

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 428**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2013 PCT/AT2013/050033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13116889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2013 E 13712666 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2812448**

54 Título: **Procedimiento para el análisis de ácidos nucleicos fetales**

30 Prioridad:

**10.02.2012 AT 1782012**

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

**30.11.2016**

73 Titular/es:

**IVF ZENTREN PROF. ZECH BREGENZ GMBH  
(100.0%)  
Römerstrasse 2  
6900 Bregenz, AT**

72 Inventor/es:

**ZECH, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

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

**ES 2 592 428 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**

Procedimiento para el análisis de ácidos nucleicos fetales

5 La invención se refiere a un procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que sobrenada en el medio de cultivo de cultivos celulares fetales o a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, a partir del blastocele o partir de la cavidad blastocística.

10 El ADN celular fetal se puede comprobar tanto durante el diagnóstico preimplantacional (DPI) que se dedica al examen del embrión antes de su implantación en el útero, como durante el diagnóstico prenatal (DPN) que se dedica al examen del feto antes del parto.

15 En el diagnóstico prenatal están disponibles procedimientos invasivos como la biopsia corial, la amniocentesis y la punción del cordón umbilical para examinar la información genética del feto que se está desarrollando y procedimientos no invasivos tales como exámenes ecográficos. Los procedimientos invasivos requieren la introducción de una aguja en el útero para extraer o bien líquido amniótico o tejido de la placenta o sangre del feto. En este caso, se pueden producir complicaciones en el transcurso del embarazo que pueden conducir hasta al aborto.

20 La posibilidad de poder obtener y analizar el material genético del feto con procedimientos no invasivos puede reducir el riesgo de un daño a la salud del feto y de una interrupción no deseada del embarazo. En el plasma sanguíneo de la madre, además de ácidos nucleicos celulares maternas se encuentra también ADN libre circulante con un reducido tamaño molecular. Una parte de este ADN libre circulante en el plasma sanguíneo de mujeres embarazadas es de origen fetal. El diagnóstico molecular prenatal no invasivo se basa, además de exámenes ecográficos, en el análisis de este ADN fetal libre circulante. La parte del ADN fetal en la cantidad total de ADN en el plasma sanguíneo materno asciende a aproximadamente tres a seis por ciento y aumenta a medida que avanza el embarazo. En el primer trimestre, la concentración de ADN fetal asciende en promedio a aproximadamente 25 equivalentes genómicos (EG) por mililitro de plasma y aumenta hasta aproximadamente 300 EG/ml en el tercer trimestre. Las concentraciones individuales del ADN fetal en el plasma varían en hasta diez veces. Después del parto, el nivel de ADN fetal en el plasma sanguíneo cae rápidamente y ya al cabo de 24 horas ya no se pueden comprobar secuencias de ADN fetal libre circulante en la sangre de la madre y por tanto se elimina completamente antes de un parto siguiente. Se supone que el ADN libre circulante tiene como origen procesos apoptóticos en la placenta que conducen entre otras a una liberación de ADN genómico degradado. De esta manera, sale continuamente ADN del feto a la vía sanguínea de la madre. Diversos estudios han demostrado que en el plasma de embarazadas el ADN fetal y el ADN materno se diferencian en cuanto a sus características moleculares, el ADN fetal está presente principalmente en forma de fragmentos cortos con un tamaño de hasta 300 pares de bases (bp), mientras que el ADN materno circula principalmente en forma de un peso molecular más grande (1000 pb y más). Estas diferencias de tamaño entre el ADN fetal y el ADN materno exentos de células se mantienen sustancialmente inalteradas en el transcurso del embarazo y permiten obtener a través de procedimientos adecuados para la limpieza de ADN enriquecer fragmentos de ADN cortos y obtener de esta manera una muestra de ADN en la que la parte de ADN fetal está aumentada frente al fondo dominante de las secuencias de DNA materno. Este enriquecimiento de ADN fetal aumenta el valor informativo del diagnóstico molecular del feto para la detección de alteraciones de secuencia / mutaciones y, en particular, para informaciones cuantitativas como por ejemplo para el diagnóstico de trisomías.

