

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 527**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2007** **E 15150111 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017** **EP 2857840**

54 Título: **Método para predecir el éxito de implantación en fertilización asistida**

30 Prioridad:

**21.07.2006 US 832094 P**

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

**28.09.2017**

73 Titular/es:

**FEMALON S.P.R.L. (100.0%)  
Rue de Travail 16  
4460 Grâce-Hollogne, FR**

72 Inventor/es:

**LÉDÉE, NATHALIE;  
PICCINNI, MARIE-PIERRE y  
LOMBROSO, RAOUL**

74 Agente/Representante:

**CONTRERAS PÉREZ, Yahel**

**ES 2 634 527 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para predecir el éxito de implantación en fertilización asistida

- 5 La fecundación asistida, tal como la fecundación *in vitro* (FIV) o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) se han usado con éxito en pacientes humanos con problemas de infertilidad durante tres décadas. A pesar de la amplia investigación, aún es un procedimiento difícil y caro y normalmente se observa una baja tasa de implantación por embrión transferido (del 15-20%).
- 10 Los hospitales y centros privados que proporcionan un servicio de fecundación asistida basan su selección después de la fecundación del oocito en características del embrión así producido. Por ejemplo, la selección puede basarse en la morfología del embrión (Guerif F *et al.*, 2007, Hum Reprod 22 (7): 1973), o en la producción de HLA-G soluble por parte de los embriones (Fuzzi B, *et al.*, 2002, Eur J Immunol. Feb; 32 (2): 311-5). Ambas técnicas requieren interferencia con el embrión. La función del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en el ciclo menstrual humano está descrito, por ejemplo, en A. Salmassi *et al.*, Human Reproduction Vol. 20, No 9, p. 2434-2440 (2005); Salmassi A *et al.*: "Success of COH and IVF correlated with granulocyte-colony-stimulating factor", Human Reproduction (Oxford), vol. 21, no. Supl. 1, Junio 2006, página 1159; Yanagi K *et al.*: "Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein.", Human Reproduction (Oxford), vol. 17, no. 12, diciembre 2002, páginas 3046-3052; y Salmassi Ali *et al.*: "Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells.", Fertility And Sterility, vol. 81, no. Supl. 1, Marzo 2004 (2004-03), páginas 786-791. G-CSF puede jugar un papel como predictor del resultado del IVF humano. Se describen métodos de detección de G-CSF en, por ejemplo, Giavedoni L D: "Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology", Journal Of Immunological Methods, vol. 301, no. 1-2, Junio 2005, páginas 89-101, y Wang J: "Proteomic identification of inflammatory markers in cerebrospinal fluid from infectious and non - infectious human brain diseases.", Society For Neuroscience Abstract Viewer And Itinerary Planner, vol. 2003, 2003.

Para incrementar el éxito de los embarazos, el número de embriones transferidos habitualmente es más de uno. En Europa es una práctica habitual transferir dos embriones a la cavidad uterina. En Estados Unidos este número es mayor, normalmente se transfieren tres o cuatro embriones. El efecto negativo de tal política es que aumenta el número de embarazos múltiples y las subsiguientes patologías obstétricas relacionadas, tales como prematuridad y baja tasa de nacimiento principalmente.

35 Además, la fecundación asistida es un procedimiento caro y puede ser también psicológicamente traumático para un paciente. Se requieren procedimientos quirúrgicos para recoger óvulos para la fecundación asistida y después de la fecundación se requiere otra cirugía para implantar los óvulos fecundados en el útero. La receptora debe entonces esperar un periodo de tiempo antes de que se pueda determinar si el embarazo se ha establecido o no. En algunos casos, el embarazo puede no establecerse nunca a pesar de múltiples intentos y estos casos representan un gasto considerable a la sociedad, en términos tanto financieros como humanos.

Por tanto, sería deseable proporcionar un ensayo que pueda indicar el potencial para la implantación de un oocito antes de la fecundación, haciendo posible que se maximicen las probabilidades de implantación satisfactoria del embrión, y permitiendo que se usen indicaciones de tasas bajas de éxito para evitar el trauma y los costes anteriormente mencionados de la fecundación asistida.

## LEYENDAS DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Curva ROC de un experimento Luminex para detectar G-CSF LF usando un kit Luminex de Biorad. La tasa de positivo auténtico (Sensibilidad) se representa en función de la tasa de falso positivo (100-Especificidad) para distintos puntos de corte de concentración de G-CSF-LF. Cada punto en la representación ROC representa un par sensibilidad/especificidad que corresponde a un umbral de decisión específico. El área bajo la curva ROC es una medida de lo bien que G-CSF-LF puede distinguir entre dos grupos de diagnóstico principales (implantación segura / sin implantación). Línea 1: El área bajo la curva es 0,82, lo que indica que un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo positivo tiene un valor de ensayo mayor que el de un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo negativo el 82% de las veces. Línea 2: el área bajo la curva ROC es 0,5, representando la hipótesis nula.

**FIG. 2.** Curva ROC de un experimento Luminex para detectar G-CSF LF usando un kit Luminex de R and D. Línea 3: El Área bajo la curva es 0,72, lo que indica que un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo positivo tiene un valor de ensayo mayor que el de un individuo seleccionado aleatoriamente del grupo negativo un 72% de las veces. Línea 4: El Área bajo la curva ROC es 0,5 representando la hipótesis nula.

**FIG. 3.** Gráfica que muestra la variación en concentración de líquido folicular individual de una misma cohorte de embriones obtenidos de múltiples sujetos. Cada caja muestra la variación de líquidos foliculares individuales con respecto a la media en una misma cohorte de embriones generada.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

La invención se basa en un descubrimiento inesperado de los inventores de que un sujeto del sexo femenino que proporciona una pluralidad de oocitos bajo hiperestimulación ovárica exhibirá una variación en los niveles de varias citoquinas y factores de crecimiento presentes en el líquido folicular del folículo del que deriva cada oocito. Además, los inventores descubrieron que hay una fuerte correlación entre un alto nivel de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) presente en el líquido folicular del folículo individual del que deriva un oocito y un alto potencial de implantación de un embrión obtenido por fecundación de dicho oocito. Nunca se ha demostrado antes que, para el mismo sujeto, el líquido folicular que rodea cada oocito individual puede variar en composición y que dicha composición es indicativa del éxito de implantación del oocito fecundado posteriormente. Este descubrimiento permite clasificar una pluralidad de embriones obtenidos de una única paciente en orden de potencial de implantación. Por primera vez puede descubrirse que pacientes que muestran un potencial de fertilidad límite usando indicadores que hacen una media de marcadores de fertilidad de oocitos (por ejemplo 11-beta HSD) tienen posibilidades para mujeres que previamente tenían indicios de infertilidad. Además, el método ofrece la posibilidad de valorar cada oocito individualmente y por lo tanto el embrión individualmente, sin interferencia con el embrión u oocito.

En el presente documento se describe un ensayo para determinar las probabilidades de implantación de una pluralidad de embriones cada uno obtenido mediante fertilización asistida de un oocito de un sujeto del sexo femenino, que comprender medir los niveles de G-CSF en el líquido folicular presente en el folículo del cual cada oocito se deriva, y determinar las probabilidades de implantación de cada embrión a partir del nivel de G-CSF en el líquido folicular. El oocito del folículo con el nivel más elevado de G-CSF en el líquido folicular, da lugar a un embrión con las mayores probabilidades de implantación.

En el presente documento se describe un kit de ensayo que se puede usar para predecir el resultado de la fertilización asistida en una paciente femenina. Dicho ensayo y kit se pueden usar en un método de tratamiento de fertilización para mejorar la implantación.

La presente invención en particular se refiere al uso *in vitro* de un reactivo para determinar las probabilidades de implantación de oocitos antes de la fertilización mediante la medición de los niveles de FF G-CSF o del mRNA de FF G-CSF presentes en el fluido folicular (FF) de un folículo de cada oocito recogido según se describe en las reivindicaciones 1 a 9.

En el presente documento también se describe un ensayo para determinar en un sujeto del sexo femenino las posibilidades de implantación de embriones obtenidos o a ser obtenidos mediante fertilización asistida, que comprende:

- (i) medir, para una pluralidad de oocitos recogidos de dicho sujeto, el nivel de factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) en fluido folicular presente en el fluido folicular (FF) de un folículo de cada oocito recogido; y
- (ii) determinar a partir de los niveles de FF G-CSF medidos, las posibilidades de implantación de los embriones obtenidos o a ser obtenidos mediante fertilización asistida de los oocitos.

