (McKenzie *et al.*, 2004) y (Feuerstein *et al.*, 2007) han informado de que la expresión de varios genes en células del cumulus, tales como ciclooxigenasa 2 (COX2), fue indicativa de la calidad de los ovocitos y los embriones. Gremlin 1 (GREM1), la ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2), la proteína reguladora aguda esteroideogénica (STAR), la esteroil-coenzima A desaturasa 1 y 5 (SCD1 y 5), anfirregulina (AREG) y pentraxina 3 (PTX3) también han demostrado correlacionarse positivamente con la calidad de los embriones (Zhang *et al.*, 2005). Más recientemente, la expresión de la glutatión peroxidasa 3 (GPX3), el receptor 4 de quimioquinas (CXCR4), ciclina D2 (CCND2) y catenina delta 1 (CTNND1) en células del cumulus humanas han demostrado correlacionarse inversamente con la calidad de los embriones, en base a las tasas de escisión prematura durante el desarrollo embrionario (van Montfoort *et al.*, 2008). Pero, a pesar del hecho de que la escisión prematura ha demostrado ser un biomarcador fiable para predecir el embarazo (Lundin *et al.*, 2001; Van Montfoort *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007), estos perfiles de expresión génica de células del cumulus no se han estudiado con respecto al resultado de embarazo.

40

45

50

(Assou *et al.*, 2008) y (Fourar *et al.*, 2008) han informado de que los perfiles de expresión génica de BCL2 tipo 11 (BCL2L11), CASP8 y el regulador de apoptosis tipo FADD (CFLAR), la metalopeptidasa 14 de matriz (MMP14), el factor nuclear I/B (NFIB) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (PCK1) estaban asociados con un embarazo exitoso.

55

Estos perfiles de expresión génica están asociados con un resultado de embarazo en general, pero no se han estudiado las cualidades específicas de ovocitos y embriones como la capacidad de un embrión para implantarse o desarrollarse sin detenerse.

60

**Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un método para seleccionar un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende la etapa de medir el nivel de

65

expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito;  
donde dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6 y

- donde el ovocito se selecciona si dicha célula del cumulus no sobreexpresa ninguno de dichos 10 genes.

La presente invención también se refiere a un método para seleccionar un embrión con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende la etapa de medir el nivel de expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea el embrión, donde dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6 y

donde el embrión se selecciona si dicha célula del cumulus no sobreexpresa ninguno de dichos 10 genes.

### Descripción detallada de la invención

Los inventores han determinado un conjunto de 10 genes expresados en células del cumulus que son biomarcadores para el potencial de los embriones y el resultado de embarazo. Demostraron que el perfil de expresión génica de las células del cumulus que rodean los ovocitos se correlacionaba con diferentes resultados de embarazo, permitiendo la identificación de una firma específica de expresión de embriones que se desarrollan hacia el embarazo. Sus resultados indican que el análisis de células del cumulus que rodean el ovocito es un enfoque no invasivo para la selección de embriones.

### Conjunto de genes predictivos

Todos los genes que pertenecen a la invención son conocidos per se, y se enumeran en la siguiente Tabla A. La Tabla A presenta el conjunto de genes cuyo perfil de expresión combinada ha demostrado ser informativa para seleccionar un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conduce a embarazo o para seleccionar un embrión competente con un alto potencial de implante que conduce a embarazo.

Tabla A: conjunto de genes predictivos.

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
ATF3	factor 3 de transcripción activadora	467
SIAT6	beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 3 ST3	6487
PRKACA	proteína quinasa, dependiente de AMPc, catalítica, alfa	5566
PLA2G5	fosfolipasa A2, grupo V	5322
GPC6	glipicano 6	10082
G0S2	conmutador 2 G0/G1	50486
RBMS1	motivo de unión a ARN, proteína de interacción 1 monocatenaria	5937
NFIC	factor nuclear I/C (factor de transcripción de unión a CCAAT)	4782
SLC40A1	familia 40 de transporte de solutos (transportador regulado por hierro), miembro 1	30061
WNT6	Familia del sitio de integración de MMTV tipo wingless, miembro 6	7475

Un objeto de la invención se refiere a un método para seleccionar un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende la etapa de medir el nivel de expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito;

donde dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6 y

- donde el ovocito se selecciona si dicha célula del cumulus no sobreexpresa ninguno de dichos 10 genes.

Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, donde la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra y el control es indicativa de si el ovocito produce, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conduce a embarazo o el embrión está con una alta tasa de implante que conduce a embarazo.

El control puede consistir en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un ovocito competente o en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un ovocito no fertilizado o un ovocito no competente.

Preferiblemente, el control consiste en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un ovocito competente.

Como se usa en este documento, la expresión "ovocito competente" se refiere a un gameto femenino u óvulo que cuando se fertiliza produce un embrión viable con una alta tasa de implante que conduce a embarazo.

5 De acuerdo con la invención, el ovocito puede resultar de un ciclo natural, un ciclo natural modificado o un ciclo estimulado por cIVF o ICSI. La expresión "ciclo natural" se refiere al ciclo natural por el cual la hembra o mujer produce un ovocito. La expresión "ciclo natural modificado" se refiere al proceso por el cual la hembra o mujer produce un ovocito o dos bajo una estimulación leve de los ovarios con antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante. La expresión "ciclo estimulado" se refiere al proceso por el cual una hembra o una mujer produce uno o más ovocitos bajo estimulación con agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante.

15 La expresión "célula del cumulus" se refiere a una célula comprendida en una masa de células que rodea un ovocito. Se cree que estas células están implicadas en proporcionar a un ovocito algo de su nutrición, energía y/u otras necesidades que son necesarias para producir un embrión viable tras fertilización.

La expresión "una célula del cumulus que sobreexpresa un gen" significa que el nivel de expresión de dicho gen en la célula del cumulus es mayor que el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control.

20 Típicamente, el nivel de expresión de genes puede medirse por diversas técnicas tales como microserie de ADN, RT-PCR cuantitativa, RT-PCR semi-cuantitativa o por enfoques proteómicos (método ELISA, transferencias de Western...).

25 Típicamente, un gen sobreexpresado tiene un nivel de expresión de al menos 1,5, al menos 2, al menos 2,5, al menos 5, al menos 7,5 o al menos 10 veces mayor que el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control.

30 Preferiblemente, el nivel de expresión se mide por RT-PCR cuantitativa y un gen sobreexpresado tiene un nivel de expresión de al menos 1,5, al menos 2, o al menos 2,5 veces mayor que el nivel de expresión de dicho gen en una muestra de control.

La muestra de control puede ser una célula del cumulus asociada con un ovocito o embrión competente.

35 Los métodos de la invención son preferiblemente aplicables a mujeres pero pueden ser aplicables a otros mamíferos (por ejemplo, primates, perros, gatos, cerdos, vacas...).

Los métodos de la invención son particularmente adecuados para evaluar la eficacia de un tratamiento de fertilización in vitro. Por consiguiente, la invención también se refiere a un método para evaluar la eficacia de un protocolo de hiperestimulación controlada de ovarios (COS) en un sujeto hembra que comprende:

- 40
- i) proporcionar a partir de dicho sujeto hembra al menos un ovocito con sus células del cumulus;
  - ii) determinar mediante un método de la invención si dicho ovocito es un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conducirá a embarazo.