45 Sin embargo, la comprobación de ADN fetal en el plasma sanguíneo materno no permite el análisis genético molecular del embrión en una fertilización in vitro (FIV) antes de la transferencia del embrión al útero de la madre.

50 Pero para aumentar la cuota de éxito en una fertilización in Vitro adquieren cada vez más importancia tanto la identificación morfológica como la identificación genética molecular de los mejores embriones antes de la transferencia, lo que es posible mediante un diagnóstico preimplantacional.

55 Como diagnóstico preimplantacional (DPI) se denominan los análisis de biología celular y de genética molecular que sirven para la decisión de si un embrión generado mediante fertilización in Vitro debe implantarse en el útero o no. El DPI se usa principalmente para la detección de determinadas enfermedades hereditarias y peculiaridades de los cromosomas. Pero también se puede emplear para generar un bebé apropiado como donante de órganos para un hermano enfermo ("bebé salvador") o para elegir el sexo o determinadas características hereditarias del niño.

60 Para poder realizar un DPI es necesario previamente una fertilización in Vitro. El procedimiento de la FIV con DPI se puede dividir básicamente en cinco pasos: 1. estimulación hormonal y obtención de óvulo, 2. fertilización extracorporal, 3. biopsia embrionaria, 4. diagnóstico genético, 5. transferencia embrionaria o crioconservación. Los pasos tres y cuatro son los que definen el DPI propiamente dicho.

La biopsia embrionaria, es decir, la separación de uno o dos células de un embrión se realiza generalmente en el tercer día después de la fertilización. En este momento, el embrión se compone habitualmente de seis a diez células y está envuelto por una envoltura protectora (zona pelúcida).

5 Según un procedimiento más reciente, la biopsia del embrión no se realiza hasta aproximadamente el quinto día de desarrollo. En este estadio de desarrollo, el embrión se compone de un grupo de células exterior, a partir del que se produce la placenta (trofoblasto), y la masa celular interior, a partir de la que se desarrolla el embrión o feto (embrioblasto), y se denomina blastocisto. Por lo tanto, también se habla de una biopsia de blastocisto. En una biopsia de blastocisto, generalmente se extraen varias células al trofoblasto y se examinan genéticamente. Sólo  
10 aproximadamente de 20 a 40% de todos los óvulos fertilizados alcanzan el estadio del blastocisto expandido.

En una biopsia embrionaria, en primer lugar, con la ayuda de ácido, luz láser o de manera mecánica se realiza un orificio en la envoltura de protección que envuelve al embrión. A continuación, al embrión se extraen una o dos células por medio de una pipeta de aspiración. Hay indicios de que la separación de células puede reducir la capacidad de implantación del embrión. Todavía está poco aclarada la cuestión de si la separación podría tener otros efectos negativos sobre el desarrollo del embrión o del niño. El DPI constituye un procedimiento difícil de realizar, no en último lugar porque habitualmente están disponibles como máximo dos células para el test y porque es imposible o difícil repetir el procedimiento. Por ello no es despreciable el riesgo de diagnósticos erróneos. La probabilidad de que el resultado del test es correcto asciende aproximadamente a entre 90 y 95%. Para comprobar el resultado se recomienda a todas las parejas afectadas realizar durante el embarazo adicionalmente un DPN. El problema más frecuente son los resultados de examen erróneamente negativos a causa de la contaminación con ADN ajeno o a causa de la llamada "allelic dropout" (pérdida alélica), es decir, el análisis de sólo uno en lugar de los dos alelos. En el caso de un resultado de examen erróneamente negativo, el embrión es portador del defecto genético, aunque el diagnóstico no lo indica.  
15  
20  
25

Otro problema consiste en el mosaicismo, entendiéndose por un mosaico un embrión formado por células genéticamente distintas. Por tanto, ocurre que las células examinadas presentan otro genoma que las células restantes, lo que conduce a un diagnóstico erróneo. El mosaicismo es relativamente frecuente y se debe a errores en la división celular.  
30

Harper y col. 2011 (Human Genetics, 175 a 186) describe alguno de los procedimientos de diagnóstico preimplantacional. Por lo tanto, la presente invención tiene el objetivo de hacer posible un diagnóstico preimplantacional sin peligro para el embrión, pero a pesar de ello con un alto valor informativo.