Los oocitos que tienen niveles más elevados de FF G-CSF pueden tener las mayores probabilidades de implantación.

Cada muestra de FF se puede obtener de un aspirado folicular.

Los niveles respectivos de FF G-CSF se pueden medir dentro de las 20 horas de la recogida del aspirado folicular.

Un nivel de FF-CSF igual o inferior a 20.6 pg/ml puede determinar una probabilidad baja o nula de implantación.

Un nivel de FF-CSF igual o superior a 24.0 pg/ml puede determinar una elevada probabilidad de implantación.

Los niveles respectivos de FF G-CSF se pueden medir usando un inmunoensayo.

Los niveles respectivos de FF G-CSF se pueden medir usando un ensayo competitivo o inmunométrico, tal como un ensayo RIA, IRMA, ELISA, o ELISPOT.

Los niveles respectivos de FF G-CSF se pueden medir usando un ensayo Luminex.

El ensayo Luminex puede utilizar un kit Biorad o R y D Luminex.

Los niveles respectivos de FF G-CSF se pueden medir determinando los niveles de mRNA de FF G-CSF.

Los niveles respectivos de FF G-CSF se pueden medir mediante cualquiera de resonancia por plasmón de superficie, transferencia de energía por resonancia fluorescente, transferencia de energía por resonancia bioluminiscente, fluorescencia quenching fluorescencia, polarización por fluorescencia, MS, HPLC, HPLC/SM, HPLC/MS/MS, electroforesis por capilaridad, electroforesis en gel rod or slab.

El descrito aquí es para usar en la realización del ensayo como se describe más arriba, que comprende al menos un reactivo adecuado para la detección de niveles de FF G-CSF o FF G-CSF mRNA.

10

El kit puede comprender un conjunto de patrones de FF G-CSF.

El kit puede comprender una pluralidad de puntas aspiradoras para extraer un oocito y fluido folicular de un sujeto.

15 También se describe en el presente documento un método de fertilización asistido de un sujeto del sexo femenino que comprende:

- (i) recoger una pluralidad de oocitos de dicho sujeto,
- (ii) determinar la posibilidad de implantación de un embrión derivado de cada oocito de acuerdo con el ensayo descrito más arriba,
- 20 (iii) fertilizar los oocitos correspondientes a embriones que tienen una elevada posibilidad de implantación, y
- (iv) implantar el embrión así obtenido en el sujeto del sexo femenino.

También se describe en el presente documento un método de fertilización asistida de un sujeto del sexo femenino que comprende:

- 25 (i) recoger una pluralidad de oocitos de dicho sujeto,
- (ii) determinar la posibilidad de implantación de un embrión derivado de cada oocito de acuerdo con el ensayo descrito arriba,
- (iii) fertilizar los oocitos para obtener embriones, y
- 30 (iv) implantar los embriones que tienen una posibilidad elevada de implantación.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia.

Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno, es decir, a al menos uno del objeto gramatical del artículo. Por ejemplo, “una muestra” se refiere a una muestra o más de una muestra.

40 La enumeración de intervalos numéricos por los extremos incluye todos los números enteros y, cuando sea apropiado, fracciones subsumidas dentro del intervalo (por ejemplo de 1 a 5 puede incluir 1, 2, 3, 4 cuando se refiere a, por ejemplo, un número de muestras, y también puede incluir 1,5, 2, 2,75 y 3,80, cuando se refiere a, por ejemplo, concentraciones). La enumeración de los extremos también incluye los propios valores extremos (por ejemplo de 1,0 a 5,0 incluyendo tanto 1,0 como 5,0)

45

Como se menciona en otras partes, la presente invención se refiere a un descubrimiento inesperado de los inventores de que un sujeto del sexo femenino que proporciona una pluralidad de oocitos bajo hiperestimulación ovárica presentará una variación en los niveles de varias citoquinas y factores de crecimiento presentes en el líquido folicular del folículo del que deriva cada oocito. Además, los inventores descubrieron que hay una fuerte correlación entre un nivel alto de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) presente en el líquido folicular del folículo individual del que deriva el oocito y un potencial de implantación alto de un embrión obtenido por fecundación de dicho oocito. Nunca se ha demostrado antes que, para el mismo sujeto, el líquido folicular que rodea a cada oocito individual puede variar en composición, y que dicha composición es indicativa del éxito de implantación del oocito fecundado posteriormente. Este descubrimiento permite que una pluralidad de embriones obtenidos de un único paciente se clasifiquen en orden de potencial de implantación. Por primera vez puede descubrirse que pacientes que muestran un potencial de fertilidad límite usando indicadores que hacen una media de marcadores de fertilidad de oocitos (por ejemplo, 11-beta HSD) tienen oocitos que muestran un alto potencial de implantación frente a una media global pobre; esto ofrece nuevas posibilidades para mujeres que previamente tenían indicios de infertilidad. Además, el método ofrece la posibilidad de valorar cada oocito individualmente y por lo tanto el embrión individualmente, sin interferencia con el embrión u oocito.

La presente invención se refiere así pues a un uso *in vitro* de un reactivo para predecir el resultado de la fecundación asistida en una paciente femenina. En el presente documento también se describen el ensayo y el kit para usar en

un método de tratamiento de fecundación, para mejorar la implantación. Aunque nuestra invención descrita más adelante se ha desarrollado a partir de implantación de investigación. Aunque nuestra invención descrita más adelante se ha desarrollado a partir de investigación en pacientes humanos del sexo femenino, será aplicable a cualquier hembra de mamífero y podrá usarse para aumentar el éxito de, por ejemplo, programas de cría en cautividad de especies amenazadas o cría comercial por fecundación asistida de ganado tal como vacas o caballos. Preferiblemente, el sujeto se ha sometido a pretratamiento de fertilidad (por ejemplo hiperestimulación ovárica) para aumentar el número de óvulos producidos por ciclo mensual. Fecundación asistida, como se usa en el presente documento, se refiere a métodos de fecundación *ex vivo* en los que el oocito se fecunda fuera del cuerpo femenino, tales como fecundación *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

Ahora se describe un ensayo para determinar el potencial de implantación de una pluralidad de embriones cada uno obtenido o que va a obtenerse por fecundación asistida de un oocito de un sujeto del sexo femenino, que comprende medir los niveles de G-CSF en el líquido folicular presente en el folículo del que deriva cada oocito, y determinar el potencial de implantación de cada embrión a partir del nivel de G-CSF del líquido folicular.

Ahora además se describe un ensayo para determinar para un sujeto del sexo femenino el potencial de implantación de embriones obtenidos o que van a obtenerse por fecundación asistida, que comprende:

(i) medir, para una pluralidad de oocitos recogidos de dicho sujeto, el nivel de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) del líquido folicular presente en el líquido folicular (LF) de un folículo de cada oocito recogido; y

(ii) determinar a partir de los niveles de G-CSF LF medidos, los potenciales de implantación de los embriones obtenidos o que van a obtenerse por fecundación asistida de los oocitos.

El oocito del folículo con el nivel más alto de G-CSF en el líquido folicular origina un embrión con el mayor potencial de implantación.

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citoquina generada de forma natural que pertenece a la familia del factor de crecimiento hemopoyético (Clark, *et al.*, 1987, *Science* 236 (4806):1229). Su función principal descrita es actuar sobre la proliferación, diferenciación y activación de células hematopoyéticas del linaje neutrófilo (Mielcarek *et al.*, 1996., *Blood* 87 (2): 574, Visan *et al.*, 1995, **18(5-6):423**). Producido esencialmente por células hematopoyéticas, el G-CSF también se produce por células no hematopoyéticas, tales como en el tracto reproductivo: las células de la granulosa folicular luteinizada humana (Salmassi A, *et al*, 2004. *Fertil Steril*, 81 Suppl 1:786.), células endometriales (Giacomini G, *et al*, 1995, *Hum Reprod* 10(12):3259.), decidua y placenta (Duan J.S., 1990, *Osaka City Med J* 36(2):81; Miyama M *et al.*, 1998, *Osaka City Med J.*, 44(1):85) y diversos tejidos fetales (Calhoun *et al.*, 1999. *Pediatr Res* 46(3):333). En el ovario, la proteína G-CSF y su receptor se localizaron (transferencia Western e inmunohistoquímica) principalmente en células de la granulosa del folículo y células lúteas (Salmassi, *et al.*, 2004).