45 Entonces, después de dicho método, el embriólogo puede seleccionar los ovocitos que producirán, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conducirá a embarazos y fertilizarlos in vitro a través de un protocolo clásico de fertilización in vitro (cIVF) o según un protocolo de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

50 Un objeto adicional de la invención se refiere a un método para controlar la eficacia de un protocolo de hiperestimulación controlada de ovarios (COS) que comprende:

- 55
- i) aislar de dicha mujer al menos un ovocito con sus células del cumulus en ciclos naturales, modificados o estimulados;
  - ii) determinar mediante un método de la invención si dicho ovocito es un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conducirá a embarazo;
  - iii) y controlar la eficacia del tratamiento COS en base a si produce un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conducirá a embarazo.

60 El tratamiento COS puede basarse en al menos un ingrediente activo seleccionado entre el grupo que consiste en agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante.

65 La presente invención también se refiere a un método para seleccionar un embrión con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende una etapa de medir el nivel de expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea el embrión, donde dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6 y donde el embrión se selecciona si dicha célula del cumulus no sobreexpresa ninguno de dichos 10 genes.

El término "embrión" se refiere a un ovocito fertilizado o cigoto. Dicha fertilización puede surgir de un protocolo clásico de fertilización in vitro (cIVF) o de un protocolo de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

5 La expresión "fertilización clásica in vitro" o "cIVF" se refiere a un proceso por el cual los ovocitos se fertilizan por espermatozoides fuera del organismo, in vitro. IVF es un tratamiento principal en fertilidad cuando ha fallado la concepción in vivo. La expresión "inyección intracitoplasmática de espermatozoides" o "ICSI" se refiere a un procedimiento de fertilización in vitro en que se inyecta un único espermatozoide directamente en un ovocito. Este procedimiento se usa muy habitualmente para superar factores de infertilidad masculina, aunque también puede usarse cuando los ovocitos no pueden ser penetrados fácilmente por el espermatozoide, y ocasionalmente como un método de fertilización in vitro, especialmente el asociado con donación de esperma.

15 La expresión "embrión competente" se refiere a un embrión con una alta tasa de implante que conduce a embarazo. La expresión "alta tasa de implante" significa el potencial del embrión cuando se transfiere al útero, de implantarse en el entorno uterino y dar lugar a un feto viable, que a su vez se desarrolla en un vástago viable en ausencia de un procedimiento o evento que finalice dicho embarazo.

20 Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, donde la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra y el control es indicativa de si el embrión es competente.

El control puede consistir en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un embrión que da lugar a un feto viable o en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un embrión que no da lugar a un feto viable.

25 Preferiblemente, el control consiste en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un embrión que da lugar a un feto viable.

30 Debe apreciarse que los métodos de la invención conducen a una independencia de consideraciones morfológicas del embrión. Dos embriones pueden tener el mismo aspecto morfológico pero mediante un método de la invención pueden presentar una tasa de implante diferente que conduce a embarazo.

Los métodos de la invención son aplicables preferiblemente a mujeres pero pueden ser aplicables a otros mamíferos (por ejemplo, primates, perros, gatos, cerdos, vacas...).

35 La presente invención también se refiere a un método para determinar si un embrión es un embrión con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende una etapa que consiste en medir el nivel de expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea el embrión, donde dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, GOS2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6.

40 La presente invención también se refiere a un método para determinar si un embrión es un embrión con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende:

- i) proporcionar un ovocito con sus células del cumulus
- ii) fertilizar in vitro dicho ovocito
- 45 iii) determinar si el embrión que resulta de la etapa ii) es competente determinando por un método de la invención si dicho ovocito de la etapa i) es un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conducirá a embarazo.

50 Los métodos de la invención son particularmente adecuados para potenciar el resultado de embarazo de una hembra. Por consiguiente, la invención también se refiere a un método para potenciar el resultado de embarazo de una hembra que comprende:

- i) seleccionar un embrión con una alta tasa de implante que conducirá a embarazo realizando un método de la invención
- 55 ii) implantar el embrión seleccionado en la etapa i) en el útero de dicha hembra.

El método descrito anteriormente por tanto ayudará al embriólogo a evitar la transferencia al útero de embriones con un bajo potencial de resultado de embarazo.

60 El método descrito anteriormente también es particularmente adecuado para evitar embarazos múltiples seleccionando el embrión competente capaz de conducir a un implante y un embarazo.

En todos los casos anteriores, los métodos describieron la relación entre el perfil de expresión génica de células del cumulus y el embrión y resultados de embarazo.

65

**Métodos para determinar el nivel de expresión de los genes de la invención:**

La determinación del nivel de expresión de los genes descritos anteriormente en la Tabla A puede realizarse por una diversidad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión determinado es un nivel de expresión relativo.

Más preferiblemente, la determinación comprende poner en contacto la muestra con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y detectar de ese modo la presencia, o medir la cantidad de polipéptidos o ácidos nucleicos de interés originalmente en la muestra. El contacto puede realizarse en cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, placa de microtitulación, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna, y etc. En realizaciones específicas, el contacto se realiza sobre un sustrato recubierto con el reactivo, tal como una serie de ácidos nucleicos o una serie de ligandos específicos. El sustrato puede ser un sustrato sólido o semisólido tal como cualquier soporte adecuado que comprenda vidrio, plástico, nailon, papel, metal, polímeros y similares. El sustrato puede ser de diversas formas y tamaños, tal como un portaobjetos, una membrana, una perla, una columna, un gel, etc. El contacto puede ser en cualquier condición adecuada para un complejo detectable, tal como un híbrido de ácido nucleico o un complejo anticuerpo-antígeno, a realizar entre el reactivo y los ácidos nucleicos o polipéptidos de la muestra.

En una realización preferida, el nivel de expresión puede determinarse determinando la cantidad de ARNm.

Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (por ejemplo, célula o tejido preparado a partir del paciente) se extrae primero de acuerdo con métodos convencionales, por ejemplo usando enzimas líticas o soluciones químicas o se extrae por mediante resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído entonces se detecta por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). Preferiblemente, se prefiere RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa. La RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa a tiempo real es particularmente ventajosa.

Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) y amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA).

Los ácidos nucleicos que tiene al menos 10 nucleótidos y muestran complementariedad u homología de secuencia con el ARNm de interés en este documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que dichos ácidos nucleicos no tienen que ser idénticos, pero son típicamente al menos aproximadamente un 80% idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente un 85% idénticos o incluso más preferiblemente un 90-95% idénticos. En ciertas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tal como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Se conoce una amplia diversidad de indicadores apropiados en la técnica incluyendo, ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).

Las sondas típicamente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 a 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo entre 10 y 800, más preferiblemente entre 15 y 700, típicamente entre 20 y 500. Los cebadores típicamente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, entre 10 a 35 nucleótidos de longitud, diseñados para aparear perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, a amplificar. Las sondas y cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con que hibridan, es decir, hibridan preferiblemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondiente a la temperatura de fusión  $T_m$  más alta, por ejemplo, formamida al 50%, SCC 5x o 6x. SSC es NaCl 0,15 M, Na-citrato 0,015 M).

