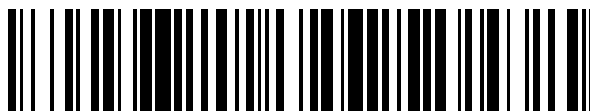


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 134**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2011 PCT/EP2011/070990**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069613**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2011 E 11794430 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2643478**

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

30 Prioridad:

24.11.2010 EP 10306293

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

11.04.2018

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR;
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL
UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (33.3%) y
UNIVERSITE DE MONTPELLIER (33.3%)**

72 Inventor/es:

**HAMAMAH, SAMIR y
ASSOU, SAID**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 663 134 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método de selección de un ovocito competente o de un embrión competente.

10 **Estado de la técnica**

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

15

La selección de embriones con mayor potencial de implantación ha sido uno de los mayores desafíos en la TRA. Esta selección se basa actualmente en criterios morfológicos tales como la tasa de crecimiento, la división precoz en el día 1, el grado de fragmentación y la formación de blastocistos (Ebner *et al.*, 2003). Sin embargo, el poder predictivo de este enfoque sigue siendo limitado. Con el surgimiento de nuevas tecnologías como Omics, existen nuevos biomarcadores como herramientas de descubrimiento que se pueden aplicar a la FIV para la selección de ovocitos y/o embriones (Hillier, 2008).

20

25

Las consideraciones legales y éticas hacen que los biomarcadores directamente dirigidos a ovocitos o embriones sean difíciles de implementarse. Por lo tanto, para evitar cualquier método invasivo, algunos estudios se han centrado en células del cumulus (CC).

30

De hecho, los enfoques transcriptómicos que usan la tecnología de micromatrices, que permite la exploración simultánea de miles de genes, se usaron intensamente para identificar en las CC los biomarcadores relacionados con la competencia de los ovocitos, lo que se define como la capacidad intrínseca de los ovocitos para sufrir la maduración meiótica, la fecundación y el desarrollo embrionario (McKenzie *et al.*, 2004; van Montfoort *et al.*, 2008).

35

Usando el mismo enfoque, los genes expresados en las CC usadas como biomarcadores asociados con la calidad embrionaria (McKenzie *et al.*, 2004; van Montfoort *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005) y el resultado de embarazo (Assou *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2010; Assou *et al.*, 2010) también han sido

40

TREFF N. R. *ET AL*: "A subset of the cumulus cell transcriptome is predictive of euploid human oocyte reproductive potential", FERTILITY AND STERILITY, vol. 94(4), 2010, páginas S34-S35, desvela que un subconjunto del transcriptoma de células del cumulus predice el potencial reproductor de un ovocito humano. Las células del cumulus de los ovocitos que produjeron embriones competentes e incompetentes se evaluaron mediante el análisis de la expresión del ARNm y miARN del todo el genoma. Además de los ARNm, se expresaron diferencialmente de manera significativa ($p < 0,01$) 2 miARN en el cumulus asociado a los ovocitos competentes.

45

DAWIT T *ET AL*: "Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach", MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, vol. 76(7), 2009, páginas 665-677, enseña que todos los microARN miR-125a, miR-127, miR-145 y miR-208 se expresaron con mayor fuerza en los ovocitos bovinos incompetentes que en los ovocitos bovinos competentes.

50

Incluso si estos estudios se dirigen al perfil de expresión génica de las CC, una fuente de células que refleja la biología y la competencia tanto de los ovocitos como de los embriones, es necesario investigar más para desarrollar un método no invasivo de predicción del resultado de la FIV más fácil de usar y con mayor fiabilidad.

55 **Objeto de la invención**

La presente invención se refiere a un método, según lo definido en la reivindicación 2, para seleccionar un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

65

La presente invención también se refiere a un método, según lo definido en la reivindicación 3, de selección de un embrión con una alta tasa de implantación que conduce al embarazo que comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea a dicho embrión, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

El método de acuerdo con la invención puede comprender una etapa adicional de medición, en una célula del cúmulo que rodea dicho ovocito o dicho embrión, del nivel de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6. Se desvela un método de selección de un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en un fluido corporal, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25.

La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de nucleótidos según lo expuesto en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Como se usa en el presente documento, la expresión "ovocito competente" se refiere a un gameto femenino u óvulo que, cuando se fecunda, es decir, tras la fecundación, produce un embrión viable con una alta tasa de implantación que conduce al embarazo.

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

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

El término "embrión" se refiere a un ovocito fecundado o cigoto. Dicha fecundación puede surgir de un protocolo clásico de fecundación *in vitro* (FIVc) o de un protocolo de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

La expresión "fecundación clásica *in vitro*" o "FIVc" se refiere a un proceso mediante el que los ovocitos son fecundados por espermatozoides fuera del organismo, *in vitro*. La FIV es un tratamiento principal en fertilidad cuando no se ha podido realizar la concepción *in vivo*.

La expresión "inyección intracitoplasmática de espermatozoides" o "ICSI" se refiere a un procedimiento de fecundación *in vitro* en el que se inyecta un solo espermatozoide directamente en un ovocito. Este procedimiento se usa habitualmente para superar factores de infertilidad masculina, aunque también puede usarse cuando los ovocitos no pueden ser penetrados fácilmente por el espermatozoide, y en ocasiones, como un método de fecundación *in vitro*, en especial, el asociado con la donación de esperma.

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

ausencia de un procedimiento o evento que finalice dicho embarazo.

Conjunto de microARN predictivos

5 Los inventores han identificado un conjunto de 42 microARN predictivos expresados en células del cumulus y 4 microARN predictivos expresados en ovocito. Los microARN son moléculas de ARN monocatenarias que regulan la expresión del ARNm mensajero y desempeñan papeles importantes en muchos procesos fisiológicos que incluyen crecimiento, diferenciación, apoptosis, ciclo celular y desarrollo (Bushati N., *et al.* 2007, "microRNA functions". *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:175-205). Los microARN maduros regulan negativamente la expresión génica dirigiéndose al
 10 ARNm mensajero específico para la escisión o la represión de la traducción. El creciente cuerpo de evidencia sugiere que participan en el control de una amplia selección de vías fisiológicas (Bartel *et al.*, 2009). Se descubrió que algunos microARN circulan en el fluido corporal. Se descubrió que estos microARN circulantes son un biomarcador de utilidad para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento, en particular, del cáncer (Kosaka N. *et al.*, 2010). También se descubrió que algunos miARN pueden transferirse de una célula a células adyacentes e inducir
 15 la inhibición dirigida de la expresión de proteínas en las células receptoras (Katakowski M. *et al.*, 2010).