El nivel de G-CSF de líquido folicular (G-CSF LF) se mide preferiblemente en el día de la recogida de los oocitos. Como sabe el experto, la aspiración folicular se guía usando sonografía transvaginal después de la anestesia local o general. Cada líquido folicular correspondiente a un folículo ovárico visualizado a través de sonografía transvaginal se aspira individualmente. La captura de cada oocito no requiere ninguna otra manipulación porque el líquido folicular, que rodea al oocito, se aspira junto con el oocito. La inspección del líquido folicular bajo el microscopio permite la identificación inmediata de la presencia del oocito. En lugar de agrupar los líquidos foliculares y los oocitos respectivos, el oocito se separa en el momento de la recogida para que se puedan medir individualmente los niveles de G-CSF LF. De acuerdo con un aspecto de la invención, el nivel de G-CSF LF se mide a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 horas de la recogida de oocitos, o dentro de un tiempo entre dos cualesquiera de los valores anteriormente mencionados. Preferiblemente, el nivel de G-CSF LF se mide en un plazo de entre 1 y 20 horas de la recogida del oocito.

El nivel de G-CSF LF asociado con un oocito puede medirse usando cualquier ensayo cuantitativo adecuado. La medición puede realizarse, por ejemplo, usando un método seleccionado entre ensayo bioquímico (por ejemplo, inmunoensayo de fase sólida o líquida), resonancia de plasmón de superficie, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, inactivación de fluorescencia y polarización de fluorescencia. Tales técnicas se conocen bien en este campo y se describen brevemente en el presente documento a continuación.

Los ensayos bioquímicos generalmente se basan en la inmovilización de un componente analito, por ejemplo, en una membrana u otro soporte sólido, y la exposición a un ligando. Después de quitar por lavado el exceso de ligando, el ligando unido se detecta mediante inmunoensayo, o usando un ligando marcado (por ejemplo, ligando radiomarcado, ligando marcado con fluorescencia, ligando marcado con partículas, etc.). También están disponibles en la técnica métodos para determinar y obtener ligandos que se unen con afinidad alta a un analito específico; véase, por ejemplo, el documento WO 89/09088 titulado "Paralog Affinity Chromatography". En un ejemplo de un

inmunoensayo, pueden inmovilizarse anticuerpos contra G-CSF en perlas magnéticas y exponerse a una muestra del líquido folicular. El G-CSF unido puede detectarse usando inmunoensayos con anticuerpos primarios y secundarios para llegar a una concentración. Habitualmente, un inmunoensayo se calibra usando un conjunto de patrones. Se describen inmunoensayos de fase sólida, por ejemplo, en el documento de Estados Unidos 4.376.110.

5 Las variaciones de los inmunoensayos dentro del alcance de la invención incluyen cualquier formato de ensayo competitivo o inmunométrico que usa anticuerpos anti-G-CSF, por ejemplo RIA (radio-inmunoensayo), ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), ELISPOT (punto de inmunoabsorción ligado a enzimas) o Luminex (inmunoensayo sándwich múltiple basado en perlas).

10 Los niveles de G-CSF LF se miden preferiblemente usando tecnología Luminex. Luminex es un método altamente sensible para medir simultáneamente los niveles de componentes específicos en un sistema. Hace uso de microesferas de fase sólida codificadas por colores (colorante) que son suficientemente pequeñas para comportarse casi como una solución en un líquido. Cada microesfera se recubre con un anticuerpo, u otro reactivo de unión a ligando específico para los componentes detectados (por ejemplo, G-CSF LF). Los componentes de la muestra se capturan y detectan en las microesferas. En un analizador, los láseres excitan los colorantes internos que identifican cada partícula microesférica, y también cualquier colorante informador capturado durante el ensayo. Se hacen muchas lecturas en cada conjunto de perlas para validar los resultados. De esta forma, se realiza un ensayo sensible múltiple que es tanto rápido como preciso. Preferiblemente, los niveles de G-CSF LF se miden usando un kit o kits fabricados por Biorad® o R and D®. En una realización preferida, el kit de Biorad® es el Kit de Ensayo del

15 Inmunoensayo de Perlas Fluorescentes de Citoquina Humana, Bio-Plex™ (Hercules, CA, Estados Unidos, 17A11127). En otra realización preferida, el kit de R and D es el kit LUH000, LUH279, LUH270, LUH271, LUH278, LUH208, LUH214, LUH215B, LUH285, LUH200, LUH280, LUH201, LUH202, LUH204, LUH205, LUH206, LUH217, LUH317, LUH210, LUH293, LUB000, LUB320, LUB294, LUB219 y/o LUB213.

25 Para los propósitos de esta invención, el término “anticuerpo”, a no ser que se especifique lo contrario, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos completos que retienen su actividad de unión a un antígeno diana. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados, por ejemplo como se describe en el documento EP-A-239400 (Winter).

30 Los anticuerpos contra G-CSF LF pueden ser anticuerpos monodonales o polidonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante tecnología de hibridoma convencional usando las proteínas o fragmentos peptídicos de los mismos, como un inmunógeno. Los anticuerpos policlonales también pueden prepararse por medios convencionales que comprenden inocular en un animal hospedador, por ejemplo una rata o un conejo, con un péptido adecuado para usar con la invención y recuperar el suero inmune.

35 Como alternativa, los niveles de G-CSF LF pueden estimarse analizando los niveles de ARNm de G-CSF LF en las células de la granulosa. Las células de la granulosa alrededor de la corona radiata pueden almacenarse en la fase de la decoronación de cada oocito y almacenarse en estabilizador de ARN (por ejemplo a 80°C) hasta el ensayo.

40 Pueden diseñarse sondas para el gen de G-CSF LF para su uso como sondas, por ejemplo para su uso en un ensayo de amplificación y/o hibridación de ácido nucleico (PCR). Los métodos y condiciones para realizar una PCR y reacciones de hibridación se conocen en la técnica, y pueden encontrarse, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition) (Joseph Sambrook, Peter MacCallum, David Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press) o podrían realizarse mediante un ensayo plex Quantigene, que está diseñado para cuantificar moléculas de ARN específicas de múltiples dianas (Panomics).

45 Un ensayo de resonancia de plasmón de superficie puede, como alternativa, usarse como un método cuantitativo para medir el nivel de G-CSF en una muestra de líquido folicular. Un anticuerpo anti-G-CSF unido a microplaca se expone a un líquido folicular y se mide la resonancia de plasmón de superficie. Las reacciones de unión se realizan usando concentraciones convencionales para llegar a los niveles de G-CSF de G-CSF en el líquido folicular.

50 También puede usarse FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) para medir el nivel de G-CSF en una muestra de líquido folicular. El G-CSF y el anticuerpo anti-G-CSF se marcan con un par complementario de fluoróforos donante y aceptor. Mientras están unidos estrechamente por la interacción G-CSF : anticuerpo anti-G-CSF, la fluorescencia emitida tras la excitación del fluoróforo donante tendrá una longitud de onda distinta a la emitida en respuesta a aquella longitud de onda de excitación a la que el G-CSF y el anticuerpo anti-G-CSF no están unidos, posibilitando la cuantificación de moléculas unidas frente a no unidas por medición de la intensidad de emisión en cada longitud de onda. Las reacciones de unión pueden compararse con un conjunto de patrones para llegar al nivel de G-CSF en el líquido folicular.

60 También puede usarse BRET (transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia) para medir el nivel de G-CSF en una muestra de líquido folicular. Un aceptor emite luz cuando está en la intermediación del donante, es decir, cuando se forma un complejo de interacción G-CSF : anticuerpo anti-G-CSF. Comparando la interacción con

un conjunto de patrones, se determina el nivel de G-CSF en el líquido folicular.