Los cebadores o sondas de ácido nucleico usados en el método anterior de amplificación y detección pueden ensamblarse como un kit. Dicho kit incluye cebadores y sondas moleculares consenso. Un kit preferido también incluye los componentes necesarios para determinar si ha sucedido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones y enzimas de PCR; secuencias de control positivo, cebadores de control de reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.

En una realización particular, los métodos de la invención comprenden las etapas de proporcionar los ARN totales extraídos de células del cumulus y someter los ARN a amplificación e hibridación con sondas específicas, más particularmente mediante una RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa.

En otra realización preferida, el nivel de expresión se determina por análisis de chip de ADN. Dicho chip de ADN o microserie de ácidos nucleicos consiste en diferentes sondas de ácido nucleico que están químicamente unidas a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjeto de vidrio o una perla de tamaño microesférico. Un microchip puede constituirse de polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, o nitrocelulosa. Las sondas comprenden ácidos nucleicos tales como ADNc u oligonucleótidos que pueden ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 pares de bases. Para determinar el nivel de expresión, se marca una muestra de un sujeto de ensayo, opcionalmente sometida primero a transcripción inversa, y se pone en contacto con la microserie en condiciones de hibridación, que conduce a la formación de

complejos entre ácidos nucleicos diana que son complementarios a las secuencias de sonda unidas a la superficie de microserie. Los complejos hibridados marcados entonces se detectan y pueden cuantificarse o semi-cuantificarse. El marcaje puede conseguirse por diversos métodos, por ejemplo, usando marcaje radiactivo o fluorescente. Están disponibles muchas variantes de la tecnología de hibridación en microserie para los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, la revisión de Hoheisel, *Nature Reviews, Genetics*, 2006, 7:200-210).

En este contexto, la invención comprende adicionalmente un chip de ADN que comprende un soporte sólido que porta ácidos nucleicos que son específicos para los genes enumerados en la Tabla A.

Otros métodos para determinar el nivel de expresión de dichos genes incluyen la determinación de la cantidad de proteínas codificadas por dichos genes.

Dichos métodos comprenden poner en contacto la muestra con un compañero de unión capaz de interactuar de forma selectiva con una proteína marcadora presente en la muestra. El compañero de unión es generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferiblemente monoclonal.

La presencia de la proteína puede detectarse usando técnicas electroforéticas y de inmunodiagnóstico convencionales, incluyendo inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa, o tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, aunque sin limitación, transferencias de Western; ensayos de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tales como ELISA; ensayos tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación, etc. Las reacciones generalmente incluyen marcadores reveladores tales como marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivos, enzimáticos o moléculas colorantes, u otros métodos para detectar la formación de un complejo entre el antígeno y el anticuerpo o anticuerpos que han reaccionado con el mismo.

Los ensayos mencionados anteriormente generalmente implican la separación de proteína no unida en una fase líquida de un soporte en fase sólida al cual están unidos los complejos antígeno-anticuerpo. Los soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microtitulación), cloruro de polivinilo (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); fluoruro de polivinilideno; papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares.

Más particularmente, puede usarse un método ELISA, donde los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un anticuerpo contra la proteína a ensayar. Una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene la proteína marcadora se añade después a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos anticuerpo-antígeno, la placa o placas pueden lavarse para retirar los restos no unidos y se añade una molécula de unión secundaria marcada de forma detectable. La molécula de unión secundaria se deja reaccionar con cualquier proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica.

Como alternativa puede preferirse un método de inmunohistoquímica (IHC). IHC proporciona específicamente un método para detectar dianas en una muestra o espécimen tisular in situ. La integridad celular global de la muestra se mantiene en IHC, permitiendo por tanto la detección tanto de la presencia como de la localización de las dianas de interés. Típicamente se fija una muestra con formalina, se incluye en parafina y se corta en secciones para tinción y posterior inspección por microscopía óptica. Los métodos actuales de IHC usan marcaje directo o marcaje basado en anticuerpo secundario o basado en hapteno. Los ejemplos de sistemas IHC conocidos incluyen, por ejemplo, EnVision(TM) (DakoCytomation), Powervision(R) (Immunovision, Springdale, AZ), el kit NBA(TM) (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA), HistoFine(R) (Nichirei Corp, Tokio, Japón).

En una realización particular, puede montarse una sección tisular (por ejemplo, una muestra que comprende células del cumulus) en un portaobjetos u otro soporte después de incubación con anticuerpos dirigidos contra las proteínas codificadas por los genes de interés. Después, pueden realizarse inspecciones microscópicas en la muestra montada en un soporte sólido adecuado. Para la producción de fotomicrografías, pueden montarse secciones que comprendan muestras en un portaobjetos de vidrio u otro soporte plano, para resaltar por tinción selectiva la presencia de las proteínas de interés.

Por lo tanto, las muestras IHC pueden incluir, por ejemplo: (a) preparaciones que comprenden células del cumulus, (b) fijar e incluir dichas células y (c) detectar las proteínas de interés en dichas muestras celulares. En algunas realizaciones, un procedimiento de tinción IHC puede comprender etapas tales como: corte y recorte de tejido, fijación, deshidratación, infiltración de parafina, corte en secciones delgadas, montaje en portaobjetos de vidrio, cocción, desparafinado, rehidratación, recuperación del antígeno, etapas de bloqueo, aplicación de anticuerpos primarios, lavado, aplicación de anticuerpos secundarios (opcionalmente acoplados a un marcador detectable adecuado), lavado, tinción de contraste, y examen microscópico.

La invención también se refiere al uso de un kit para realizar los métodos descritos anteriormente, donde dicho kit comprende medios para medir el nivel o niveles de expresión de los genes de la Tabla A que es indicativa de si el

ovocito o el embrión es competente.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

## Descripción de la figura

**Figura 1:** Diagrama de recuadros del conjunto de genes predictivos.

Para cada gen, se muestran las intensidades relativas de las células del cumulus del embrión que dieron embarazo en el lado izquierdo y las intensidades relativas de aquellas que no dieron embarazo al lado derecho.

**Ejemplo: ensayo no invasivo para evaluar el potencial del embrión por perfiles de expresión génica de células del cumulus humanas**

## Material y métodos:

**Pacientes y tratamiento IVF:** En este estudio retrospectivo, se estudiaron pacientes normo-respondedores (n=30) con edad de 30,9 años  $\pm$  2,5 y remitidos desde nuestro centro para ICS (Inyección Intra Citoplasmática de Espermatozoides) para el factor de infertilidad masculina. Los pacientes se estimularon con una combinación de agonista o antagonista de GnRH con FSH recombinante (GonalF, Puregon; respectivamente de Merck-Serono y Organon) o con hMG (Menopur, Ferring). Se evaluó la respuesta del ovario por nivel de estradiol en suero y examen por ultrasonidos para controlar el desarrollo de folículos. La recuperación de los ovocitos se realizó 36 horas después de la administración de hCG (5000 UI), bajo guía por ultrasonidos.