La Tabla I muestra el conjunto de microARN predictivos.

Algunos microARN de la Tabla 1 son conocidos. Ellos son identificados por su nombre. Toda la información relativa
 20 a estos microARN, en particular, su secuencia, se puede encontrar en <http://www.mirbase.org>.

Otros microARN son nuevos. Se identifican por su secuencia y se asignó un número de identificación de secuencia (SEQ ID NO) a cada secuencia.

25

Tabla I: Conjunto de microARN predictivos

Nombre del microARN	Secuencia de nucleótidos de microARN (solo para los nuevos microARN)
SEQ ID NO : 6	AGAAGGAACGUCUGGAGUUUGUCUGGU
hsa-mir-103	
SEQ ID NO : 7	GUUUAUUCUAGAGAGAAUUCUUACUC
SEQ ID NO : 8	AGACUUUCGGCCUAGGAUC
hsa-mir-1826	
SEQ ID NO : 9	AGGUUCUGUCGUAUCAUUC
hsa-mir-508	
hsa-mir-16	
SEQ ID NO : 10	CGAGCCGGGCCUCCGUC
hsa-mir-182	
hsa-let-7b	
hsa-let-7c	
hsa-let-7f	
hsa-let-7a	
SEQ ID NO : 11	CGGAAAGGAGGGAAAGGGC
hsa-mir-21	
SEQ ID NO : 12	CGGGCGGAGAGUAGGCAUC
hsa-mir-1826	
hsa-mir-92a	
SEQ ID NO: 13	GUGGAGCCGGGCGUGGACU
SEQ ID NO : 14	CUCUUCGUCUGUCCUAUC
hsa-mir-30d	
hsa-mir-30a	
SEQ ID NO: 15	UCCAUCAAGAUCGGCAUC

Nombre del microARN	Secuencia de nucleótidos de microARN (solo para los nuevos microARN)
SEQ ID NO : 16	UGUGGGAAGAGGGCAUCCU
SEQ ID NO : 17	AGGAGCAAGAGGGCAUCCU
SEQ ID NO : 18	GCGAGGCACUGUGGAGAUC
SEQ ID NO : 19	AGGCAGGUGAAGGCAUCCU
SEQ ID NO : 20	UGGGAUCCCGAGGCAUCCU
SEQ ID NO : 21	GCAGAUCUCCUGGGUGGUGUGGAC
SEQ ID NO : 22	GGUAGUGUCGCGGGGGUGC (encontrado en ovocito)
SEQ ID NO : 23	AAGGACUGUGAUCAUUGAA (encontrado en ovocito)
SEQ ID NO : 24	AGCGACGUUUCAUUGAAAA (encontrado en ovocito)
SEQ ID NO : 25	GGGGGCUGUAUCAUUGACA (encontrado en ovocito)
hsa-mir-1244	
hsa-mir-320a	

Los inventores han investigado la interacción entre estos microARN y ARNm de genes identificados como biomarcadores interesantes en estudios anteriores (McKenzie *et al.*, 2004; van Montfoort *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005; Assou *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2010; Assou *et al.*, 2010; documento WO2010/118991).

5

Se encontró que los microARN de la Tabla 1 interactúan con:

- genes cuya sobreexpresión predice un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá a un embarazo o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo (grupo A),
- genes cuya sobreexpresión predice un ovocito o embrión no competente, ya que el embrión no puede implantarse (grupo B),
- genes cuya sobreexpresión predice un ovocito o embrión no competente debido a la detención embrionaria precoz (grupo C),
- genes cuya sobreexpresión se correlaciona inversamente con la calidad del embrión (grupo D),
- genes cuya sobreexpresión se correlaciona con la calidad del embrión (grupo E).

10

15

Los genes son conocidos en sí y se identifican por su símbolo. Se puede encontrar más información sobre estos genes como secuencias o nombres correspondientes al símbolo en Targetscan (<http://www.targetscan.org/>) y MiRDB (<http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>).

20

Las Tablas A, B, C, D y E muestran que el microARN depende de los genes con los que interactúan.

Algunos microARN, como hsa-let7a o hsa-mir-182, interactúan con varios genes.

25

Cada tabla corresponde a un grupo A, B, C, D y E que corresponden a cualidades específicas de ovocitos o embriones, como la capacidad de un embrión para implantarse o desarrollarse sin detención, como se ha descrito anteriormente.

30

Tabla A: microARN que interactúan con los genes del grupo A

Nombre del microARN	Gen con el que interactúa el microARN		
	Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
hsa-mir-30d	CAMTA1	activador de la transcripción de unión a la calmodulina 1	23261
hsa-mir-30a	CAMTA1	activador de la transcripción de unión a la calmodulina 1	23261
SEQ ID NO : 15	PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	5105
SEQ ID NO : 16	PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	5105
SEQ ID NO : 17	PCK1	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 1 (soluble)	5105

ES 2 663 134 T3

Nombre del microARN	Gen con el que interacciona el microARN		
	Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
SEQ ID NO : 24 (encontrado en ovocito)	SLAMF6	Miembro 6 de la familia SLAM	114836

Tabla B: microARN que interaccionan con los genes del grupo B

Nombre del microARN	Gen con el que interacciona el microARN		
	Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
hsa-mir-182	EGR3	Respuesta de crecimiento precoz 3	1960
hsa-mir-508	FOSB	Homólogo B del oncogén vírico del osteosarcoma murino FBJ	2354
SEQ ID NO : 6	FOSB	Homólogo B del oncogén vírico del osteosarcoma murino FBJ	2354
hsa-let-7a	GPC6	Glipicano 6	10082
hsa-mir-103	GPC6	Glipicano 6	10082
SEQ ID NO : 7	GPC6	Glipicano 6	10082
SEQ ID NO : 8	GPC6	Glipicano 6	10082
hsa-mir-1826	PDE5A	fosfodiesterasa 5A, específica de GMPc	8654
SEQ ID NO : 9	PDE5A	fosfodiesterasa 5A, específica de GMPc	8654
hsa-mir-508	SLC40A1	Familia de transportadores de solutos 40 (transportador regulado por el hierro), miembro 1	30061