- La fluorescencia de inactivación de fluorescencia proporciona de manera similar una medida de los niveles de G-CSF. Generalmente, un descenso en fluorescencia del anticuerpo marcado anti-G-CSF es indicativo de que el G-CSF que lleva el inactivador se ha unido. Por supuesto, surgiría un efecto similar cuando un G-CSF se marca con fluorescencia y el anticuerpo anti-G-CSF lleva el inactivador. Comparando la interacción con un conjunto de patrones, se puede medir el nivel de G-CSF en una muestra de líquido folicular.
- 10 La medición de la polarización de la fluorescencia también puede determinar el nivel de G-CSF en una muestra de líquido folicular. Los complejos, tales como los formados por asociación de G-CSF con un anticuerpo anti-G-CSF fluorescente, tendrían mayores valores de polarización que el anticuerpo anti-G-CSF marcado que no está formando un complejo. Esto forma la base para determinar los niveles de G-CSF en una muestra de líquido folicular, mediciones que se realizan habitualmente de forma simultánea con un conjunto de concentraciones G-CSF patrón.
- 15 Otros métodos que pueden usarse para ensayar cuantitativamente el G-CSF en el LF incluyen espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), HPLC/MS, HPLC/MS/MS, electroforesis capilar y electroforesis en gel en plancha o en columna asociados con análisis de imagen. Tales técnicas se conocen bien en este campo como se describe, por ejemplo, en *Modern HPLC for Practicing Scientists* (Dong, M, Wiley-Interscience, Junio 2006), *Tandem Mass Spectrometry* (McLafferty F. W. John Wiley & Sons Inc, November, 1983), *Mass Spectrometry for Biotechnology* (Siuzdak, G., Academic Press, February 1996), *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis (Methods in Molecular Medicine)* (Palfrey S. M., Humana Press, Junio 1999), *Handbook of Capillary electrophoresis, Second Edition*, (Landers J. P. CRC; Diciembre 1996), *High-Resolution Electrophoresis and Immunofication: Techniques and Interpretation* (Karen, D. F. Hodder Arnold, Enero, 1994).
- 20 Una vez que los niveles de G-CSF LF se han medido en una pluralidad de oocitos de una única paciente, los resultados pueden usarse para establecer el potencial de implantación relativo de embriones obtenidos por fecundación de dichos oocitos, es decir, una jerarquía. El nivel de G-CSF LF puede usarse para determinar si todos, algunos o ninguno de los oocitos después de la fecundación establecerán implantación en un sujeto del sexo femenino que se somete a un tratamiento de fecundación asistida. Además, el nivel de G-CSF LF puede usarse para determinar si todos, algunos o ninguno de los embriones se implantarán en un sujeto del sexo femenino que se somete a tratamiento de fecundación asistida.
- 25 En nuestros estudios, hemos medido los niveles de G-CSF LF usando inmunoensayos, en particular usando tecnología Luminex de Biorad y R&D. Hemos descubierto que los embriones derivados de oocitos que tienen una concentración de CSF-LF igual o menor de 20,0 pg/ml muestran un éxito de implantación reducido o nulo. Por el contrario, los embriones derivados de oocitos que tienen una concentración de CSF-LF por encima de 24 pg/ml muestran una cierta implantación.
- 30 Los expertos en la materia se percatarán de que aunque en nuestra investigación hemos determinado un nivel "umbral" de G-CSF LF por debajo del que los embriones no se implantan (y por encima del que los pacientes tienen una probabilidad significativamente mejorada de implantación), el valor es una medida estadística y se pueden usar otras medidas y umbrales. Al poner en práctica la invención es de suma importancia conseguir consistencia de ensayo, y así cada facultativo (o equipo de fecundación asistida) individual será capaz de establecer su propio método de ensayo particular y determinar su propio nivel umbral. Esto podría establecerse realizando primero un estudio histórico en muestras de pacientes previos.
- 35 Así pues, el nivel de G-CSF LF mencionado anteriormente representa la medida que hemos usado en nuestros estudios como un límite adecuado. Sin embargo, si los niveles de G-CSF LF se midieran de cualquiera de las otras formas mencionadas anteriormente, sería conveniente realizar, usando procedimientos rutinarios, un control usando nuestro método de ensayo para determinar la relación entre nuestros resultados y los resultados de otros métodos, para hacer comparaciones directas.
- 40 De acuerdo con un aspecto de la invención, un embrión derivado de un oocito en el que un nivel de G-CSF LF en su foliculo es igual o menor que 21,6 pg/ml, 21,4 pg/ml, 21,2 pg/ml, 21,0 pg/ml, 20,8 pg/ml, 20,6 pg/ml, 20,4 pg/ml, 20,2 pg/ml, 20,0 pg/ml, 19,8 pg/ml, 19,6 pg/ml, 19,4 pg/ml, 19,2 pg/ml, 19,0 pg/ml, 18,8 pg/ml, 18,6 pg/ml, 18,4 pg/ml, 18,2 pg/ml, 18,0 pg/ml, 17,8 pg/ml, 17,6 pg/ml, 17,4 pg/ml, 17,2 pg/ml, 17,0 pg/ml, 16,8 pg/ml, 16,6 pg/ml, 16,4 pg/ml, 16,2 pg/ml, 16,0 pg/ml, 15,8 pg/ml, 15,6 pg/ml, 15,4 pg/ml, 15,2 pg/ml, 15,0 pg/ml o un nivel entre dos cualesquiera de los valores antes mencionados, se predice que tiene un bajo potencial de implantación.
- 45 Preferiblemente, un nivel de CSF-LF igual o menor que de 15,0 pg/ml a 20,0 pg/ml, más preferiblemente igual o menor que de 19,8 a 20,6 pg/ml, aún más preferiblemente menor que 20,6 pg/ml se predice que tendrá un nulo o bajo potencial de implantación. Los niveles de esta realización se consideran niveles umbral para un método de

fecundación asistida (abajo). Un bajo nivel de implantación es una probabilidad de implantación del 10%, 9%, 8% o menos.

5 Un embrión derivado de un oocito en el que un nivel de G-CSF LF en su folículo es igual o menor que 34,0 pg/ml, 33,5 pg/ml, 33,0 pg/ml, 32,5 pg/ml, 32,0 pg/ml, 31,5 pg/ml, 31,0 pg/ml, 30,5 pg/ml, 30,0 pg/ml, 29,5 pg/ml, 29,0 pg/ml, 28,5 pg/ml, 28,0 pg/ml, 27,5 pg/ml, 27,0 pg/ml, 26,5 pg/ml, 26,0 pg/ml, 25,5 pg/ml, 25,0 pg/ml, 24,5 pg/ml, 24,0 pg/ml, 23,5 pg/ml, 23,0 pg/ml, 22,5 pg/ml, 22,0 pg/ml, 21,5 pg/ml, 21,0 pg/ml, 20,5 pg/ml, 20,0 pg/ml, 19,5 pg/ml, 19,0 pg/ml, 18,5 pg/ml, 18,0 pg/ml, 17,5 pg/ml, 17,0 pg/ml, 16,5 pg/ml, 16,0 pg/ml, 15,5 pg/ml, 15,0 pg/ml o un nivel entre dos cualesquiera de los valores antes mencionados, se predice que tiene un éxito probable de implantación. Preferiblemente, un nivel de CSF-LF en el intervalo 15,0 pg/ml a 34,0 pg/ml, más preferiblemente en el intervalo 20,0 a 24,0 pg/ml se puede predecir que es de implantación probable. De implantación probable significa una mayor probabilidad de éxito que la ausencia de certeza de implantación; un potencial probable de implantación significa una probabilidad de implantación del 15% al 25%. Los niveles de esta realización se consideran niveles umbral para un método de fecundación asistida (abajo).

15 Un embrión derivado de un oocito en el que un nivel de G-CSF LF en su folículo es igual o mayor que 22,0 pg/ml, 22,1 pg/ml, 22,2 pg/ml, 22,3 pg/ml, 22,4 pg/ml, 22,5 pg/ml, 22,6 pg/ml, 22,7 pg/ml, 22,8 pg/ml, 22,9 pg/ml, 23,0 pg/ml, 23,1 pg/ml, 23,2 pg/ml, 23,3 pg/ml, 23,4 pg/ml, 23,5 pg/ml, 23,6 pg/ml, 23,7 pg/ml, 23,8 pg/ml, 23,9 pg/ml, 24,0 pg/ml, 24,1 pg/ml, 24,2 pg/ml, 24,3 pg/ml, 24,4 pg/ml, 24,5 pg/ml, 24,6 pg/ml, 24,7 pg/ml, 24,8 pg/ml, 24,9 pg/ml, 25,0 pg/ml, 25,1 pg/ml, 25,2 pg/ml, 25,3 pg/ml, 25,4 pg/ml, 25,5 pg/ml, 25,6 pg/ml, 25,7 pg/ml, 25,8 pg/ml, 25,9 pg/ml, 26,0 pg/ml, 26,1 pg/ml, 26,2 pg/ml, 26,3 pg/ml o un nivel entre dos cualesquiera de los valores antes mencionados, se puede predecir que tiene un alto potencial de implantación. Preferiblemente, un nivel de CSF-LF igual o mayor que 24,0 pg/ml, más preferiblemente mayor que 35 pg/ml se puede predecir que tiene un alto potencial de implantación. Los niveles de esta realización se consideran niveles umbral para un método de fecundación asistida (abajo). Un alto nivel de implantación es una probabilidad de implantación del 30%, 35%, 40%, 43%, 44% o más.