35 El objetivo de la invención se consigue respectivamente de forma autónoma mediante un procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que sobrenada en el medio de cultivo de cultivos celulares fetales de una fertilización in vitro, que comprende los pasos: a) extracción del sobrenadante exento de células, que contiene ácido nucleico fetal, del medio de cultivo de fertilización in vitro del recipiente de cultivo empleado para cultivar el óvulo fertilizado, b) enriquecimiento de los ácidos nucleicos fetales contenidos en el sobrenadante y c) realización de un análisis de los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante exento de células, así como mediante un procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística, que comprende los pasos: a) extracción del líquido exento de células, que contiene ácido nucleico fetal, a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística de la blástula o del blastocisto, b) enriquecimiento del ácido nucleico contenido en dicho líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, o de los ácidos nucleicos fetales contenidos en el blastocele o la cavidad blastocística y c) realización de un análisis de los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante exento de células.  
40  
45

El uso de ADN fetal exento de células, procedente del líquido que sobrenada en el medio de cultivo de cultivos in vitro de la fertilización in vitro en lugar de células intactas presenta las ventajas de que a) no se reduce la capacidad de implantación del embrión, b) se suprime el riesgo de una interrupción no deseada del embarazo, c), no se daña al embrión, d) disminuye la fuente de error por mosaicismo, microquimerismo, contaminación con ADN ajeno, e) se evitan diagnósticos erróneos, etc.  
50

55 En el procedimiento según la invención resulta ventajoso que no es necesario extraer componentes celulares. Mediante el diagnóstico preimplantacional no invasivo se pueden detectar aneuploidias cromosómicas fetales, enfermedades monogenéticas, el sexo, el grupo sanguíneo, tipificaciones de HLA etc.

Además, resulta ventajoso que mediante los procedimientos de genética molecular se dispone rápidamente de un resultado y, por lo tanto, antes de la transferencia del embrión al útero de la madre que habitualmente se realiza ya como muy tarde 6 días después de la fertilización, si n o se realiza ninguna crioconservación, es posible una  
60

decisión.

El ácido nucleico fetal puede ser ADN y/o ARN, especialmente ADN, resultando ventajoso que para el análisis subsiguiente se pueden usar procedimientos biomoleculares estandarizados.

5 También resulta ventajoso que el sobrenadante de cultivo celular puede analizarse en medios de cultivo únicos y/o que forman parte de una secuencia, por lo que en caso de un resultado dudoso un análisis puede repetirse en el transcurso del diagnóstico preimplantacional, porque en cualquier momento pueden aislarse de forma no invasiva ácidos nucleicos fetales del cultivo celular y analizarse.

10 El sobrenadante exento de células, que contiene ácido nucleico, puede analizarse el día 1 a 6 del cultivo in vitro, por lo que se dispone ya de un resultado del análisis muy temprano durante la fertilización in vitro. De esta manera, por ejemplo se puede ofrecer a los futuros padres ya antes de la implantación una base para la decisión sobre el siguiente procedimiento, sin poner en peligro al embrión. Preferentemente el ADN/ARN fetal, exento de células, se analiza el día 3 a 5 del cultivo in vitro, porque en este momento existe ya suficiente ADN/ARN fetal del embrión en el sobrenadante de cultivo celular del cultivo celular in vitro para obtener de forma segura un resultado del análisis y, además, el resultado está disponible a tiempo antes de la transferencia del embrión al útero de la madre.

20 Preferentemente, el líquido que sobrenada en el cultivo celular se extrae de una zona que rodea el óvulo fertilizado y que tiene al menos 2 veces el diámetro del óvulo fertilizado cultivado, porque en esta zona existe la máxima concentración de ADN/ARN y por tanto la máxima probabilidad de obtener un resultado del análisis.

25 También es posible abrir de forma mecánica, química o por láser la zona pelúcida del embrión o del óvulo fertilizado en los días de cultivo 1 a 6 del cultivo celular antes de la extracción del líquido que sobrenada en el cultivo celular, para aumentar la concentración de ADN/ARN fetal, ya que la zona pelúcida constituye un obstáculo natural para la salida de ADN/ARN al medio de cultivo.