Tabla C: microARN que interaccionan con los genes del grupo C

Nombre del microARN	Gen con el que interacciona el microARN		
	Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
hsa-mir-16	G0S2	Conmutador 2 G0/G1	50486
SEQ ID NO : 10	GRIK5	Receptor de glutamato, ionotrópico, kainato 5	2901
hsa-mir-182	IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1	3480
hsa-mir-320a	IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1	3480
hsa-let-7b	IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1	3480
hsa-let-7c	IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1	3480
hsa-let-7f	IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1	3480
hsa-let-7a	IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1	3480
SEQ ID NO : 11	IGF1R	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1	3480
hsa-mir-21	NFIB	Factor nuclear I/B	4781
hsa-mir-30d	NFIB	Factor nuclear I/B	4781
hsa-mir-30a	NFIB	Factor nuclear I/B	4781
SEQ ID NO : 12	NFIC	Factor nuclear I/C (factor de transcripción de la unión a CCAAT)	4782
SEQ ID NO : 22 (encontrado en ovocito)	NFIC	Factor nuclear I/C (factor de transcripción de la unión a CCAAT)	4782
hsa-mir-1826	RBMS 1	motivo de unión al ARN, proteína de interacción monocatenaria 1	5937

Tabla D: microARN que interaccionan con los genes del grupo D

Nombre del microARN	Gen con el que interacciona el microARN		
	Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
SEQ ID NO : 23 (encontrado en ovocito)	FAT3	Homólogo 3 del supresor del tumor FAT (<i>Drosophila</i>)	120114
hsa-mir-92a	SOX4	SRY (región Y determinante del sexo)-caja 4	6659
SEQ ID NO : 13	SOX4	SRY (región Y determinante del sexo)-caja 4	6659
SEQ ID NO : 14	SOX4	SRY (región Y determinante del sexo)-caja 4	6659

Tabla E: microARN que interacciona con los genes del grupo E

Nombre del microARN	Gen con el que interacciona el microARN		
	Símbolo del gen	Nombre del gen	ID del gen
SEQ ID NO : 20 (encontrado en ovocito)	EPOR	Receptor de la eritropoyetina	2057
SEQ ID NO : 18	LRCH4	dominio que contiene repeticiones ricas en leucina y homología a calponina (CH)	4034
SEQ ID NO : 19	NLRP1	familia NLR, que contiene dominio de pirina 1	22861
SEQ ID NO : 20	PAX8	caja 8 apareada	7849
SEQ ID NO: 21	SLC25A5	familia de transportadores de solutos 25 (transportador mitocondrial; translocalizador de nucleótidos de adenina), miembro 5	292
hsa-mir-1244	SLC5A12	familia de transportadores de solutos 5 (cotransportador de sodio/glucosa), miembro 12	159963
hsa-mir-320a	SLCO1A2	familia de transportadores de solutos, de transporte de aniones orgánicos, miembro 1A2	6579

5 Debido al papel de los microARN en la regulación génica posterior a la transcripción, los microARN de la invención están implicados en la regulación de los genes enumerados en las Tablas A, B, C, D y E y, posteriormente, en el resultado del embarazo asociado.

10 Un objeto de la invención se refiere a un método, según la reivindicación 2, de selección de un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en una célula del cúmulo que rodea dicho ovocito, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

20 La presente invención también se refiere a un método, según lo definido en la reivindicación 3, para seleccionar un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

30 Por lo general, se pueden medir el nivel de expresión de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 o 42 microARN.

En una realización, la redundancia se evita seleccionando no más de un microARN por cada gen enumerado en la Tabla A, B, C, D y E.

- En una realización, la redundancia se evita seleccionando solo uno o dos microARN por grupo A, B, C, D o E. Los métodos de la presente invención comprenden una etapa de medición del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados entre los que consisten en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.
- En otra realización, los métodos de la presente invención comprenden una etapa de medición del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-508, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-1826, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 12.
- De hecho, los inventores han demostrado que estos microARN presentan la diferencia más significativa en el nivel de expresión entre ovocitos o embriones competentes y ovocitos o embriones que no son competentes.
- En otra realización, los métodos de la presente invención comprenden una etapa de medición del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-508, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-1826, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a y hsa-mir-30d.
- De hecho, los inventores han demostrado que estos miARN interactúan con genes particularmente relevantes en la predicción de la competencia de ovocitos y embriones tales como IGF1R y NFIB. Se desvela un método de selección de un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en un fluido corporal, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25.
- Es bien sabido que los microARN pueden circular en el fluido corporal.
- Por lo tanto, Zheng *et al.* (2011) han demostrado que hsa-mir-182 está presente en el plasma y en la saliva.
- Además, Huang *et al.* (2009), Lawrie *et al.* (2008), Asaga *et al.* (2011) y Henegan *et al.* (2010) han encontrado respectivamente que hsa-mir-320a, hsa-mir-210, hsa-mir-21 y hsa-let-7a-1 son miARN circulantes.
- Gunel *et al.* (2011) han demostrado que el aumento de los niveles de hsa-mir-210 en el suero materno se puede usar en el diagnóstico prenatal no invasivo. El nivel de expresión de microARN puede medirse en sangre, orina, saliva o muestra líquida folicular.
- La muestra de sangre que se va a usar en los métodos de acuerdo con la invención puede ser una muestra de sangre entera, una muestra de suero o una muestra de plasma.
- El fluido corporal puede tomarse del donante del ovocito o del huésped del embrión.
- En una realización, los métodos de la presente invención comprenden una etapa de medición del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-182, hsa-mir-320a, hsa-mir-210, hsa-mir-21, hsa-let-7a-1.
- Los métodos de la invención pueden comprender además una etapa que consiste en comparar el nivel de expresión del microARN en la muestra con un control, en los que la detección de un diferencial en el nivel de expresión del microARN entre la muestra y el control indica si el ovocito produce, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conduce al embarazo o el embrión conducirá con una alta tasa de implantación al embarazo.
- El control para el ovocito puede consistir en una muestra que comprenda células del cumulus asociadas con un ovocito competente o un ovocito no competente, o en una muestra que comprenda células del cumulus asociadas con un embrión que dará lugar a un feto viable.
- Preferentemente, el control consiste en una muestra que comprende células del cumulus asociadas con un ovocito competente.