30 Si los niveles de G-CSF LF en tales pacientes están significativamente por debajo del nivel asociado con implantación probable o segura en todos los oocitos recogidos, entonces habría un ahorro en tiempo, dinero y estrés para el paciente que no se somete a implantación. En tales casos, será posible para el facultativo (o clínica de fecundación asistida) decidir si intentar siquiera una primera implantación o no. Por otro lado, si uno o más oocitos indican una certeza de implantación alta o completa, pueden fecundarse sólo estos oocitos e implantarse los embriones obtenidos de esta manera, ahorrándose así dinero y recursos al fecundarse sólo los oocitos con probabilidad de establecerse como embriones. Como alternativa, pueden fecundarse todos los oocitos, y sólo se implantan los embriones derivados de oocitos que indican una certeza de implantación alta o completa; esto permite una mayor probabilidad de éxito puesto que el indicio de implantación no se corresponde necesariamente con probabilidades de fecundación.

40 La presente invención aumenta significativamente la tasa de implantación mientras que disminuye el número de embriones reemplazados. También permite a un especialista hacerse más eficiente en prevenir embarazos múltiples y toda la morbilidad fetal y materna relacionada. El oocito y por tanto el embrión con el mayor potencial puede implantarse. El implante, por tanto, permite una política de transferencia de un único embrión sin disminuir la tasa global de embarazo.

45 El ensayo descrito en el presente documento puede emplearse también en un método para asistir a la fecundación de un sujeto del sexo femenino. Tal método para la fertilización asistida de un sujeto del sexo femenino puede comprender:

- 50 (i) recoger una pluralidad de oocitos de dicho sujeto,  
 (ii) determinar el nivel de G-CSF LF en el folículo de cada oocito recogido,  
 (iii) fecundar los oocitos que tienen los mayores niveles de G-CSF LF, y  
 (iv) implantar el embrión así obtenido en el sujeto del sexo femenino.

55 El número de oocitos sometidos a fecundación posterior puede ser 1, 2, 3, 4 ó 5 o más. Como alternativa, se fecundan el 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de los oocitos, teniendo dicho porcentaje los mayores niveles de G-CSF LF.

Dicho método para fertilización asistida de un sujeto del sexo femenino puede comprender:

- 60 (i) recoger una pluralidad de oocitos de dicho sujeto,  
 (ii) determinar el nivel de G-CSF LF en el folículo de cada oocito recogido,  
 (iii) fecundar los oocitos para obtener embriones, y  
 (iv) implantar los embriones derivados de oocitos que tienen los mayores niveles de G-CSF LF.

El número de embriones implantados puede ser 1, 2, 3, 4 ó 5 o más. Como alternativa, el 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de los embriones se implanta, teniendo dicho porcentaje los mayores niveles de G-CSF LF.

Dicho método para fertilización asistida de un sujeto del sexo femenino puede comprender:

- 5
- (i) recoger una pluralidad de oocitos de dicho sujeto,
  - (ii) determinar el nivel de G-CSF LF en el folículo de cada oocito recogido,
  - (iii) fecundar los oocitos para obtener embriones,
  - (iv) implantar los embriones derivados de oocitos que tienen un nivel de G-CSF LF por encima de un
- 10 umbral predeterminado.

El número de embriones implantados puede ser 1, 2, 3, 4 ó 5 o más. Como alternativa, el 50%, 40%, 30%, 20% o 10% de los embriones se implanta, teniendo dicho porcentaje los mayores niveles de G-CSF LF.

15 Dicho método para fertilización asistida de un sujeto del sexo femenino puede comprender:

- (i) recoger una pluralidad de oocitos de dicho sujeto,
- (ii) determinar el potencial de implantación de un embrión derivado de cada oocito de acuerdo con el ensayo como se define anteriormente,
- 20 (iii) fecundar los oocitos correspondientes a embriones que tienen un alto potencial de implantación, y
- (iv) implantar el embrión así obtenido en el sujeto del sexo femenino.

Dicho método para fertilización asistida de un sujeto del sexo femenino puede comprender:

- 25 (i) recoger una pluralidad de oocitos de dicho sujeto,
- (ii) determinar el potencial de implantación de un embrión derivado de cada oocito de acuerdo con en el ensayo como se define anteriormente,
  - (iii) fecundar los oocitos para obtener embriones, y
  - (iv) implantar los embriones que tienen el mayor potencial de implantación.
- 30

Las partes de la descripción anterior respecto al ensayo aplican a la parte correspondiente de la descripción del método de fertilización asistida. Los valores umbral se indican en otro lugar del presente documento. El experto entenderá que pueden estar presentes pasos intermedios tales como la congelación después de la recogida de los oocitos. Usando la presente invención, será posible para las clínicas de fecundación asistida asignar recursos más eficientemente, para que las pacientes con niveles bajos de G-CSF LF en el folículo de un oocito recuperado con poca probabilidad de quedarse embarazadas por fecundación asistida no sean tratadas.

35

Se proporcionan kits para su uso en la ejecución del ensayo descrito en el presente documento. Tales kits incluyen al menos un reactivo útil para la detección de G-CSF LF. Los reactivos adecuados incluyen anticuerpos, u otros reactivos de unión a ligando apropiados, contra G-CSF LF opcionalmente unido a un marcador. Son marcadores típicos los usados comúnmente en procedimientos de inmunoensayo, por ejemplo peroxidasa de rábano rusticano. El kit puede contener también patrones, por ejemplo cantidades predeterminadas de G-CSF LF (por ejemplo proteína o ARN) pueden marcarse con un marcador detectable. El kit también puede contener puntas de aspiración desechables para su uso en la extracción de los oocitos y el líquido folicular. El kit puede contener también puntas aspiradoras desechables para usar en la extracción de oocitos y fluido folicular.

40

45

El kit puede usarse para la medición de G-CSF LF para su uso en un método de diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de fecundación asistida de un sujeto del sexo femenino. Se describe además en el presente documento el uso de un reactivo para la detección de G-CSF LF para el pronóstico de la probabilidad de establecer un embarazo por fecundación asistida en un sujeto del sexo femenino.

50

Los anticuerpos mencionados anteriormente, fragmentos y variantes de los mismos, y otros reactivos de unión a ligando adecuados, que pueden marcarse opcionalmente con un marcador detectable, pueden usarse para la fabricación de un kit de diagnóstico para su uso en el tratamiento o diagnóstico de idoneidad para fecundación asistida.

55

Los niveles de G-CSF LF también pueden ensayarse mediante análisis de los niveles de ARNm de G-CSF LF presentes en las muestras obtenidas. Para conseguir esto, el G-CSF LF o fragmentos del mismo pueden usarse como sonda para determinar niveles de G-CSF en el líquido folicular. Como alternativa, los niveles de G-CSF LF pueden estimarse analizando los niveles de ARNm de G-CSF LF expresado en el líquido folicular o en las células de la granulosa. Las células de la granulosa alrededor de la corona radiata pueden almacenarse en la fase de decoronación de cada oocito y almacenarse en estabilizador de ARN (por ejemplo a 80°C) hasta el ensayo. Tales sondas también pueden formularse en kits de manera análoga a los descritos para anticuerpos, y pueden contener

60

ácidos nucleicos de control. Pueden diseñarse sondas para el gen de G-CSF LF para su uso como sondas, por ejemplo para su uso en un ensayo de amplificación de ácido nucleico.

## EJEMPLOS

5 Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran ciertas realizaciones de la invención.

### Ejemplo 1: Diseño experimental

10 *Pacientes*

280 pacientes del sexo femenino que presentaban infertilidad e incluidas en un programa de ICSI se reclutaron entre enero de 2005 y marzo de 2007. La razón para su inclusión en ICSI era predominantemente la infertilidad masculina, pero también fracaso previo de FIV o tasa previa de fecundación baja en FIV convencional. Procedimos a una aleatorización en el momento de inclusión para no introducir sesgos en la selección de pacientes clínicos. Cada paciente se incluyó una vez dentro del periodo de estudio. Se informó completamente a todos los pacientes y el Comité Institucional de Revisión aprobó esta investigación (Comité Consultatif de Protection des personnes Poissy-St Germain en Laye).

20 *Pretratamiento*

Las pacientes se sometieron al procedimiento clásico de hiperestimulación ovárica. Aplicamos el protocolo recomendado por su médico. La respuesta a la estimulación se controló mediante análisis de sangre en serie y evaluación ultrasónica para controlar los folículos y el crecimiento endometrial. Los criterios para desencadenar la ovulación se obtuvieron cuando al menos 5 folículos alcanzaron los 16 mm. La retirada de los oocitos tuvo lugar entre 35 y 36 horas después de desencadenar la ovulación. La aspiración de oocitos se realizó bajo anestesia general o local con ultrasonografía vaginal usando jeringas individuales de 10 ml para cada folículo del grupo estudiado. Adaptamos así el método clásico de aspiración de oocitos para individualizar el líquido folicular de cada oocito recogido.