30 Según el procedimiento (sin o después de abrir la zona pelúcida) se analizan al menos 2 µl del sobrenadante de cultivo celular, porque de esta manera se puede suministrar suficiente ADN/ARN fetal al análisis.

35 El aislamiento, especialmente el enriquecimiento, de los ácidos nucleicos fetales se realiza mediante un procedimiento seleccionado de entre un grupo que comprende la centrifugación, la filtración, la unión a gránulos, la amplificación, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa, porque de esta manera se usan procedimientos estandarizados para la obtención del resultado y por tanto se puede mantener lo más baja posible la cuota de errores.

40 El análisis de los ácidos nucleicos fetales puede comprender un procedimiento seleccionado de entre un grupo que comprende la secuenciación, la amplificación, la hibridación in situ, especialmente la hibridación in situ con fluorescencia, con lo que existe rápidamente un resultado con valor informativo y se puede decidir sobre el siguiente destino del embrión a tiempo antes de la transferencia del embrión.

45 Resulta ventajoso que se pueden detectar enfermedades, especialmente enfermedades monogenéticas, grupos sanguíneos, el sexo, aneuploidias, tipos de HLA, y por tanto existe ya antes de comenzar el embarazo en sí la certeza sobre la cuestión inicial y no se consigue un resultado sólo en el transcurso del embarazo después de una larga espera o mediante la puesta en peligro del embrión.

50 En un procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística, que comprende los pasos: a) extracción del líquido exento de células, que contiene ácido nucleico fetal, a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística de la blástula o del blastocisto, b) enriquecimiento de los ácidos nucleicos fetales contenidos en el líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, en el blastocele o la cavidad blastocística y c) realización de un análisis de los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante exento de células, se extrae una cantidad de líquido seleccionada de entre un intervalo con un límite inferior de 0,004 pl y un límite superior de 0,1 nl, especialmente 0,04 nl, del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del líquido contenido en el blastocele o la cavidad blastocística de la blástula o del blastocisto, y se transfiere a un volumen de líquido que preferentemente se compone del o contiene el medio de cultivo, de al menos 2 µl, y a continuación se analiza, para por una parte no poner en peligro al embrión, a la blástula o al blastocisto, pero por otra parte, disponer de suficiente material para el análisis adicional.

60 El aislamiento y el enriquecimiento del ácido nucleico se realizan mediante amplificación, especialmente mediante

la reacción en cadena de la polimerasa, porque de esta manera se dispone rápidamente de una cantidad suficiente de ácido nucleico fetal para someterlo a un análisis adicional.

5 Las ventajas del aislamiento y del análisis de los ácidos nucleicos mediante procedimientos estandarizados corresponden también en esta forma de realización alternativa del procedimiento en el que los ácidos nucleicos exentos de células se obtienen a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística, a las que se han descrito anteriormente. Además, con el procedimiento alternativo según la invención se pueden comprobar y determinar los mismos parámetros como se ha descrito anteriormente.

10 Para una mejor comprensión de la invención, esta se describe en detalle con la ayuda de la siguiente figura.

Muestra en una representación fuertemente simplificada esquemáticamente:

15 la figura 1, un recipiente de cultivo con un óvulo fertilizado y la zona circundante.

Introduciendo, cabe mencionar que en las distintas formas de realización descritas, las partes idénticas se proveen de signos de referencia idénticos, siendo válidas las especificaciones contenidas en la descripción completa de forma análoga para partes idénticas con signos de referencia idénticos. Además, las indicaciones de posición elegidas en la descripción como por ejemplo arriba, abajo, lateralmente etc. se refieren a la figura descrita y representada en concreto y en caso de un cambio de posición son válidas de forma análoga para la nueva posición. Además, también características individuales o combinaciones de características de los diferentes ejemplos de realización representados y descritos pueden constituir soluciones autónomas de la invención o según la invención.

20 Todas las indicaciones relativas a intervalos de valores en la presente descripción se entenderán de tal forma que comprenden cualquier intervalo parcial y todos los intervalos parciales de los mismos, por ejemplo, la indicación 1 a 10 se entenderá de tal forma que están comprendidos todos los intervalos parciales partiendo del límite inferior 1 y del límite superior 10, es decir, que todos los intervalos parciales comienzan con un límite inferior de 1 o superior y terminan en un límite superior de 10 o inferior, por ejemplo, 1 a 1,7 o 3,2 a 8,1 o 5,5 a 10.