El control para el embrión puede consistir en una muestra que comprenda células del cumulus asociadas con un embrión que dará lugar a un feto viable o en una muestra que comprenda células del cumulus asociadas con un embrión que no dará lugar a un feto viable.

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

Los métodos de la invención pueden comprender además una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito o dicho embrión, del nivel de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que
10 consiste en ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6.

Por lo general, el método de la invención puede comprender una etapa adicional de medición del nivel de expresión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 genes seleccionados del grupo que consiste en ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5,
15 GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6.

De hecho, como se describe en el documento WO2010/18991, los inventores han identificado un conjunto de 45 genes cuya medición del nivel de expresión en células del cumulus predice un resultado de embarazo.

Después de estudios complementarios, los inventores han determinado un subconjunto de 10 genes que
20 comprenden ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6. Este subconjunto parecía ser uno de los más fiables para seleccionar un ovocito que produjera, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que condujera al embarazo en diferentes condiciones clínicas como se muestra en la Tabla F.

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

25

Tabla F: Condiciones clínicas predichas por el conjunto de genes predictivos

Preferentemente, los genes y microARN no se miden de una manera redundante, es decir, que si se selecciona un microARN, no se seleccionará el gen con el que interactúe.

30

En una realización, para evitar cualquier redundancia, el método de la invención puede comprender una etapa adicional de medición del nivel de expresión de 1 o 2 genes seleccionados del grupo B y 1 o 2 genes seleccionados del grupo C.

35 Como alternativa, dichos uno o más genes se pueden seleccionar, por ejemplo, del grupo B solo o del grupo C solo. Por lo general, se pueden seleccionar 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 genes del grupo B. Por lo general, se pueden seleccionar 1, 2 o 3 genes del grupo C.

40 La presente invención también se refiere a un método, según lo definido en la reivindicación 2, para seleccionar un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en el medio de cultivo de célula del cumulus que tiene alrededor dicho ovocito o dicho embrión, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-
45

16-2,hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.

5 Los métodos de la invención son particularmente adecuados para evaluar la eficacia de un tratamiento de fecundación *in vitro*. Por consiguiente, se desvela un método de evaluación de la eficacia de un protocolo de hiperestimulación controlada de ovarios (COS) en un sujeto hembra que comprende:

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

15 A continuación, después de dicho método, el embriólogo puede seleccionar los ovocitos que producirán, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo y fecundarlos *in vitro* a través de un protocolo clásico de fecundación *in vitro* (FIVc) o según un protocolo de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Se desvela además un método de control de la eficacia de un protocolo de hiperestimulación controlada de ovarios (COS) que comprende:

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

30 El tratamiento COS puede basarse en al menos un principio activo seleccionado entre el grupo que consiste en agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante. Se desvela un método de determinación de si un embrión es un embrión con una alta tasa de implantación que conduce al embarazo, que comprende:

- i) proporcionar un ovocito con sus células del cumulus;
ii) fecundar *in vitro* dicho ovocito;
35 iii) determinar si el embrión que resulta de la etapa ii) tiene una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo determinando mediante un método de la invención si dicho ovocito de la etapa i) es un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo.

40 Los métodos de la invención son particularmente adecuados para mejorar el resultado de embarazo de una hembra. Por consiguiente, la divulgación también se refiere a un método de mejora del resultado de embarazo de una hembra que comprende:

- i) seleccionar un embrión con una alta tasa de implantación que conduzca al embarazo mediante la realización de un método de la invención; iii) implantar el embrión seleccionado en la etapa i) en el útero de dicha hembra.

45 El método descrito anteriormente ayudará a los embriólogos a evitar la transferencia en el útero de embriones con un potencial deficiente para el embarazo.

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

55 La invención también se refiere al uso de un kit para realizar los métodos de las reivindicaciones 2-5, en el que dicho kit comprende medios de medición del nivel de expresión del microARN de la Tabla I que son indicativos de si el ovocito producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo o al embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo.

Cabe señalar que los métodos de la invención conducen a una independencia de las consideraciones morfológicas del embrión. Dos embriones pueden tener los mismos aspectos morfológicos, pero mediante un método de la invención pueden presentar una tasa de implantación diferente que conducirá al embarazo.

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

65 La presente invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de nucleótidos según lo expuesto en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO:24 y SEQ

ID NO: 25.

La presente invención también se refiere a un método para el diagnóstico de la infertilidad que comprende la etapa de medir el nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25.

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

Las Figuras 1 a 4 son diagramas que ilustran vías moleculares y agrupaciones funcionales entre microARN y genes de biomarcadores.

Estos diagramas se realizaron usando el sistema Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EE. UU.) gracias a la bibliografía publicada relacionada con los genes y los miARN mencionados anteriormente. Se cargaron los genes y los miARN mencionados anteriormente en el IPA y se superpusieron a una red molecular global desarrollada a partir de la información contenida en la aplicación. Las redes de estos miARN y genes se generaron mediante IPA en función de su conectividad (Fig. 1 a 4). La relación biológica entre dos nodos se representa como un borde (línea). Todas las líneas están apoyadas por al menos una referencia bibliográfica, libro de texto o información canónica almacenada en la base de datos de conocimientos de Ingenuity Pathways.

Ejemplo

Muestras: Se recogieron células del cumulus y ovocitos MII maduros de pacientes que consultaron sobre FIV convencional (FIVc) o ICSI (infertilidad masculina). Se retiraron células de cumulus de un ovocito maduro (MII). Los CC se separaron parcialmente mecánicamente del ovocito correspondiente como se ha descrito previamente (Assou *et al.*, 2008). Se recogieron ovocitos MII sin fecundar 21 o 44 h después de la inseminación o después de la microinyección por ICSI. Se congelaron células del cumulus y ovocitos a -80 °C en tampón RLT (Kit RNeasy, Qiagen, Valencia, CA) antes de la extracción del miARN.