#### *Muestras de líquido folicular*

La presencia o ausencia de un oocito en cada folículo se evaluó inmediatamente y los folículos desprovistos de un oocito se descartaron. En el grupo estudiado se recogieron muestras individuales de líquido folicular, cada una correspondiente a un oocito maduro. Se registró el volumen y el aspecto (citrino, naranja o hemático) de cada muestra de líquido folicular. Las muestras individuales de líquido folicular se centrifugaron y el sobrenadante se introdujo en alícuotas después de proceder a la anonimización de cada muestra de acuerdo con una base de datos para proporcionar un diseño ciego a los análisis posteriores. Las muestras se almacenaron inicialmente a -20°C, y después a -80°C hasta el ensayo. Toda la información clínica y biológica se registró en tiempo real en la base de datos (Medifirst).

#### *Fecundación de oocitos y cultivo de embriones hasta el día 2*

45 Se recogieron los oocitos y se retiraron las células del cumulus y la corona con hialuronidasa 80 IU (Fertipro). Se inyectaron los oocitos en una gota de 5 µl de medio de lavado (JCD), con una muestra de espermatozoides ralentizada mediante medio PVP (fertopto). Los oocitos inyectados se cultivaron aisladamente en una microgota de 40 µl de ISM1 (Medicult, Francia) bajo aceite a 37°C. El número y aspecto de los pronúcleos se evaluaron después de 20 horas de acuerdo con los criterios de Gianaroli. El día 2 se registró el número, la fragmentación y la regularidad de cada blastómero. La transferencia embrionaria se programó el día 2.

Dividimos los embriones transferidos en dos categorías para el análisis:

1. los embriones de mejor calidad definidos por 4-5 células el día 2, 8-9 el día 3 y menos de un 10% de células de fragmentación y regulares (embriones de alta calidad), o
2. cualesquiera otros patrones (embriones de baja calidad)

Sólo se analizaron los líquidos foliculares correspondientes a los embriones transferidos usando el método Luminex.

60 *Evaluación del potencial de implantación*

Cada muestra se relacionó con una probabilidad de implantación, descrita aquí como la tasa de implantación. La tasa de implantación clínica de un embrión se define para cada muestra ensayada como el número de sacos

vitelinos / número de embriones transferidos. La implantación clínica se definió a las 8 semanas de amenorrea mediante la visualización ultrasónica de un saco vitelino. Hay por tanto tres categorías principales en función del resultado:

- 5 - Sin implantación: Tasa de Implantación = 0
- Implantación segura: El número de embriones reemplazados fue igual al número de sacos vitelinos observados por ultrasonidos a las 8 semanas de amenorrea (1 embrión reemplazado y embarazo sencillo, dos embriones reemplazados y embarazo doble): Tasa de Implantación = 1
- 10 - Implantación probable, que es una probabilidad de implantación puesto que el número de sacos vitelinos es menor que el número de embriones reemplazados (por ejemplo 1 de 2, 1 de 3, 2 de 3, por lo tanto Tasa de Implantación = 0,5, 0,33, 0,66).

Para construir la curva ROC (Características Operativas del Receptor) sólo tuvimos en cuenta las dos categorías

- 15 - Sin implantación
- Implantación segura: El número de embriones reemplazados fue igual al número de sacos vitelinos observados por ultrasonidos a las 8 semanas de amenorrea (1 embrión reemplazado y embarazo sencillo, dos embriones reemplazados y embarazo doble)

20 La discriminación obtenida entre sin implantación e implantación segura en función de la concentración de G-CSF en cada muestra se evaluó con un análisis de curva ROC (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica). Se obtuvieron la sensibilidad, especificidad y el área bajo la curva (AUC) ROC para los tres métodos de detección. En una curva ROC, la tasa de positivos auténticos (sensibilidad) se traza como función de la tasa de falsos positivos (100-especificidad) para distintos puntos de corte. Cada punto de la representación ROC representa un par

25 sensibilidad/especificidad que corresponde a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones) tiene una representación ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda (100% de sensibilidad, 100% de especificidad). Por lo tanto, cuanto más cerca está la representación ROC de la esquina superior izquierda, mayor es la precisión global del ensayo (Zweig & Campbell, 1993).

30 El cálculo del AUC-ROC proporciona el valor cuantitativo de la precisión, es decir la capacidad de G-CSF para discriminar entre implantación y no implantación.

35 Sin embargo, la mayoría de los embriones que se implantan se definieron por una probabilidad de implantación. Por ejemplo, si se transfirieron dos embriones y sólo uno se implantó, cada muestra se caracteriza por una probabilidad del 50% de implantación.

Definimos así para cada método

- 40 - Umbral menor de implantación definido por un valor predictivo negativo del 100% a partir del AUC-curva ROC.
- Umbral mayor de implantación definido por el mayor valor predictivo positivo de implantación.

#### 45 *Ensayos de G-CSF realizados en las muestras de LF*

Se aplicaron consecutivamente dos métodos Luminex de detección a muestras individuales de líquido folicular de las que surgieron los embriones transferidos.

Desde enero de 2005 hasta junio de 2005

- 50 - La tecnología Luminex se aplicó con el kit Biorad (Hercules, Ca, Estados Unidos, 17A11127, citoquinas humanas, kit 27-plex).

Desde septiembre de 2005 a marzo de 2007

80 de las muestras eran comunes al Luminex Biorad previo y 120 eran nuevas muestras recogidas

- 55 - La tecnología Luminex se aplicó con el kit R and D (Minneapolis, MN, Estados Unidos, LUH000, LUH279, LUH270, LUH271, LUH278, LUH208, LUH214, LUH215B, LUH285, LUH200, LUH280, LUH201, LUH202, LUH204, LUH205, LUH206, LUH217, LUH317, LUH210, LUH293, LUB000, LUB320, LUB294, LUB219, LUB213)

60 Se realizaron análisis multivariados y univariados. Un valor de p por debajo de 0,05 se consideró significativo. La tabla 1 resume la población y el número de muestras analizadas sucesivamente usando dos de los métodos de investigación aplicados.

**TABLA 1:** Población y número de muestras analizadas sucesivamente usando dos de los métodos de investigación aplicados.

<b>Parámetro medido</b>	<b>Luminex BIORAD</b>	<b>Luminex R&amp;D</b>
Número de pacientes incluidos	71	121
Número de líquidos foliculares individuales analizados que corresponden a un embrión transferido	132	200
Tasa media de embarazo clínico	31,5%	27,3%
Tasa media de implantación	20%	18%

Se realizan evaluaciones usando los kits Luminex de Biorad® y R and D® en los ejemplos 2 y 3.

5

**Ejemplo 2: Evaluación usando el Kit Luminex fabricado por Biorad®**

Se analizaron 132 muestras de líquido folicular correspondientes a los 132 embriones transferidos posteriores con respecto a los niveles de ciertas citoquinas y quimoquinas. En particular, se evaluaron las concentraciones de IL-1beta, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IFN alfa, TNF-alfa, G-CSF, GM-CSF, VEGF, PDGF, FGF, IP-10, MCP-1, RANTES, EOTAXINA, MIP-1 alfa, MIP-1 beta usando tecnología Luminex, utilizando un Kit Luminex® Biorad®.

10

Se obtuvieron los siguientes resultados:

15

- 1) Se detectaron LIF, IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, G-CSF, VEGF, IP-10, MCP-1, Eotaxina y MIP-beta en todas las muestras de líquido folicular,
- 2) no se detectaron IL-1 beta, IL-5, IL-7, IL-17, TNF alfa y MIP-alfa en ninguna muestra de líquido folicular,
- 3) se detectaron IL-15, GM-CSF, Rantes, PDGF, IFN-gamma, IL-9, IL-2, IL-15, FGF respectivamente al 95%, 94%, 88%, 81%, 76%, 65%, 60%, 48% y 22% de las muestras de líquido folicular.

20

El G-CSF no se relacionaba con la morfología embrionaria si se compara con respecto a las dos categorías de mejor calidad de embriones frente a otras. Por tanto, no hubo correlación entre G-CSF y la calidad morfológica de los embriones (embriones transferidos de alta calidad frente a otra calidad)

25

*Citoquinas, factores de crecimiento y tasas de implantación*

Sólo una citoquina se asoció en análisis tanto univariado como multivariado con el potencial del embrión a implantar correspondiente, que fue el factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF)

30

*Los embriones se clasificaron de acuerdo con sus tasas de implantación.*

Para construir el AUC-ROC para G-CSF, tuvimos en cuenta embriones que no se implantaron (n=89) y los que presentaron implantación (n=13). La implantación segura se define cuando todos los embriones reemplazados conducen a un saco vitelino.