**Evaluación de la calidad del embrión:** En el día 2 y 3 post-microinyección, se evaluaron los parámetros de calidad de embriones cultivados individualmente usando la cantidad de blastómeros y el grado de fragmentación como criterios (grado 1-2: blastómeros de igual tamaño y fragmentación del 0-20%, grado 3-4: blastómeros de tamaños desiguales y más del 20% de fragmentación). Un embrión de máxima calidad se definió en el día 3 como blastómeros de tamaño igual de 6-8 células y sin fragmentación. Se transfirieron uno o dos embriones en el día 3 después de la recuperación de los ovocitos. El embarazo clínico se evaluó dos y seis semanas después de la transferencia del embrión basado respectivamente en Beta-hCG en suero y examen por ultrasonidos (presencia de saco gestacional con latido de corazón).

**Células del cumulus:** Se congelaron todas las muestras de células del cumulus (CC) en el día de la recogida de los óvulos. Después, se seleccionó aleatoriamente una de cada 3 muestras CC por paciente para análisis de microserie. Se recogió un total de 50 muestras CC de 50 ovocitos individuales y se analizaron individualmente: 34 CC de embriones de grado 1-2 (n=20 pacientes), 11 CC de embriones de grado 3-4 (n=10 pacientes) y 5 CC de ovocitos no fertilizados (n=5) (Tabla 1).

**Tabla 1:** Las características de muestras de células del cumulus en este estudio

	30 pacientes			5 Pacientes
	45 CC			5 CC
	G1/2 (34 CC)		G3/4 (11 CC)	cumulus de ovocito no fertilizado (5CC)
	P+	P-	NT	
chips nbr	18	16	11	5
Pacientes nbr	11	9	10	5
CC nbr	18	16	11	5

**CC:** células del cumulus, **P+:** células del cumulus de embriones con resultado positivo de embarazo, **P-:** células del cumulus de embriones sin resultado de embarazo, **G1/2:** células del cumulus de embriones de grado 1-2, **G3/4:** células del cumulus de embriones de grado 3-4, **NT:** no transferido.

El análisis de datos se realizó en condiciones de doble ciego en que el resultado de embarazo se describió solamente después de hibridarse las microseries. Con respecto al resultado de embarazo, las 45 CC de ovocitos fertilizados incluyeron 16 CC de embriones de grado 1-2 que no produjeron embarazo (n=9 pacientes), 18 CC asociados con un resultado positivo de embarazo (n=11 pacientes), y 11 CC de embriones de grado 3-4 que no se transfirieron. Las células del cumulus se despojaron inmediatamente después de la recuperación de los ovocitos (<40 horas post-administración de hCG). Las células del cumulus se retiraron mecánicamente y se lavaron en medio de cultivo y se congelaron inmediatamente a -80°C en tampón de extracción de ARN de RLT (kit RNeasy, Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.) antes de la extracción del ARN.

**Células de la granulosa:** Se seleccionó un grupo independiente de pacientes normo-respondedores (n=8) (edad de 34,8 años  $\pm$  3,2) remitidos para el programa ICSI para el factor de infertilidad masculina para la recogida de células

de la granulosa (8 muestras). Inmediatamente después de la recuperación de los ovocitos, se combinaron los fluidos foliculares de folículos maduros (>17 mm) del mismo paciente, después de la retirada del complejo cumulus ovocito y se diluyeron en un volumen 1/3 de solución HBSS (BioWhittaker) en lotes de 50 ml, que representa una muestra. La purificación de células de la granulosa se adaptó a partir del protocolo de (Kolena *et al.*, 1983). Después de centrifugación de 20 minutos a 500 g en cubetas oscilantes, se recogieron las células de la granulosa en un cojín de Ficoll (12 ml de medio de separación de Linfocitos, BioWhittaker). Se lavaron sucesivamente en HBSS y PBS, se incubaron 5 minutos en tampón de lisis sanguínea (KHCO<sub>3</sub> 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 150 mM, EDTA 0,1 mM) para retirar los glóbulos rojos, se contaron y se sedimentaron en PBS antes de lisis en tampón RLT (Quiagen) y almacenamiento a -80°C. La cantidad de punción folicular y la cantidad de células de la granulosa purificadas varió de 6 a 12 de 2 10<sup>6</sup> a 9 10<sup>6</sup> respectivamente.

**Preparación de ARN complementario (ARNc) e hibridación de microserie:** Se extrajo el ARN de CC y de células de la granulosa usando el micro kit RNeasy (Qiagen). Se midió la cantidad de ARN total con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies Inc., DE, EE.UU.) y se evaluó la integridad del ARN con un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.). El ARNc se preparó con dos rondas de amplificación de acuerdo con el protocolo del fabricante de "doble amplificación" (kit de síntesis de ADNc de dos ciclos, Invitrogen) partiendo del ARN total (que varía de 70 ng a 100 ng). El ARNc obtenido después de la primera amplificación varió de 0,1 µg/ml a 1,9 µg/ml y después de la segunda amplificación varió de 1,6 µg/ml a 4,5 µg/ml.

El ARNc fragmentado marcado (12 µg) se hibridó a sondas oligonucleotídicas en una serie Affymetrix HG-U133 Plus 2.0 que contenía 54.675 conjuntos de sondas oligonucleotídicas ("conjunto de sondas") que corresponden a ≈ 30.000 genes humanos únicos o genes predichos. Cada muestra de cumulus y granulosa se puso individualmente en un chip de microserie.

**Procesamiento de datos:** Se procesaron imágenes de GeneChip escaneadas usando el software Affymetrix GCOS 1.4 para obtener un valor de intensidad y una calificación de detección (presente, marginal o ausente) para cada conjunto de sondas usando los ajustes de análisis por defecto y escala global como primer método de normalización, con un valor de intensidad de diana medio recortado (TGT) de cada serie establecida arbitrariamente a 100. Las intensidades de sonda se derivaron usando el algoritmo MAS5.0. Este algoritmo también determina si un gen se expresa con un nivel de confianza definido o no ("calificación de detección"). Esta "calificación" puede ser "presente" (cuando las sondas de apareamiento perfecto están significativamente más hibridadas que las sondas de desapareamiento, valor-p <0,04), "marginal" (para valores-p >0,04 y <0,06) o "ausentes" (valor-p >0,06). Los datos de microseries se obtuvieron en nuestro laboratorio de acuerdo con las recomendaciones de Información Mínima acerca de un Experimento de Microserie MIAME (Brazma *et al.* 2001).