Métodos de determinación del nivel de expresión del microARN:

La determinación del nivel de expresión del microARN se puede realizar mediante una variedad de técnicas conocidas en la materia.

Preferentemente, se extrajo ARN pequeño de células del cumulus y muestras maduras de ovocitos MII después del almacenamiento de muestras a -80 °C en tampón de extracción de ARN RLT complementado con 1 µM de 2-B-mercaptoetanol (M-3148, Sigma) como se describe en el protocolo del fabricante. (mini Kit MiRNeasy, Qiagen, Valencia, CA).

Se ligó el adaptador de ARN 5' (5'-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC-3' (SEQ ID NO: 1)) al conjunto de ARN con ARN ligasa de T4 (Ambion) en presencia de RNasa Out (Invitrogen) durante la noche a 25 °C. Se detuvo la reacción de ligación mediante la adición de colorante de carga de 2 x formamida. Se fraccionó el ARN ligado por tamaños en un gel de poliacrilamida con urea de TBE al 15 % y se escindió una fracción de 40-60 pares de bases. Se eluyó el ARN de la porción de gel de poliacrilamida en 600 µl de NaCl 0,3 M durante la noche a 4 °C. Se eluyó el ARN del gel y se precipitó como se ha descrito anteriormente, seguido de la resuspensión en agua tratada con DEPC.

Seguidamente, se ligó el adaptador de ARN 3' ((SEQ ID NO: 2) 5'-pUCGUAUGCCGUCUUCUGCUUGidT-3'; p, fosfato; idT, desoxitimidina invertida) al ARN precipitado con ARN ligasa de T4 (Ambion) en presencia de RNasa Out (Invitrogen) durante la noche a 25 °C. Se detuvo la reacción de ligación mediante la adición de 10 µl de 2 x colorante de carga de formamida. Se fraccionó el ARN ligado por tamaños en un gel de poliacrilamida con urea de TBE al 10 % y se escindió una fracción de 60-100 pares de bases. Se eluyó el ARN del gel de poliacrilamida y se precipitó del gel como se ha descrito anteriormente, y se volvió a suspender en 5,0 µl de agua con DEPC. El ARN se convirtió en ADNc monocatenario usando la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen) y el cebador RT de ARN pequeño de Illumina (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGA-3' (SEQ ID NO: 3)) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó el ADNc resultante por PCR con ADN polimerasa de Hotstart Phusion (NEB) en 15 ciclos usando el conjunto de cebadores de ARN pequeño de Illumina (5'-CAAGCAGAAGACG GCATACGA-3' (SEQ ID NO: 4); 5'-AATGATACGGCGACCACCGA-3' (SEQ ID NO: 5)).

Se purificaron los productos de PCR en un gel de poliacrilamida con urea de TBE al 12 % y se eluyeron en tampón de elución (5: 1, LoTE: acetato de amonio 7,5 M) durante la noche a 4 °C. Se pasó la suspensión de gel resultante a través de un filtro Spin-X (Corning) y se precipitó mediante la adición de 1.100 µl de etanol, 133 µl de acetato de amonio 7,5 M y 3 µl de glucógeno de mejillón (20 mg/ml de Invitrogen). Tras lavar con etanol al 75 %, se dejó secar el sedimento al aire a 25 °C y se disolvió en tampón de EB (Qiagen) mediante incubación a 4 °C durante 10 min. Los

productos de PCR purificados se cuantificaron en el chip Agilent DNA 1000 y se diluyeron a 10 nM para la secuenciación en Illumina 1G.

Anotación de ARN pequeños

5 Se recortaron todas las lecturas a 30 nt para reducir el número de secuencias únicas. Se contaron las apariciones de cada secuencia única leída y se usaron solo las secuencias únicas para un análisis posterior. Se cartografiaron todos los marcadores de secuencia en el genoma de referencia humano usando el programa SOAP siguiendo el procedimiento del servidor web mirTools (Zhu EL, Zhao FQ, *et al.*, NAR 2010). Seguidamente, también se alinean estos marcadores de secuencia única frente a miRBase (Griffiths-Jones, S *et al.* NAR 2008), Rfam (Griffiths-Jones, S *et al.*, NAR 2005), base de datos repetida producida por RepeatMasker (Tarailo-Graovac, M. y Chen, N. (2009) *Curr. Protoc. Bioinform.*, Capítulo 4, Unidad 4. 108) y los genes codificantes del genoma de referencia. De esta forma, los marcadores de secuencia única pueden clasificarse en las siguientes categorías: microARN conocidos, fragmentos de degradación de ARN no codificante, repeticiones genómicas y ARNm. En caso de conflicto, se realiza una jerarquía para asignar el marcador a una categoría única, que comienza con ARN no codificante, luego microARN conocido y seguido de ARN y ARNm asociados repetidos. Las secuencias que no se asignan a ninguna de estas anotaciones, pero que se pueden asignar al genoma de referencia se clasifican como "sin clasificar".

20 Se realizó una predicción de dianas de microARN usando datos conocidos de microARN y TargetScan (versión 4.0) que proporciona dianas predichas para microARN conocidos (<http://www.targetscan.org/>).

Detección de la expresión diferencial

25 Para comparar el microARN expresado diferencialmente entre múltiples muestras, se normaliza el recuento de lecturas de cada microARN identificado con respecto al número total de recuentos de lectura de microARN que se hacen coincidir con el genoma de referencia de cada muestra. La significación estadística (valor p) se deduce basándose en un método bayesiano (Audic, S. y Claverie, J. M. (1997) *Genome Res.*), que se desarrolló para analizar los perfiles de expresión genética digitales y podría explicar la variabilidad del muestreo de los marcadores con recuentos bajos. Por defecto, se considerará que un microARN específico se expresa significativamente de forma diferencial cuando el valor de p dado por este método es de 0,01 y hay al menos un cambio del doble en los recuentos de secuencia normalizados.

Predicción de nuevos microARN

35 Las secuencias que no se incluyen en las categorías de anotación anteriores, pero que coinciden en el genoma de referencia, se usan para detectar nuevos genes de microARN candidatos. Por defecto, se extraen 100 nucleótidos de la secuencia genómica que flanquea cada lado de estas secuencias y se predicen sus estructuras secundarias de ARN usando ARN plegado (Hofacker J. L. NAR 2003). Los nuevos microARN se identifican plegando la secuencia genómica flanqueante usando el programa miRDeep.