35

El área bajo la curva ROC fue de 0,82 [0,73-0,89] y altamente significativo (p=0,0001) (Fig. 1). Así pues, G-CSF se correlaciona con la tasa de implantación (r=0,40 p<0,0001).

También descubrimos una diferencia significativa entre embriones con implantación segura y sin implantación (p=0,0002) y entre embriones con implantación segura e implantación probable (p=0,001) (Tabla 2)

40

**TABLA 2** Correlación entre el éxito de implantación y los niveles de G-CSF LF e IL-1ra LF medidos usando un kit Luminex fabricado por Biorad

<b>Implantación</b>	<b>Número de embriones de interés</b>	<b>de G-CSF LF +/- error convencional (pg/ml)</b>	<b>IL-1ra LF +/- error convencional (pg/ml)</b>
Implantación segura	13	25,3 +/- 1	764 +/- 373
Implantación probable	30	21,6 +/- 1	225 +/- 106
Sin implantación	89	20,2 +/- 0,4	148 +/- 17

De acuerdo con el AUC-curva ROC, definimos un umbral inferior y un umbral superior para G-CSF para evaluar si la concentración de G-CSF puede usarse para evaluar para cada embrión un "potencial de implantación" para decidir el número de embriones que deberíamos reemplazar.

5

El umbral inferior se definió mediante el valor de implantación predictivo negativo más fuerte. Si G-CSF es menor que 20 pg/ml, el valor predictivo negativo es de 100% de AUC-ROC. Si G-CSF está por encima de 24, el valor predictivo positivo alcanza su máximo: 40%

10 Si todos los embriones reemplazados se evalúan de acuerdo con el nivel de G-CSF, podemos observar las diferencias subsiguientes de la tasa de implantación (Tabla 3).

**TABLA 3** Correlación entre el éxito de implantación y los niveles de G-CSF LF medidos usando un kit Luminex fabricado por Biorad;

<b>G-CSF (Luminex Biorad)</b>	<b>Número de embriones de interés</b>	<b>Tasa media de implantación</b>
<b>Bajo G-CSF</b> (menos de 20 pg/ml)	45	9%
<b>Medio G-CSF</b> (entre 20 y 24 pg/ml)	62	18%*
<b>Alto G-CSF</b> (más de 24 pg/ml)	25	44%**

\*p=0,003 entre G-CSF medio y bajo;

\*\* p<0,001 entre alto y bajo G-CSF

15

**Ejemplo 3: Evaluación de líquidos foliculares usando el Kit Luminex fabricado por R and D**

Se analizaron 200 muestras de líquido folicular correspondientes a los 200 embriones transferidos subsiguientes. Las concentraciones de las siguientes citoquinas y quimoquinas IL-1 alfa, IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IFN alfa, TNF-alfa, G-CSF, GM-CSF, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, MCP-1, VEGF, se evaluaron usando tecnología Luminex utilizando el kit hecho por R&D.

20

*Detección de citoquinas y quimoquinas*

25 Se detectaron G-CSF, IL1Ra, IL-6, IL-8, MIP-beta, RANTES, MCP-1, VEGF en el 95-100% de las muestras de líquido folicular ensayadas:

- Se detectaron IL-4, TNF-alfa, GM-CSF, IL-5 en el 75%-94% de las muestras de líquido folicular ensayadas,
- Se detectaron IL-1 alfa, IL-1 beta, IL-10, MIP alfa en el 50-74% de las muestras de líquido folicular ensayadas.

30

- Se detectaron IL-2, IFN-gamma e IL-17 en menos del 50% de las muestras de líquido folicular ensayadas.

*Citoquinas, quimoquinas y tasas de implantación*

35 Para construir el AUC-ROC para G-CSF tuvimos en cuenta embriones que no se implantaron (n=146) y los que se implantaron con certeza (n=16). El área bajo la curva ROC fue de 0,72 [0,65-0,79] y altamente significativo (p=0,0025) (**FIG. 2**)

Se observó una diferencia significativa para el G-CSF entre embriones con éxito de implantación seguro y sin implantación (p=0,01) y entre embriones con éxito de implantación probable y éxito de implantación seguro (p=0,03)

40

(**Tabla 4**)

**TABLA 4:** Correlación entre éxito de implantación y niveles de G-CSF LF medidos usando un kit Luminex fabricado por R and D.

<b>Implantación</b>	<b>Número de embriones de interés</b>	<b>G-CSF (pg/ml) +/- error convencional</b>
Implantación segura	16	28 +/- 2,3
Implantación probable	37	20,5 +/- 1,7
Sin implantación	146	20,7 +/- 0,9

Se detectó G-CSF en todos los líquidos y con variaciones convencionales bajas de una muestra a otra, lo que es un fuerte requisito para identificar un biomarcador. De acuerdo con el AUC-curva ROC, definimos un umbral inferior y un umbral superior para G-CSF para evaluar si la concentración de G-CSF puede usarse para predecir para cada embrión un “potencial de implantación” que ayudaría en la decisión del número de embriones que deberíamos reemplazar. El umbral inferior se definió por el valor predictivo negativo de implantación más fuerte. Si G-CSF es menor que 15 pg/ml, el valor predictivo fue del 100% de AUC-ROC. Si G-CSF era mayor que 34, el valor predictivo positivo alcanza su máximo del 27,8%.

Si todos los embriones reemplazados se evalúan de acuerdo con la categoría de nivel definida por el AUC-ROC de G-CSF, podemos observar las diferencias subsiguientes de la potencialidad de implantación (**TABLA 5**).

**TABLA 5** Correlación entre el éxito de implantación y los niveles de G-CSF LF medidos usando un kit Luminex fabricado por R and D;

<b>G-CSF</b>	<b>Número de embriones de interés</b>	<b>Tasa media de implantación</b>
<b>Bajo G-CSF</b> (menos de 15 pg/ml)	61	9%**
<b>Medio G-CSF</b> (entre 15 y 34 pg/ml)	117	22%**
<b>Alto G-CSF</b> (más de 35 pg/ml)	22	43,5%**
**p <0,001 entre bajo, medio y alto G-CSF		

**Ejemplo 4: La media de G-CSF en líquido folicular acumulado no refleja las variaciones observadas en líquidos foliculares individuales.**

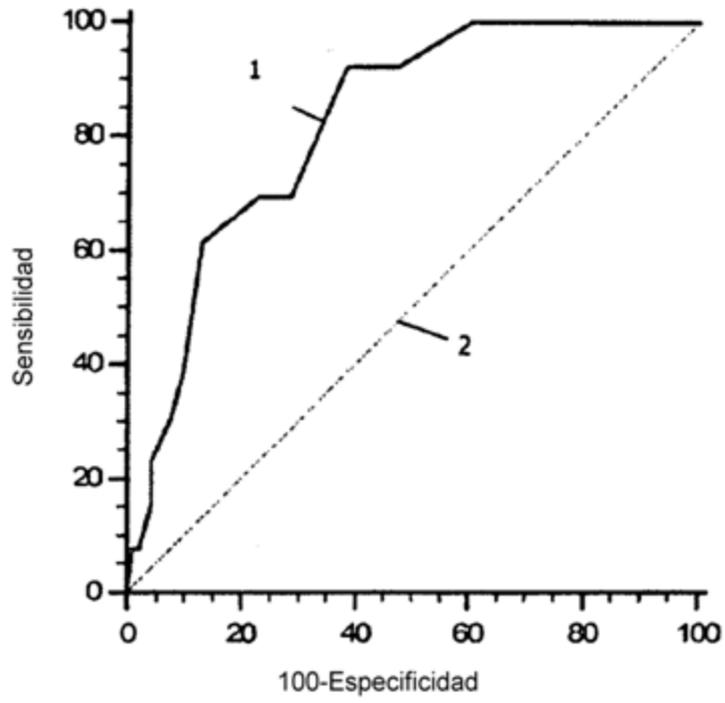
Entre 15 pacientes, todos los líquidos foliculares que conducen a un embrión independientemente de su resultado se evaluaron en la misma cohorte. Se evaluaron 76 muestras usando el kit Luminex fabricado por Biorad.

Para cada muestra, evaluamos la siguiente relación. G-CSF medio en líquido folicular acumulado menos concentración de G-CSF en LF individual (n=76).