25 La presente invención describe un procedimiento con el que se puede realizar un diagnóstico preimplantacional sin usar material celular.

30 Por embrión se entiende en el sentido de la invención aquella parte celular del cultivo in vitro, a partir de la que se desarrolla el embrión en sí, incluidos los estadios de desarrollo tempranos como la mórula, la blástula, la gástrula o el blastocisto.

35 El óvulo fertilizado corresponde en el sentido de la invención a los diferentes estadios de desarrollo tempranos de la génesis embrionaria, como la mórula, la blástula, la gástrula o el blastocisto.

40 Para la realización del procedimiento según la invención para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que sobrenada en el medio de cultivo de cultivos celulares fetales de un cultivo de células de fertilización in vitro, en primer lugar, se extrae del recipiente de cultivo empleado para cultivar el óvulo fertilizado una alícuota del líquido que sobrenada en el medio de cultivo o el sobrenadante total del medio de cultivo, que está exento de células y contiene ácidos nucleicos fetales. A continuación, el medio de cultivo con el ácido nucleico contenido en el mismo se sigue procesando y se aíslan los ácidos nucleicos fetales contenidos en el sobrenadante. Ahora, este ácido nucleico aislado del sobrenadante exento de células se somete a un análisis adicional.

45 Como medio de cultivo para el óvulo fertilizado o el embrión se usan medios estandarizados tales como medios HSA o rHSA, por lo que no se introduce ADN ajeno en los cultivos celulares.

50 Sin embargo, antes de poder cultivar el óvulo fertilizado, se realiza primero la extracción del óvulo (punción folicular) con la fertilización subsiguiente del óvulo con el espermatozoide mediante IVF, ICSI, IMSI. Los óvulos fertilizados de esta manera se introducen en un medio de cultivo, también llamado medio nutritivo. Ahora, estos se incuban en un armario incubador. Al cabo de 16 a 18 horas se realiza un primer control bajo microscopio para detectar cuántos óvulos se pudieron fertilizar con los espermatozoides. Entretanto es posible mantener los óvulos fertilizados o embriones durante más tiempo en el cultivo para, a continuación, en el día 5 (poco frecuentemente en el día 6) después de la punción folicular, transferir uno o dos embriones en el estadio de blastocisto, preferentemente en el estadio de blastocisto expandido.

55 Esto significa que de la totalidad de todos los embriones cultivados durante 3 a 6 días se seleccionan y se

transfieren los más desarrollados y los menos llamativos tanto bajo el aspecto morfológico como bajo el aspecto genético molecular conforme al procedimiento según la invención.

5 Sorprendentemente, tanto en el líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, en el blastocele o en la cavidad blastocística, como en el líquido que sobrenada en el medio de cultivo existe ya una cantidad suficiente de ácidos nucleicos fetales para poder someterlos a un análisis adicional. Se supone que el ADN proviene de células apoptóticas dentro del embrión. El ADN de estas células se libera y puede pasar a través de la zona pelúcida. Para realizar un análisis genético molecular del embrión previsto para la transferencia, por lo tanto, por el procedimiento según la invención es obsoleta la extracción de material celular. Por lo tanto, no se es necesario extraer células de ningún tipo, es decir, ni del embrión posterior ni de las células que lo rodean ni del estadio de mórula, de blástula, de gástrula o de blastocisto. Dado que el embrión a desarrollar se encuentra en un estadio muy activo al contrario del óvulo material y del espermatozoide paternal, la parte de ácidos nucleicos fetales en el medio de cultivo exento de células es notablemente mayor que la de los padres.

15 Mediante la obtención de ácidos nucleicos exentos de células a partir del sobrenadante se facilita notablemente el siguiente procesamiento de los mismos para poder realizar un análisis, porque no es necesario separar componentes celulares, en cuyo caso se podrían perder ácidos nucleicos fetales, y no existen impurificaciones celulares que pudiesen perturbar un análisis.