40

Métodos de determinación del nivel de expresión de los genes:

45 La determinación del nivel de expresión de genes como ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 o WNT6 puede realizarse mediante una variedad de técnicas. En general, el nivel de expresión como se determina es un nivel de expresión relativa.

Algunos de estos métodos están bien descritos en el documento WO2010/118991.

Resultados

50

El análisis del nivel de expresión de microARN en CC ha permitido identificar biomarcadores de microARN candidatos.

MicroARN conocidos

55

Los microARN conocidos del grupo de CC se enumeran en la Tabla G.

Tabla G: Conjunto de microARN predictivos conocidos

microARN	Longitud	Inicio .. Fin	Ubicación	Valor e
hsa-mir-1974	26	1..26	45..70	2,00E-10
hsa-let-7b	18	1..18	6..23	7,00E-06
hsa-mir-1244	22	1..22	57..78	4,00E-08
hsa-mir-30d	24	1..24	6..29	3,00E-09

microARN	Longitud	Inicio .. Fin	Ubicación	Valor e
hsa-mir-182	19	1..19	28..46	2,00E-06
hsa-mir-146b	24	1..24	9..32	3,00E-09
hsa-let-7c	19	1..19	11..29	2,00E-06
hsa-mir-92a-2	22	1..22	48..69	4,00E-08
hsa-mir-92a-1	22	1..22	48..69	4,00E-08
hsa-mir-886	25	1..25	15..39	7,00E-10
hsa-mir-508	22	1..22	61..82	4,00E-08
hsa-mir-320a	18	1..18	52..69	7,00E-06
hsa-mir-30a	24	1..24	6..29	3,00E-09
hsa-mir-210	19	1..19	66..84	2,00E-06
hsa-mir-21	22	1..22	9..30	4,00E-08
hsa-mir-1979	24	1..24	6..29	3,00E-09
hsa-mir-1826	24	1..24	1..24	3,00E-09
hsa-mir-16-2	19	1..19	10..28	2,00E-06
hsa-mir-16-1	19	1..19	14..32	2,00E-06
hsa-mir-125a	24	1..24	15..38	3,00E-09
hsa-mir-103-2	22	1..22	48..69	4,00E-08
hsa-mir-103-1	22	1..22	48..69	4,00E-08
hsa-let-7a-3	20	1..20	4..23	5,00E-07
hsa-let-7a-2	20	1..20	5..24	5,00E-07
hsa-let-7a-1	20	1..20	6..25	5,00E-07
hsa-let-7f	22	1..22	7..28	4,00E-07

Los inventores han estudiado la interacción entre estos microARN y ARNm de genes identificados como posibles biomarcadores usando TargetScan (documento WO2010/118991, Assou *et al.*, 2008; Assou *et al.* 2010).

- 5 TargetScan predice dianas biológicas de miARN buscando la presencia de sitios 8mer y 7mer conservados que coincidan con la región de base de cada miARN (Lewis *et al.*, 2005). Como opción, también se predicen sitios no conservados. También se identificaron sitios con emparejamientos erróneos en la región de base que se compensan con el emparejamiento 3' conservado (Friedman *et al.*, 2009). En los mamíferos, las predicciones se clasifican en función de la eficacia prevista de la dirección calculada usando las puntuaciones de contexto de los sitios (Grimson *et al.*, 2007). TargetScanHuman considera las coincidencias con UTR humanas anotadas y sus ortólogos, según lo definido por las alineaciones del genoma entero de UCSC. La dirección conservada también se ha detectado dentro de marcos de lectura abiertos (ORF). También se han usado otras bases de datos como MiRDB (<http://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi>) e Ingenuity (IPA).
- 10
- 15 Algunas de estas interacciones se ilustran en las Figuras 1 a 4.

Nuevos biomarcadores de microARN

- 20 Los inventores han identificado nuevos microARN entre las secuencias no clasificadas en sus bibliotecas. Después de la anotación, 5.165 de las secuencias de microARN de la biblioteca de CC permanecieron sin clasificar, porque derivaban de regiones no anotadas del genoma humano. Se identificaron nuevos microARN. Estos microARN regulan la expresión de 7 biomarcadores génicos tales como: (PCK1 (3 microARN : SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16 ; SEQ ID NO: 17); GPC6 (2 microARN :SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8); SOX4 (2 microARN: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14); SLC25A5 (1 microARN : SEQ ID NO : 21); NFIC (1 microARN : SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 22); IGF1R (1
- 25 microARN : SEQ ID NO:11); GIRK5 (1 microARN: SEQ ID NO: 10)).

Interacciones de microARN y genes identificados como biomarcadores interesantes

Los inventores han investigado la interacción entre estos microARN y ARNm de genes identificados como biomarcadores interesantes en estudios anteriores (McKenzie *et al.*, 2004; van Montfoort *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005; Assou *et al.*, 2008; Hamel *et al.*, 2008 ; Hamel *et al.*, 2010; Assou *et al.* 2010; documento WO2010/118991).

Se sabe que los miARN son reguladores posteriores a la transcripción que se unen a secuencias complementarias en transcripciones de ARN mensajero diana (ARNm), que, en general, producen la represión de la traducción o la degradación de la diana y el silenciamiento génico (Bartel et DP (2009)).

Por lo tanto, sin estar sujetos a la teoría, la subexpresión de la mayoría de los microARN que interactúan con un gen cuya sobreexpresión predice un ovocito competente o un embrión competente predice un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo.

De la misma manera, la subexpresión de la mayoría de los microARN que interactúan con un gen cuya sobreexpresión predice un ovocito o un embrión que no es competente predice un ovocito o un embrión que no es competente.

Por ejemplo, SEQ ID NO: 23, hsa-mir-92a, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14 interactúan con los genes del grupo D. Por lo tanto, su subexpresión puede predecir un embrión de mala calidad.

Por el contrario, la sobreexpresión de la mayoría de los microARN que interactúan con un gen cuya subexpresión predice un ovocito competente o un embrión competente predice un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo.