**Análisis de datos y visualización:** Se usó análisis significativo de microseries (SAM) (Tusher *et al.*, 2001) (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>) para identificar genes cuya expresión variaba significativamente entre grupos de muestras. SAM proporciona valores de media o mediana del cambio factorial (FC) y una porcentaje de confianza de la tasa de descubrimiento falso (FDR) en base a permutación de datos (cambio factorial medio > 2 y FDR < 5%). El análisis de series que permite la comparación del perfil de expresión génica entre muestras de células del cumulus y muestras de células de la granulosa se basa en primer lugar en la detección de ARN significativo (calificación de detección "presente" o "ausente") y después, se somete a un SAM (análisis significativo de microseries) para identificar genes cuya expresión varió significativamente entre grupos de muestras. Para realizar la comparación de perfil de expresión génica entre muestras de células del cumulus de acuerdo con la calidad embrionaria y/o el resultado de embarazo, se realizó una selección no supervisada de conjuntos de sondas usando un coeficiente de variación (CV ≥40%) y un filtro de "calificación de detección" ausente/presente antes de SAM. Para comparar los perfiles de expresión de células del cumulus de desarrollo embrionario alterado (grado 3-4) y bueno (grado 1-2), o de embriones que conducen, o no, a un embarazo, realizamos una clasificación no supervisada con análisis de componentes principales (PCA) y también agrupamiento jerárquico (de Hoon *et al.*, 2004; Eisen *et al.*, 1998). El PCA implicó guiones originales basados en el software de estadística R a través de la interfaz web RAGE (<http://rage.montp.inserm.fr>) (Reme *et al.*, 2008). El análisis de agrupamiento jerárquico basado en los niveles de expresión de sondas variables se realizó con los paquetes de software CLUSTER y TREEVIEW. Para descubrir las redes biológicas funcionales y las vías canónicas superiores, importamos las firmas de expresión génica en el Software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EEUU).

**Análisis de RT-PCR cuantitativa:** Para análisis de qRT-PCR, se seleccionaron 10 muestras CC usadas en los experimentos de microserie de acuerdo con su resultado de embarazo (5 muestras CC asociadas a un resultado negativo y 5 a un resultado positivo correspondientes a 10 pacientes). Se usó ARNc marcado (1 µg) del paciente para generar ADNc de primera hebra. Estos ADNc (5 µl de una dilución 1/10) para reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems). Los 20 µl de mezcla de reacción consistían en ADNc (5 µl), 1 µM de cebadores y 10 µl de mezcla maestra de PCR universal Taqman (Applied Biosystem). La amplificación se midió durante 40 ciclos con una temperatura de hibridación a 60°C. La cantidad de producto de PCR producida en cada etapa de ciclo de la reacción de PCR se controla por sonda TaqMan. Se establece un umbral en la fase exponencial de la curva de amplificación, de la cual se lee el número de ciclo ("Ct" para "umbral de ciclo"). El valor Ct se usa en el cálculo de los niveles relativos de transcrito de ARNm. Se

5 midió la eficacia (E) de la PCR. Esta eficacia se obtiene mediante una curva patrón correspondiente a los cebadores usados. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (QRT-PCR) se realizó usando el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7000 (Applied Biosystems) y se normalizó a PGK1 para cada muestra usando la siguiente fórmula:  $E_{\text{cebador ensayado}}^{\Delta Ct} / E_{\text{PGK1}}^{\Delta Ct}$  ( $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$ ),  $\Delta Ct = Ct \text{ control} - Ct \text{ desconocido}$ , control = una muestra CC del grupo sin embarazo). Cada muestra se analizó por duplicado, y se incluyeron múltiples blancos de agua con el análisis.

## Resultados

10 **Perfil de expresión génica de CC de acuerdo con el resultado del embrión:** Para identificar un perfil de expresión génica en CC que se correlacionara con el resultado del embrión, establecimos una firma de expresión génica para cada categoría de resultado: CC de ovocitos no fertilizados, CC de ovocitos que produjeron desarrollo de embriones pero fragmentación extensiva (grado 3-4), y CC de ovocitos que produjeron desarrollo de embriones con ausencia de fragmentación o fragmentación limitada (grado 1-2). Se tomaron muestras de células de la granulosa como tejido de referencia (control). De hecho, las células de la granulosa son células muy relacionadas con CC en oposición a otros tejidos adultos. El uso de este tejido de referencia disminuyó la cantidad de genes expresados de forma diferencial relacionados con diferencias de linaje en bruto, facilitando por tanto la identificación de sutiles variaciones en la relación CC/ovocito. Un análisis SAM mostró que 2605 genes estaban regulados positivamente en el grupo no fertilizado, 2739 en el grupo de grado 3/4 y 2482 en el grupo de grado 1-2 con una FDR < 5%. Por el contrario, 4270, 4349 y 4483 genes, estaban regulados negativamente, respectivamente. Estas listas de genes después se cruzaron para determinar su solapamiento. Aunque había 449 genes expresados positivamente y 890 expresados negativamente en común en los tres grupos, cada categoría presentó un perfil específico de expresión génica. De forma interesante, 860 genes regulados positivamente, incluyendo por ejemplo Galanina y Gap Junction A5 (GJA5), y 1416 genes regulados negativamente, incluyendo HLA-G y EGR1 estaban modulados específicamente en células del cumulus asociados a una buena calidad embrionaria morfológica. Debe apreciarse que aunque el grupo de grado 1-2 presentó un perfil de fuerte expresión génica, este grupo era heterogéneo respecto al resultado de embarazo e incluía 18 muestras CC asociadas con embriones que produjeron embarazo (incluyendo 4 embarazos de gemelos) pero también 16 muestras CC se asociaron con embriones que no lograron dar lugar a embarazo.

30 **Perfil de expresión génica de CC de acuerdo con resultado de embarazo:** Por lo tanto se compararon muestras CC de acuerdo con el resultado de embarazo. Un análisis SAM definió una lista de "resultado de embarazo" de 630 genes que variaron significativamente (FDR < 5%) entre los dos grupos de pacientes (embarazo frente a ausencia de embarazo). El PCA y el agrupamiento jerárquico confirmaron que esta lista de 630 genes de hecho segregaba una mayoría de las muestras CC asociadas con embarazo de las asociadas con ausencia de embarazo. Es de observar, que los genes de la lista de "resultado de embarazo" estaban predominantemente regulados positivamente en muestras asociadas con un buen resultado. La firma de expresión de "resultado de embarazo" fue particularmente marcada en un subgrupo de 10 muestras CC de embriones asociados al grupo de "embarazo".

40 **Anotación funcional de la lista de genes de resultado de embarazo:** Para investigar los procesos biológicos correlacionados con embriones que consiguen embarazo, se usaron las bases de datos Ingenuity y Pubmed para anotar los 630 genes de la lista de genes de "resultado de embarazo". Entre los genes cuya sobre-expresión está asociada con embarazo, las vías más significativamente sobre-representadas fueron señalización de "estrés oxidativo", "activación de TR/RXR", "transición G2/M del ciclo celular", "metabolismo xenobiótico" y "NFKappaB". Entre estas vías, los genes más representativos fueron interleuquinas, quimioquinas, proteínas adaptadoras y quinasas: IL1Beta (x4,5 en muestras de embarazo frente a ausencia de embarazo, P=0,001), IL16 (x4,8, P=0,001), IL8 (x2,6, P=0,007), IL1RN (x2,1, P=0,0051), IL17RC (x3,6, P=0,001), TIRAP (x8,0, P=0,001), CXCL12 (x3,1, P=0,001), CCR5 (x2,6, P=0,0051), y PCK1 (x3,4, P=0,001). Sorprendentemente, numerosos genes implicados en la regulación de la apoptosis estaban significativamente modulados en muestras CC de ovocitos que produjeron embarazo. Estos genes fueron BCL2L11 (x6,9, P<0,001), CRADD (x2, P=0,0036), NEMO (x4,6, P<0,001), BCL10 (x3,1, P=<0,001), SERPINB8 (x9,1, P<0,001) y TNFSF13 (x2,5, P=0,0038).