20 El ácido nucleico fetal puede ser tanto ADN como ARN, existiendo generalmente fragmentos de ácido nucleico. Así, se pueden analizar fragmentos de ADN circulantes libres de reducido tamaño molecular. Pero también se puede aislar y analizar ARN, como por ejemplo miARN, siARN o mARN, que por ejemplo se transcribe inicialmente de forma reversa par el siguiente análisis.

25 El líquido del medio de cultivo que va a ser sometido a análisis se puede analizar a partir de medios de cultivo únicos o que forman una secuencia. En caso de emplear medios de cultivo secuenciales, en el transcurso del cultivo del óvulo fertilizado, el medio de cultivo eventualmente se cambia varias veces, y durante cada cambio de medio de cultivo, del medio de cultivo retirado pueden aislarse y analizarse los ácidos nucleicos fetales. Sin embargo, un cambio múltiple del medio de cultivo también es posible en medios de cultivo únicos.

30 El sobrenadante exento de células que contiene el ácido nucleico se extrae del cultivo in vitro en al menos uno de los días 1 a 6 y se analiza. Preferentemente, el sobrenadante se extrae del cultivo in vitro entre los días 3 y 5 (sin o después de la apertura mecánica, química o por láser de la zona pelúcida), porque en este período está contenido suficiente ácido nucleico fetal en el sobrenadante y, no obstante, el resultado del diagnóstico preimplantacional está disponible a tiempo antes de la transferencia del embrión al útero de la madre. La apertura de la zona pelúcida se puede realizar directamente antes de la extracción del líquido que sobrenada en el medio de cultivo o ya hasta 3 días antes.

40 Si el medio de cultivo no se cambia o si se analiza ácido nucleico fetal antes de un cambio de medio de cultivo, el sobrenadante de cultivo celular se extrae de una zona que rodea al óvulo fertilizado y que tiene al menos 2 veces el diámetro del óvulo fertilizado cultivado. En la figura 1, la zona de la que se puede extraer el medio de cultivo no está representada a escala. La figura 1 muestra un medio de cultivo 1 en el que el óvulo 2 fertilizado se cultiva en el medio de cultivo 3. Una posible zona 4 que rodea al óvulo 2 fertilizado limita con el óvulo 2 fertilizado y se extiende en el borde superior de este. Otra posibilidad de la zona 5 también está representada en la figura 1, extendiéndose la misma radialmente alrededor del óvulo 2. Para obtener una cantidad suficiente de ácido nucleico fetal, preferentemente, se extrae el volumen de la distancia del doble diámetro máximo del óvulo 2 fertilizado.

50 Se extraen al menos 2  $\mu$  del sobrenadante de cultivo celular para garantizar que estén contenidos al menos algunas moléculas de ácido nucleico fetal que generalmente se amplifican de todas formas antes de someterse al análisis adicional.

Sin embargo, en caso de un cambio de medio de cultivo o en el momento de la transferencia del embrión al útero también se puede someter el medio de cultivo completo al análisis adicional.

55 El aislamiento de los ácidos nucleicos fetales del sobrenadante de cultivo celular exento de células se realiza mediante procedimientos conocidos por el estado de la técnica que sirvan para el enriquecimiento de ácidos nucleicos. Se trata especialmente de procedimientos seleccionados de entre un grupo que comprende la centrifugación, la filtración, la unión a gránulos, la amplificación, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa.

60 Sin embargo, también es posible comprobar la presencia y la cantidad de DNA fetal sin enriquecimiento o

aislamiento, por ejemplo mediante procedimiento espectrofotométricos. De esta manera, por ejemplo, a partir de una pequeña cantidad de muestra (1  $\mu$ l) y del espectro obtenido a partir de ello se puede calcular la cantidad de los ácidos nucleicos presentes en la muestra (como ADN o ARN). A partir de ello se pueden obtener indicios para el siguiente desarrollo del óvulo fertilizado o del embrión.