Por extensión, la sobreexpresión de la mayoría de los miARN que interactúan con un gen cuya sobreexpresión predice un embrión incapaz de implantarse, la detención embrionaria precoz o un embrión de mala calidad predice un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo.

Por ejemplo, la sobreexpresión de los miARN que interactúan con genes de los grupos B, C y D puede predecir un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo o un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo cuando se subexprese.

Conclusión

El análisis de la expresión de genes CC y microARN comienza a ser una herramienta valiosa para mejorar la selección de embriones, ya sea para el reemplazo de embriones frescos o para la congelación. De acuerdo con los presentes datos preliminares, no existe relación entre el perfil de expresión génica de las CC y los aspectos morfológicos del embrión. Es hora de reconsiderar la noción de que los embriones que presentan un grado bajo de acuerdo con los aspectos morfológicos pueden lograr el embarazo. De hecho, durante la última década, la disponibilidad de plataformas técnicas, la secuenciación de bibliotecas de ARN pequeños y las micromatrices de genomas enteros ha generado rápidamente datos sobre los mecanismos moleculares del complejo de CC-ovocito. Hoy en día, estas tecnologías proporcionan posibles biomarcadores predictivos como herramientas no invasivas para aplicaciones clínicas. Finalmente, este concepto revela el potencial del microARN de CC para servir como biomarcadores moleculares para la selección de embriones.

Referencias

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano A. E., Hoon D. S.. (2011) "Direct serum assay for microARN-21 concentrations in early and advanced breast cancer". *Clin Chem.*, enero de 2011; 57(1):84-91. Epub, 29 de octubre de 2010.

Assou, S., Anahory, T., Pantesco, V., Le Carrouer, T., Pellestor, F., Klein, B., Reyftmann, L., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S. (2006) "The human cumulus--oocyte complex gene-expression profile". *Hum Reprod*, 21, 1705-19.

Assou S., Haouzi D., Mahmoud K., Aouacheria A., Guillemin Y., Pantesco V., Reme T., Dechaud H., De vos J., Hamamah S. (2008) "A non invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells : a proof of concept study". *Molecular human reproduction*, Vol. 14, n.º 12 pág. 711-719, diciembre de 2008.

Balaban, B., Urman, B. (2006) "Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation". *Reprod Biomed Online*, 12, 608-15.

- Bartel et DP. 2009. "MicroRNAs: genomics, biogenesis mechanism and function". *Cell*, 136:215-233.
- Brison, D. R., Houghton, F. D., Falconer, D., Roberts, S. A., Hawkhead, J., Humpherson, P. G., Lieberman, B. A., Leese, H. J. (2004) "Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover". *Hum Reprod*, 19, 2319-24.
- 5 Bromer, J. G., Seli, E. (2008) "Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics". *Curr Opin Obstet Gynecol*, 20, 234-41.
- Courtois, G., Smahi, A. (2006) "NF-kappaB-related genetic diseases. Cell Death Differ", 13, 843-51.
- de Hoon, M. J., Imoto, S., Nolan, J., Miyano, S. (2004) "Open source clustering software". *Bioinformatics*, 20, 1453-4.
- 10 Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G., (2003) "Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behavior". *Hum Reprod*. Noviembre de 2003; 18(11):2406-12.
- Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., Botstein, D. (1998) "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 95, 14863-8.
- 15 Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A.P., Herbert, M. (2002) "Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*". *Hum Reprod*, 17, 407-12.
- Feuerstein, P., Cadoret, V., Dalbies-Tran, R., Guerif, F., Bidault, R., Royere, D. (2007) "Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence". *Hum Reprod*, 22, 3069-77.
- Fourar M., Haouzi D., Aouacheria A., Dechaud h., Bendhaou k., Hamamah S. (2008) "Gene expression profiles of human cumulus cells and pregnancy outcome: identification of molecular biomarkers of embryo competence, Fertility and Sterility", vol. 90, 1 de septiembre de 2008, pág. S72, Sumario.
- 20 Robin C. Friedman, Kyle Kai-How Farh, Christopher B. Burge, David P. Bartel. "Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of MicroRNAs Genome Research", 19:92-105 (2009).
- Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J., Schoolcraft, W. B. (2001) "Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential". *Fertil Steril*, 76, 1175-80.
- 25 Gasca, S., Pellestor, F., Assou, S., Loup, V., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J., Hamamah, S. (2007) "Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach". *Reprod Biomed Online*, 14, 175-83.
- Andrew Grimson, Kyle Kai-How Farh, Wendy K Johnston, Philip Garrett-Engele, Lee P Lim, David P Bartel. "MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing Molecular Cell", 27:91-105 (2007)
- 30 Hamel, M., Dufort, I., Robert, C., Gravel, C., Leveille, M.C., Leader, A., Sirard, M.A. (2008) "Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes". *Hum Reprod*, 23, 1118-27.
- Haouzi, D., De Vos, J., Loup, V., Assou, S., Gasca, S., Reyftmann, L., Klein, B., Hamamah, S. (2008) ["Oocyte and embryo quality: Do the apoptotic markers have a place in the preimplantation genetic diagnostic?"]. *Gynecol Obstet Fertil*, 36, 730-742.
- 35 He, B., Chadburn, A., Jou, E., Schattner, E. J., Knowles, D. M., Cerutti, A. (2004) "Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLYS and APRIL". *J Immunol*, 172, 3268-79.
- Hamel M., Dufort I., Robert C., Léveillé M. C., Leader A., Sirard M. A. (2010), "Identification of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF: new evidence for the involvement of luteinization process"; *Mol Hum Reprod*. Agosto 2010; 16(8):548-56. Epub 7 de Julio de 2010.
- 40 Heneghan H. M, Miller N., Lowery A. J., Sweeney K. J., Newell J., Kerin M. J. (2010) "Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer". *Ann Surg*. Marzo de 2010; 251(3):499-505.
- Hillier S. G., (2008) "Research challenge: what is the best non-invasive test of oocyte/embryo competence?"; *Mol Hum Reprod*. Diciembre de 2008; 14(12):665. Epub 20 de noviembre de 2008.
- 45 Huang Z., Huang D., Ni S., Peng Z., Sheng W., Du X. (2010) "Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer". *Int J Cancer*. 1 de julio de 2010; 127(1):118-26.
- Katakowski M., Buller B., Wang X., Rogers T., Chopp M., (2010) "Functional microARN is transferred between glioma cells". *Cancer Res*. 1 de noviembre de 2010; 70(21):8259-63. Epub 14 de septiembre de 2010.
- 50 Kolena, J., Kiss, A., Channing, C. P. (1983) "Purification of porcine granulosa cells by continuous Percoll gradient". *Experientia*, 39, 908-9.
- Kosaka N., Iguchi H., Ochiya T. (2010) "Circulating microARN in body fluid: a new potential biomarker for cancerdiagnosis and prognosis", *Cancer Sci*. octubre de 2010. 101(10):2087-92.
- 55 Kovalevsky, G., Patrizio, P. (2005) "High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States". *Fertil Steril*, 84, 325-30.
- La Sala, G. B., Nicoli, A., Villani, M. T., Di Girolamo, R., Capodanno, F., Blickstein, I. (2008) "The effect of selecting oocytes for insemination and transferring all resultant embryos without selection on outcomes of assisted reproduction". *Fertil Steril*.
- 60 Lawrie C. H., Gal S., Dunlop H. M., Pushkaran B., Liggins A. P., Pulford K., Banham A. H., Pezzella F., Boulwood J., Wainscoat J. S., Hatton C. S., Harris A. L. (2008) "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma". *Br J Haematol*. Mayo de 2008; 141(5):672-5. Epub 3 de marzo de 2008.
- Lee, K. S., Joo, B. S., Na, Y. J., Yoon, M. S., Choi, O. H., Kim, W. W. (2001) "Cumulus cells apoptosis as an indicator to predict the quality of oocytes and the outcome of IVF-ET". *J Assist Reprod Genet*, 18, 490-8.
- 65 Benjamin P. Lewis, Christopher B. Burge, David P. Bartel. "Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets Cell", 120:15-20 (2005).