55 Por otro lado, los genes asociados con ausencia de embarazo se correlacionaron con las siguientes vías: daño en el ADN G2/M y regulación de los puntos de control del ciclo celular, señalización de "Sonic hedgehog", "IGF-1", "sistema del complemento" y "Wnt/Beta-catenina". Los genes representativos correlacionados con ausencia de embarazo incluyeron NFIB (x0,3, P<0,001), MAD2L1 (x0,4, P<0,001) y IGF1R (x0,4, P<0,001).

## Análisis SAM:

60 El análisis SAM de CC de acuerdo con el resultado de embarazo identificó los 45 genes de la Tabla B que son biomarcadores para potencial del embrión que diferenciarían entre ovocitos que produjeron embriones resultantes en embarazo frente a aquellos que no produjeron embarazo en base a la expresión de genes de análisis de CC. Se usó QRT-PCR para confirmar independientemente los datos de microserie. Analizamos la expresión diferencial de 36 genes regulados positivamente y 9 genes regulados negativamente entre CC de embriones de grado 1-2 que no consiguieron embarazo y CC de embriones de grado 1-2 que consiguieron embarazo.

ES 2 551 584 T3

Tabla B: conjunto de genes predictivo.

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
WNT6	familia del sitio de integración de MMTV tipo wingless, miembro 6	7475
LRCH4	dominio que contiene repeticiones ricas en leucina y homología a calponina (CH)	4034
PAX8	caja 8 apareada	7849
CABP4	proteína 4 de unión a calcio	57010
PDE5A	fosfodiesterasa 5A, específica de GMPc	8654
BCL2L11	BCL2-tipo 11 (facilitador de apoptosis)	10018
PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	5105
TCF20	factor 20 de transcripción (AR1)	6942
SLAMF6	miembro 6 de la familia SLAM	114836
EPOR	receptor de eritropoyetina	2057
CACNG6	canal de calcio, dependiente de voltaje, subunidad gamma 6	59285
NLRP1	familia NLR, que contiene dominio pirina 1	22861
PECAM1	molécula de adhesión de plaquetas/células endoteliales	5175
NOS1	óxido nítrico sintasa 1 (neuronal)	4842
ATF3	factor 3 de transcripción activador	467
KRTAP8	proteína 8-1 asociada a queratina	337879
GRIK5	receptor de glutamato, ionotrópico, kainato 5	2901
SLC24A3	familia de transportadores de solutos 24 (intercambiador de sodio/potasio/calcio), miembro 3	57419
SLC5A12	familia de transportadores de solutos 5 (cotransportador de sodio/glucosa), miembro 12	159963
SLCA10A2	familia de transportadores de solutos 10 (familia de contransportadores de sodio/ácido biliar), miembro 2	6555
SLCO1A2	familia de transportadores de solutos, de transporte de aniones orgánicos, miembro 1A2	6579
SLC25A5	familia de transportadores de solutos 25 (transportador mitocondrial; traslocador de nucleótidos de adenina), miembro 5	292
MG29 o SYPL2	sinaptofisina-tipo 2	284612
NLGN2	neurologina 2	57555
PRKACA	proteína quinasa, dependiente de AMPc, catalítica, alfa	5566
FOSB	homólogo B de oncogén viral de osteosarcoma murino FBJ	2354
SIAT6	ST3 beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 3	6487
LOXL2	lisil oxidasa-tipo 2	4017
PRF1	perforina 1 (proteína de formación de poros)	5551
ADPRH	ADP-ribosilarginina hidrolasa	141
APBB3	unión a proteína precursores de amiloide beta (A4), familia B, miembro 3	10307
EGR3	respuesta de crecimiento prematuro 3	1960
CNR2	receptor 2 de cannabinoides (macrófagos)	1269
IFITM1	proteína transmembrana 1 inducida por interferón (9-27)	8519
PLA2G5	fosfolipasa A2, grupo V	5322
CAMTA1	activador 1 de transcripción de unión a calmodulina	23261
SOX4	SRY (región determinante del sexo Y)-caja 4	6659
NFIB	factor nuclear I/B	4781
NFIC	factor nuclear I/C (factor de transcripción de unión a CCAAT)	4782
RBMS1	motivo de unión a ARN, proteína 1 de interacción monocatenaria	5937
G0S2	conmutador 2 G0/G1	50486
FAT3	homólogo 3 de supresor tumoral FAT (Drosophila)	120114

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
SLC40A1	familia de transportadores de solutos 40 (transportador regulado por hierro), miembro 1	30061
GPC6	glipicano 6	10082
IGF1R	receptor del factor 1 de crecimiento tipo insulina	3480

**Ensayo de fiabilidad de los genes candidatos y correlación entre el perfil de expresión de genes CC y ausencia de embarazo**

5 Para ensayar la fiabilidad de la lista de 45 genes, se realizó un estudio prospectivo incluyendo pacientes respondedores jóvenes (<36 años) normales remitidos a nuestro centro para ICSI para infertilidad masculina. La selección de embriones sucedió de acuerdo con el perfil de expresión génica en CC (grupo 1) o con aspectos morfológicos (grupo 2 usado como control). Para cada grupo, se remplazaron dos embriones. Para los primeros 60  
10 pacientes (30 pacientes/grupo), en el día de recogida de óvulos, en el grupo 1, cada muestra CC se recogió individualmente y se procesó para el análisis de expresión génica. Se analizaron muestras CC (n=267).

Se realizó análisis de RT-PCR cuantitativa para medir la abundancia relativa de los transcritos de genes de interés en CC, y se obtuvieron los datos de expresión para todos los biomarcadores de todas las muestras. Todos los  
15 pacientes en ambos grupos obtuvieron una transferencia de embrión nuevo en el día 3. La comparación entre los 2 grupos revela diferencias significativas para las tasas de implante y embarazo en curso/recogida (40,0% frente a 26,7% y 70,0% frente a 46,7; p<0,05, respectivamente). Observamos 5 embarazos de gemelos en el grupo 1 frente a 0 en el grupo 2 usado como control. Además, observamos que no hubo relación entre los aspectos morfológicos y el perfil de expresión génica en CC. En base al análisis de 267 muestras CC, observamos un 27% de CC que expresan genes que predicen embriones capaces de conseguir embarazo, un 42% de CC que no, un 31% de CC  
20 que muestran expresión génica para detención prematura del desarrollo del embrión.