5 El análisis de los ácidos nucleicos fetales igualmente se realiza con procedimientos conocidos por el estado de la técnica, realizándose preferentemente un procedimiento seleccionado de entre un grupo que comprende una secuenciación, una amplificación, una hibridización in situ, especialmente una hibridización in situ con fluorescencia. El examen de los ácidos nucleicos sin embargo se realiza mediante diferentes procedimientos de análisis según el objetivo y habitualmente tarda entre dos y 24 horas. Por ejemplo, la amplificación y, dado el caso, el aislamiento del ácido nucleico pueden realizarse mediante procedimientos de amplificación, con los que cantidades de un equivalente de célula ADN se pueden comprobar mediante la amplificación del genoma completo. El test FisH (hibridización in situ con fluorescencia) por ejemplo comprueba si existen aberraciones cromosómicas, unas alteraciones muy graves del genoma. Genes individuales se examinan si en los padres existe una disposición a un defecto genético, es decir, si una determinada enfermedad hereditaria aparece de forma repetida en la familia. Además de los procedimientos de uso más frecuente de la amplificación por PCR y la hibridización in situ con fluorescencia, también están disponibles para el diagnóstico preimplantacional los procedimientos de la amplificación del genoma completo conocidos por el estado de la técnica. También el cariomapping puede realizarse como posible procedimiento de análisis para los ácidos nucleicos obtenidos con el procedimiento según la invención.

Mediante el análisis de ADN genómico o mitocondrial exento de células de un embrión en cultivo se pueden obtener parámetros importantes para las expectativas de éxito de la implantación, la viabilidad y la predisposición genética del ser vivo desarrollado a partir del mismo. Se pueden detectar enfermedades, especialmente enfermedades monogénicas, grupos sanguíneos, el sexo, aneuploidias, tipos de HLA, etc. Pero evidentemente, también se pueden determinar otros parámetros sobre la base de la genética molecular. Con el procedimiento según la invención se pueden detectar también marcadores biológicos relacionados con aneuploidias cromosómicas y basados en causas de genética molecular.

30 En una variante de realización alternativa de la invención también se puede usar un procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística para realizar un diagnóstico preimplantacional sin usar material celular. En un primer paso se extrae líquido que contiene ácido nucleico fetal, exento de células, del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística de la blástula o del blastocisto. A continuación, se enriquece o se aísla el ácido nucleico fetal contenido en el líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, en el blastocele o en la cavidad blastocística. Por último, se realiza un análisis biomolecular de los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante exento de células.

Por ejemplo, la zona pelúcida se puede abrir el día 3 y el medio de cultivo se puede recoger los días 3 a 5. Alternativamente, el día 3 también se puede lavar la parte interior y recoger el medio.

A partir del blastocele o de la cavidad blastocística se pueden obtener muestras el día 5.

45 A partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística se extraen al menos 0,004 pl, especialmente 0,004 nl a 0,04 nl, de líquido. Preferentemente, a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida se extraen al menos 0,004 nl y a partir del blastocele o de la cavidad blastocística de la blástula o del blastocisto se extraen al menos 0,04 pl a 0,04 nl del líquido y se transfieren a un volumen de líquido de al menos 2  $\mu$ l, que en el caso ideal se compone de o contiene el medio de cultivo, y a continuación se analiza para haber obtenido en todo caso moléculas de ácidos nucleicos fetales en el líquido extraído del blastocele o de la cavidad blastocística o de la zona de líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida.

El ácido nucleico contenido en el líquido del blastocele o de la cavidad blastocística se enriquece preferentemente mediante amplificación, especialmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

55 Se pueden usar los procedimientos de aislamiento y de análisis descritos anteriormente y se pueden determinar los mismos parámetros.

60 Las variantes de realización del procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que sobrenada en el medio de cultivo de cultivos celulares fetales de una fertilización in vitro no está limitadas a las variantes de realización del mismo representados especialmente, sino que más bien también son posibles diversas

combinaciones de las distintas variantes de realización entre sí y esta posibilidad de variación por la teoría para la actuación técnica de la presente invención está sujeta al saber del experto activo en este campo técnico. Por lo tanto, también está incluida en el alcance de protección cualquier variante de realización imaginable que sea posible mediante combinaciones de detalles individuales de la variante de realización representada y descrita.

5 Finalmente, cabe mencionar que para una mejor comprensión los componentes de la figura 1 se han representado en parte no a escala y/o de forma aumentada y/o reducida.