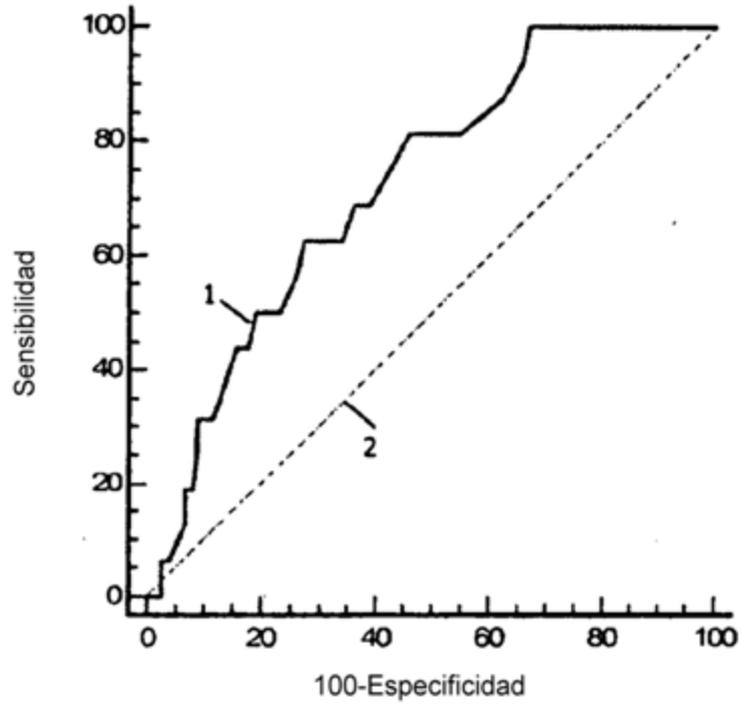
La **FIG. 3** es una gráfica que muestra la variación en concentración de líquido folicular individual de una misma cohorte de embriones obtenidos de 10 sujetos múltiples. Cada caja muestra la variación de líquidos foliculares individuales respecto de la media en una misma cohorte de embriones generados. Estas observaciones sugieren que todos los embriones generados no son iguales respecto a G-CSF LF ni por lo tanto en su potencial de implantación.

**REVINDICACIONES**

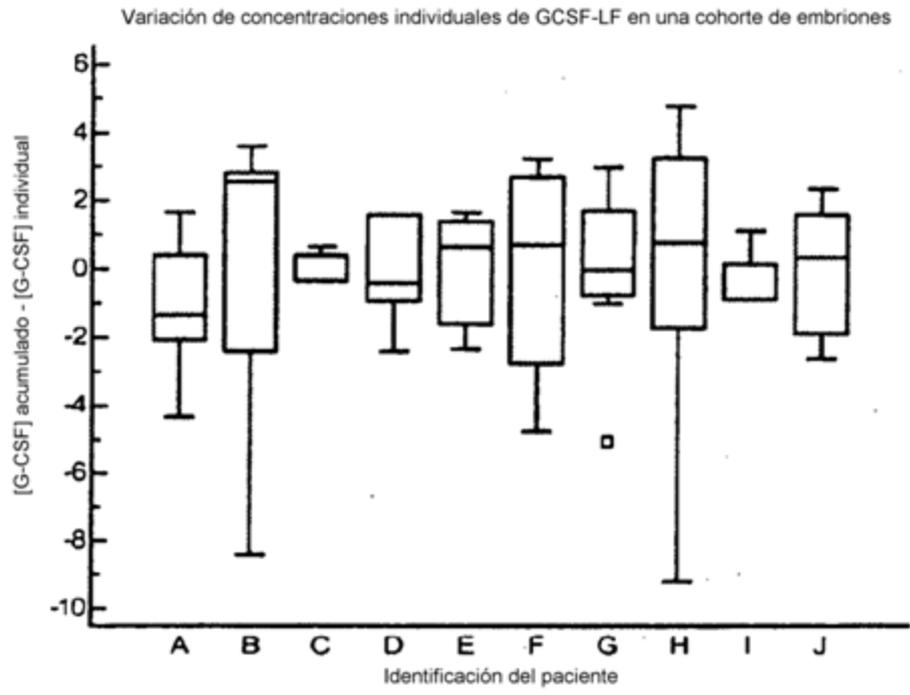
1. Uso *in vitro* de al menos un reactivo útil para detectar el factor estimulante de colonia de granulocitos del fluido folicular (FF G-CSF) o el mRNA del FF G-CSF, para determinar en un sujeto del sexo femenino las probabilidades de implantación de oocitos antes de la fertilización mediante la medición de los niveles de FF G-CSF o del mRNA de FF G-CSF presentes en el fluido folicular (FF) de un folículo de cada oocito.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los oocitos que tienen los niveles más elevados de FF G-CSF tienen las mayores probabilidades de implantación.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho reactivo incluye un anticuerpo contra FF G-CSF, opcionalmente unido a una etiqueta.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho reactivo incluye los de un kit de Biorad Luminex, o los de un kit R yD Luminex.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde dicho reactivo incluye sondas nucleicas para la detección de mRNA de FF G-CSF.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el FF de cada oocito se obtiene de un aspirado folicular.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los niveles respectivos de FF G-CSF se miden dentro de las 20 horas de la recogida del aspirado folicular.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde un nivel de FF G-CSF igual o inferior a 20.6 pg/ml determina una probabilidad baja o nula de implantación.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde un nivel de FF G-CSF igual o superior a 24.0 pg/ml determina una elevada probabilidad de implantación.



**FIG. 1**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden 5 excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

### Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 8909088 A [0039] • EP 239400 A, Winter [0041]  
 • US 4376110 A [0039]

### Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 15 • GUERIF F et al. *Hum Reprod*, 2007, vol. 22 (7), 1973 [0002]  
 • FUZZI B et al. *Eur J Immunol.*, February 2002, vol. 32 (2), 311-5 [0002]  
 20 • A. SALMASSI et al. *Human Reproduction*, 2005, vol. 20 (9), 2434-2440 [0002]  
 • SALMASSI A et al. Success of COH and IVF correlated with granulocyte-colony-stimulating factor. *Human Reproduction*, June 2006, vol. 21 (1), 1159 [0002]  
 25 • YANAGI K et al. Cyclic changes of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mRNA in the human follicle during the normal menstrual cycle and immunolocalization of G-CSF protein. *Human Reproduction*, December 2002, vol. 17 (12), 3046-3052 [0002]  
 30 • SALMASSI ALI et al. Detection of granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in human follicular luteinized granulosa cells. *Fertility And Sterility*, March 2004, vol. 81 (1), 786-791 [0002]  
 35 • GIAVEDONI L D. Simultaneous detection of multiple cytokines and chemokines from nonhuman primates using luminex technology. *Journal Of Immunological Methods*, June 2005, vol. 301 (1-2), 89-101 [0002]  
 40 • WANG J. Proteomic identification of inflammatory markers in cerebrospinal fluid from infectious and non-infectious human brain diseases. *Society For Neuroscience Abstract Viewer And Itinerary Planner*, 2003, vol. 2003 [0002]  
 45 • CLARK et al. *Science*, 1987, vol. 236 (4806), 1229 [0036]  
 • MIELCAREK et al. *Blood*, 1996, vol. 87 (2), 574 [0036]  
 • SALMASSI A et al. *Fertil Steril*, 2004, vol. 81 (1), 786 [0036]  
 • GIACOMINI G et al. *Hum Reprod*, 1995, vol. 10 (12), 3259 [0036]  
 • DUAN J.S. *Osaka City Med J*, 1990, vol. 36 (2), 81 [0036]  
 • MIYAMA M et al. *Osaka City Med J.*, 1998, vol. 44 (1), 85 [0036]  
 • CALHOUN et al. *Pediatr Res*, 1999, vol. 46 (3), 333 [0036]  
 • JOSEPH SAMBROOK ; PETER MACCALLUM ; DAVID RUSSELL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press [0043]  
 • DONG, M. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Wiley-Interscience, June 2006 [0049]  
 • MCLAFFERTY F.W. *Tandem Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons Inc, November 1983 [0049]  
 • SIUZDAK, G. *Mass Spectrometry for Biotechnology*. Academic Press, February 1996 [0049]  
 • PALFREY S. M. *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis (Methods in Molecular Medicine)*. Humana Press, June 1999 [0049]  
 • LANDERS J.P. *Handbook of Capillary Electrophoresis*. CRC, December 1996 [0049]  
 • KEREN, D. F. *High-Resolution Electrophoresis and Immunofixation: Techniques and Interpretation*. Hodder Arnold, 1994 [0049]