Además, los datos generados de cada ovocito (fertilización, desarrollo de embriones, transferencia y embarazo etc.) se registraron por un embriólogo. Todos los pacientes obtuvieron dos transferencias de embrión nuevo en el día 3. El embarazo se confirmó por la presencia de un latido de corazón fetal por ultrasonidos a las 6-8 semanas.  
25

Las muestras CC se dividieron en 3 grupos de acuerdo con los resultados de los embriones. El primer grupo (100% de implante) contenía CC de ovocitos que produjeron un embrión transferido con embarazo de gemelos exitoso (n=10). El segundo grupo (grupos sin embarazo) contenía CC de ovocitos que produjeron un embrión transferido incapaz de implantarse (n=26), el grupo 3 (otro: congelación y detención prematura de embriones) contenía CC de ovocitos que produjeron embriones que presentaban detención prematura antes de la fase de ocho células o embriones crioconservados (n=201) y grupo 4 (50% de tasa de implante).  
30 Características de las muestras de células del cumulus

	30 pacientes (edad <36 años; ICSI)			
	267 CC			
	Grupo positivo	Grupos negativos		
	<b>Grupo 1 (100% de tasa de implante)</b>	<b>Grupo 2 (0% de tasa de implante)</b>	<b>Grupo 3 (otro: congelación, detención prematura de embriones)</b>	<b>Grupo 4 (50% de tasa de implante)</b>
<b>CC nbr</b>	10	26	201	30
CC: células del cumulus; ICSI: inyección intracitoplasmática de espermatozoides				

35 Se realizó análisis de RT-PCR cuantitativa para medir la abundancia relativa de los transcritos de genes en CC y se obtuvieron los datos de expresión para los 45 genes de 267 muestras CC otorgadas de 30 pacientes. Para cada gen, la intensidad relativa se calculó dividiendo la intensidad por la intensidad promedio para cada paciente y para cada gen.

40 Después, se realizó un SAM (análisis de significancia de microseries) para obtener los genes más significativos (valor p <0,05) que distinguen grupos negativos que no consiguieron implante o con detención prematura del embrión y el grupo positivo que obtuvo implante de gemelos.

45 En base a estos resultados, los perfiles de expresión de 10 genes parecieron ser particularmente fiables para predecir diferentes condiciones clínicas: (B) embrión incapaz de implantarse y (C) detención prematura del embrión. Estos biomarcadores candidatos se enumeran a continuación  
Tabla C.

Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
<b>B: genes cuya sobre-expresión es predictiva de embriones incapaces de implantarse</b>		
PLA2G5	fosfolipasa A2, grupo V	5322
GPC6	glipicano 6	10082
ATF3	factor 3 de transcripción activador	467
SIAT6	ST3 beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 3	6487
PRKACA	proteína quinasa, dependiente de AMPc, catalítica, alfa	5566
SLC40A1	familia de transportadores de solutos 40 (transportador regulado por hierro), miembro 1	30061
WNT6	familia del sitio de integración de MMTV tipo wingless, miembro 6	7475
<b>C: genes cuya sobre-expresión es predictiva de detención prematura del embrión</b>		
NFIC	factor nuclear I/C (factor de transcripción de unión a CCAAT)	4782
RBMS1	Motivo de unión a ARN, proteína 1 de interacción monocatenaria 1	5937
G0S2	conmutador 2 G0/G1	50486

**Tabla C: Condiciones clínicas predichas por el conjunto de genes predictivos**

5 Estos biomarcadores en células del cumulus fueron capaces de predecir diferentes condiciones clínicas. Por ejemplo, se ha descubierto que la sobre-expresión de of PLAG2G5 o GPC6 es predictiva de embriones incapaces de implantarse. Por el contrario, se ha descubierto que la sobre-expresión de NFIC o RBMS1 es predictiva de una detención prematura del embrión.

10 En la siguiente etapa, se consiguieron diferentes diagramas de recuadros (Figure I) para esos 10 genes de interés y se determinó un punto de corte superior y uno inferior para cada gen, comparando pacientes con implante fallido o detención prematura del embrión con pacientes con implante de gemelos. Cuando la intensidad relativa es superior del punto de corte, se supone que los genes discriminan embriones incapaces de implantes o embriones con detención prematura y aquellos con embarazo de gemelos.

### 15 **Conclusión**

En la mayoría de especies de mamífero incluyendo el ser humano, las células del cumulus que rodean el ovocito aún están presentes en el momento de la fertilización en el oviducto y permanecen hasta el implante embrionario. La matriz extracelular que se remodela dentro y alrededor del cumulus probablemente desempeña un papel clave en estas dos etapas. A este respecto, identificamos 10 genes expresados en células del cumulus que son biomarcadores para el potencial del embrión y el resultado de embarazo. En nuestro estudio, demostramos que el perfil de expresión génica de CC que rodean el ovocito se correlacionaba con diferentes resultados, permitiendo la identificación de una firma de expresión específica de embriones que se desarrollan hacia embarazo. En conclusión, descubrimos una expresión génica diferencial entre células del cumulus humanas de ovocitos que producen diferentes resultados de embarazo de pacientes remitidos para ICSI o IVF. Nuestros resultados indican que el análisis de las células del cumulus que rodean el ovocito es un enfoque no invasivo para la selección de embriones. Típicamente pueden recogerse CC inmediatamente después de conseguir el ovocito, las CC pueden analizarse con un ensayo genómico (ensayo G) para evaluar el potencial del embrión, y el embrión después puede seleccionarse para nuevo remplazo en base a los resultados del ensayo G.

### 30 **Referencias**

En toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención. Las descripciones de estas referencias se incorporan por la presente por referencia en la presente descripción.

- 35 Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrou, T., Pellestor, F., Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S. (2006) The human cumulus-- oocyte complex gene-expression profile. Hum Reprod, 21, 1705-19.
- 40 Balaban, B., Urman, B. (2006) Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod Biomed Online, 12, 608-15.
- Brison, D.R., Houghton, F.D., Falconer, D., Roberts, S.A., Hawkhead, J., Humpherson, P.G., Lieberman, B.A., Leese, H.J. (2004) Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. Hum Reprod, 19, 2319-24.
- 45 Bromer, J.G., Seli, E. (2008) Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. Curr Opin Obstet Gynecol, 20, 234-41.
- Courtois, G., Smahi, A. (2006) NF-kappaB-related genetic diseases. Cell Death Differ, 13, 843-51.
- de Hoon, M.J., Imoto, S., Nolan, J., Miyano, S. (2004) Open source clustering software. Bioinformatics, 20, 1453-

4.

- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 14863-8.
- 5 Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A.P., Herbert, M. (2002) Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod*, 17, 407-12.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., Royere, D. (2007) Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum Reprod*, 22, 3069-77.
- Gardner, D.K. Lane, M., Stevens, J., Schoolcraft, W.B. (2001) Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril*, 76, 1175-80.
- 10 Gasca, S., Pellestor, F., Assou, S., Loup, V., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S. (2007) Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online*, 14, 175-83.
- Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M.C., Leader, A., Sirard, M.A. (2008) Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod*, 23, 1118-27.
- 15 Haouzi, D., De Vos, J., Loup, V., Assou, S., Gasca, S., Reyftmann, L., Klein, B., Hamamah, S. (2008) [Oocyte and embryo quality: Do the apoptotic markers have a place in the preimplantation genetic diagnostic?]. *Gynecol Obstet Fertil*, 36, 730-742.
- He, B., Chadburn, A., Jou, E., Schattner, E.J., Knowles, D.M., Cerutti, A. (2004) Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL. *J Immunol*, 172, 3268-79.
- 20 Kolena, J., Kiss, A., Channing, C.P. (1983) Purification of porcine granulosa cells by continuous Percoll gradient. *Experientia*, 39, 908-9.
- Kovalevsky, G., Patrizio, P. (2005) High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril*, 84, 325-30.
- 25 La Sala, G.B., Nicoli, A., Villani, M.T., Di Girolamo, R., Capodanno, F., Blickstein, I. (2008) The effect of selecting oocytes for insemination and transferring all resultant embryos without selection on outcomes of assisted reproduction. *Fertil Steril*.
- Lee, K.S., Joo, B.S., Na, Y.J., Yoon, M.S., Choi, O.H., Kim, W.W. (2001) Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*, 18, 490-8.
- Lundin, K., Bergh, C., Hardarson, T. (2001) Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*, 16, 2652-7.
- 30 McKenzie, L.J., Pangas, S.A., Carson, S.A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J.E., Amato, P., Matzuk, M.M. (2004) Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 19, 2869-74.
- Pearson, H. (2006) Safer embryo tests could boost IVF pregnancy rates. *Nature*, 444, 12-3.
- 35 Perlman, S., Bouquin, T., van den Hazel, B., Jensen, T.H., Schambye, H.T., Knudsen, S., Okkels, J.S. (2006) Transcriptome analysis of FSH and FSH variant stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes. *Mol Hum Reprod*, 12, 135-44.
- Reddy, U.M., Wapner, R.J., Rebar, R.W., Tasca, R.J. (2007) Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop. *Obstet Gynecol*, 109, 967-77.
- 40 Reme, T., Hose, D., De Vos, J., Vassal, A., Poulain, P.O., Pantesco, V., Goldschmidt, H., Klein, B. (2008) A new method for class prediction based on signed-rank algorithms applied to Affymetrix microarray experiments. *BMC Bioinformatics*, 9, 16.
- Sakkas, D., Gardner, D.K. (2005) Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 17, 283-8.
- 45 Sasson, R., Dantes, A., Tajima, K., Amsterdam, A. (2003) Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action. *Faseb J*, 17, 1256-66.
- Sasson, R., Rimon, E., Dantes, A., Cohen, T., Shinder, V., Land-Bracha, A., Amsterdam, A. (2004) Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases. *Mol Hum Reprod*, 10, 299-311.
- 50 Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B. (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*, 15, 2394-403.
- Seli, E., Sakkas, D., Scott, R., Kwok, S.C., Rosendahl, S.M., Burns, D.H. (2007) Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 88, 1350-7.
- 55 Steele-Perkins, G., Plachez, C., Butz, K.G., Yang, G., Bachurski, C.J., Kinsman, S.L., Litwack, E.D., Richards, L.J., Gronostajski, R.M. (2005) The transcription factor gene *Nfib* is essential for both lung maturation and brain development. *Mol Cell Biol*, 25, 685-98.
- 60 Stein, J.V., Lopez-Fraga, M., Elustondo, F.A., Carvalho-Pinto, C.E., Rodriguez, D., Gomez-Caro, R., De Jong, J., Martinez, A.C., Medema, J.P., Hahne, M. (2002) APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest*, 109, 1587-98.
- Su, Y.Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Affourtit, J.P., Pangas, S.A., Matzuk, M.M., Eppig, J.J. (2008) Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*, 135, 111-21.
- 65 Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F.J., Pangas, S.A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M.J., Matzuk, M.M.,

- Shima-saki, S., Eppig, J.J. (2007) Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 134, 2593-603.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 5116-21.
- 5 Van Montfoort, A.P., Dumoulin, J.C., Kester, A.D., Evers, J.L. (2004) Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod*, 19, 2103-8.
- van Montfoort, A.P., Geraedts, J.P., Dumoulin, J.C., Stassen, A.P., Evers, J.L., Ayoubi, T.A. (2008) Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis. *Mol Hum Reprod*, 14, 157-68.
- 10 Yang, W.J., Hwu, Y.M., Lee, R.K., Li, S.H., Lin, S.Y., Fleming, S. (2007) Early cleavage does not predict treatment outcome following the use of GnRH antagonists in women older than 35. *Fertil Steril*, 88, 1573-8.
- Zhang, X., Jafari, N., Barnes, R.B., Confino, E., Milad, M., Kazer, R.R. (2005) Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality. *Fertil Steril*, 83 Supl. 1, 1169-79.
- 15 Zhu, X.M., Zhu, Y.M., Xu, C.M., Qian, Y.L., Jin, F., Huang, H.F. (2007) Autologous mature follicular fluid: its role in in vitro maturation of human cumulus-removed oocytes. *Fertil Steril*.
- Assou S., Haouzi D., Mahmoud K., Aouacheria A., Guillemin Y., Pantesco V., Reme T., Dechaud H., De vos J., Hamamah S. (2008) A non invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells : a proof of concept study. *Molecular human reproduction*, Vol. 14, nº 12 pág. 711-719, diciembre de 2008.
- 20 Fourar M., Haouzi D., Aouacheria A., Dechaud h., Bendhaou k., Hamamah S. (2008) Gene expression profiles of human cumulus cells and pregnancy outcome: identification of molecular biomarkers of embryo competence, *Fertility and Sterility*, vol. 90, 1 de septiembre de 2008, pág. S72, Resumen.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para seleccionar un ovocito que producirá, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende la etapa de medir el nivel de expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito; en el que dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6 y
- en el que el ovocito se selecciona si dicha célula del cumulus no sobre-expresa ninguno de dichos 10 genes.
- 10 2. Un método para seleccionar un embrión con una alta tasa de implante que conduce a embarazo, que comprende la etapa de medir el nivel de expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea el embrión; en el que dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6 y en el que el embrión se selecciona si dicha célula del cumulus no sobre-expresa ninguno de dichos 10 genes.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 que comprende adicionalmente una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión de los genes en la muestra con un control, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de los genes entre la muestra y el control es indicativa de si el ovocito produce, tras fertilización, un embrión viable con una alta tasa de implante que conduce a embarazo o el embrión está con una alta tasa de implante que conduce a embarazo.
- 20 4. Uso de un kit que comprende un medio para medir específicamente el nivel de expresión de 10 genes en una célula del cumulus que rodea un ovocito o un embrión para realizar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:
- 25 dichos genes son ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6.

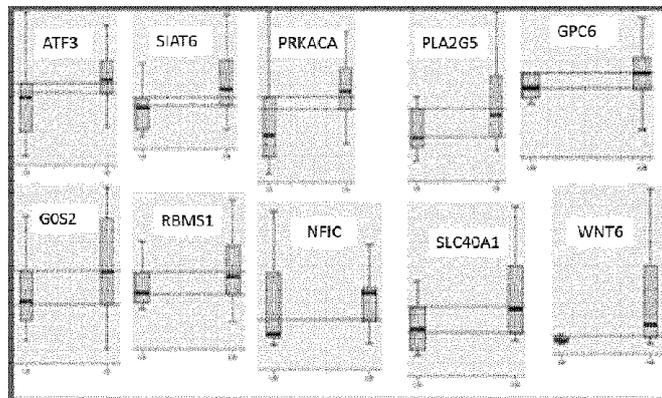


Figura 1