10 El objetivo en el que se basan las soluciones autónomas de la invención se halla en la descripción.

**Lista de signos de referencia**

- 1 Recipiente de cultivo
- 2 Óvulo
- 15 3 Medio de cultivo
- 4 Zona
- 5 Zona



## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Procedimiento para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que sobrenada en el medio de cultivo de cultivos celulares fetales de una fertilización in vitro, que comprende los pasos: a) extracción del líquido que sobrenada exento de células, que contiene ácido nucleico fetal, del medio de cultivo de fertilización in vitro del recipiente de cultivo empleado para cultivar el óvulo fertilizado, b) aislamiento de los ácidos nucleicos fetales contenidos en el líquido que sobrenada y c) realización de un análisis de los ácidos nucleicos presentes en el líquido que sobrenada exento de células.
- 10 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** como ácido nucleico fetal se analiza ADN y/o ARN.
- 15 3.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** se analiza el líquido que sobrenada en el cultivo celular de medios de cultivo únicos y/o secuenciales.
- 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el líquido que sobrenada exento de células que contiene ácido nucleico se analiza en al menos uno de los días 1 a 6 del cultivo in vitro.
- 20 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el líquido que sobrenada en el medio de cultivo (3) del recipiente de cultivo (1) se extrae de una zona (4, 5) que rodea al óvulo (2) fertilizado y que tiene al menos 2 veces el diámetro del óvulo (2) fertilizado cultivado.
- 25 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** se analizan al menos 2  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo celular.
- 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** la zona pelúcida del óvulo fertilizado se abre de forma mecánica, química o por láser en los días de cultivo 1 a 6 antes de la extracción del líquido que sobrenada en el cultivo celular.
- 30 8.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el aislamiento de los ácidos nucleicos fetales se realiza mediante enriquecimiento, especialmente mediante un procedimiento seleccionado de entre un grupo que comprende la centrifugación, la filtración, la unión a gránulos, la amplificación, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa.
- 35 9.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el análisis de los ácidos nucleicos fetales comprende un procedimiento seleccionado de entre un grupo que comprende una secuenciación, una amplificación, una hibridación in situ, especialmente una hibridación in situ con fluorescencia.
- 40 10.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** se detectan enfermedades, especialmente enfermedades monogénicas, grupos sanguíneos, el sexo, aneuploidias, tipos de HLA del embrión.
- 45 11.- Procedimiento in vitro para la comprobación de ácidos nucleicos fetales a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística, que comprende los pasos: a) extracción del líquido exento de células, que contiene ácido nucleico fetal, a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, del blastocele o de la cavidad blastocística de la blástula o del blastocisto, b) enriquecimiento de los ácidos nucleicos fetales contenidos en dicho líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, en el blastocele o la cavidad blastocística y c) realización de un análisis de los ácidos nucleicos presentes en el sobrenadante exento de células.
- 50 12.- Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado porque** se extrae una cantidad de líquido seleccionada de entre un intervalo con un límite inferior de 0,004 pl, especialmente de 0,004 nl, y con un límite superior de 0,1 nl, a partir del líquido que rodea al embrión dentro de la zona pelúcida, a partir del líquido contenido en el blastocele o la cavidad blastocística de la blástula o del blastocisto, y se transfiere a un volumen de líquido que preferentemente se compone del o contiene el medio de cultivo, de al menos 2  $\mu$ l, y a continuación se analiza.
- 55 13.- Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, **caracterizado porque** el enriquecimiento del ácido nucleico se realiza mediante amplificación, especialmente mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- 60 14.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 13, **caracterizado porque** el aislamiento de los ácidos nucleicos fetales se realiza mediante enriquecimiento, especialmente mediante un procedimiento seleccionado de entre un grupo que comprende la centrifugación, la filtración, la unión a gránulos, la amplificación, especialmente

la reacción en cadena de la polimerasa.

**15.-** Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 14, **caracterizado porque** el análisis de los ácidos nucleicos fetales comprende un procedimiento seleccionado de entre un grupo que comprende una secuenciación, una amplificación, una hibridización in situ, especialmente una hibridización in situ con fluorescencia.

5

**16.-** Procedimiento según una de las reivindicaciones 11 a 15, **caracterizado porque** se detectan enfermedades, especialmente enfermedades monogénicas, grupos sanguíneos, el sexo, aneuploidias, tipos de HLA del embrión.

**Fig.1**