- Lundin, K., Bergh, C., Hardarson, T. (2001) "Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF". *Hum Reprod*, 16, 2652-7.
- McKenzie, L. J., Pangas, S. A., Carson, S. A., Kovanci, E., Cisneros, P., Buster, J. E., Amato, P., Matzuk, M. M. (2004) "Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF". *Hum Reprod*, 19, 2869-74.
- 5 Pearson, H. (2006) "Safer embryo tests could boost IVF pregnancy rates". *Nature*, 444, 12-3.
- Perlman, S., Bouquin, T., van den Hazel, B., Jensen, T. H., Schambye, H. T., Knudsen, S., Okkels, J. S. (2006) "Transcriptome analysis of FSH and FSH variant stimulation in granulosa cells from IVM patients reveals novel regulated genes. *Mol Hum Reprod*, 12, 135-44.
- 10 Reddy, U. M., Wapner, R. J., Rebar, R. W., Tasca, R. J. (2007) Infertility, assisted reproductive technology and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development workshop". *Obstet Gynecol*, 109, 967-77.
- Reme, T., Hose, D., De Vos, J., Vassal, A., Poulain, P. O., Pantesco, V., Goldschmidt, H., Klein, B. (2008) "A new method for class prediction based on signed-rank algorithms applied to Affymetrix microarray experiments". *BMC Bioinformatics*, 9, 16.
- 15 Sakkas, D., Gardner, D. K. (2005) "Noninvasive methods to assess embryo quality". *Curr Opin Obstet Gynecol*, 17, 283-8.
- Sasson, R., Dantes, A., Tajima, K., Amsterdam, A. (2003) "Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action". *Faseb J*, 17, 1256-66.
- 20 Sasson, R., Rimon, E., Dantes, A., Cohen, T., Shinder, V., Land-Bracha, A., Amsterdam, A. (2004) "Gonadotrophin-induced gene regulation in human granulosa cells obtained from IVF patients. Modulation of steroidogenic genes, cytoskeletal genes and genes coding for apoptotic signalling and protein kinases". *Mol Hum Reprod*, 10, 299-311.
- Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B. (2000) "The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation". *Hum Reprod*, 15, 2394-403.
- 25 Seli, E., Sakkas, D., Scott, R., Kwok, S. C., Rosendahl, S. M., Burns, D. H. (2007) "Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization". *Fertil Steril*, 88, 1350-7.
- Steele-Perkins, G., Plachez, C., Butz, K. G., Yang, G., Bachurski, C. J., Kinsman, S. L., Litwack, E. D., Richards, L. J., Gronostajski, R. M. (2005) "The transcription factor gene Nfib is essential for both lung maturation and brain development". *Mol Cell Biol*, 25, 685-98.
- 30 Stein, J. V., Lopez-Fraga, M., Elustondo, F. A., Carvalho-Pinto, C. E., Rodriguez, D., Gomez-Caro, R., De Jong, J., Martinez, A. C., Medema, J. P., Hahne, M. (2002) "APRIL modulates B and T cell immunity". *J Clin Invest*, 109, 1587-98.
- 35 Su, Y. Q., Sugiura, K., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Affourtit, J. P., Pangas, S. A., Matzuk, M. M., Eppig, J. J. (2008) "Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells". *Development*, 135, 111-21.
- Sugiura, K., Su, Y.Q., Diaz, F. J., Pangas, S. A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Matzuk, M. M., Shimasaki, S., Eppig, J. J. (2007) "Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells". *Development*, 134, 2593-603.
- 40 Tusher, V. G., Tibshirani, R., Chu, G. (2001) "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response". *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 98, 5116-21.
- Van Montfoort, A. P., Dumoulin, J. C., Kester, A. D., Evers, J. L. (2004) "Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers". *Hum Reprod*, 19, 2103-8.
- 45 van Montfoort, A. P., Geraedts, J. P., Dumoulin, J. C., Stassen, A. P., Evers, J. L., Ayoubi, T. A. (2008) "Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis". *Mol Hum Reprod*, 14, 157-68.
- Yang, W. J., Hwu, Y. M., Lee, R. K., Li, S. H., Lin, S. Y., Fleming, S. (2007) "Early cleavage does not predict treatment outcome following the use of GnRH antagonists in women older than 35". *Fertil Steril*, 88, 1573-8.
- 50 Zhang, X., Jafari, N., Barnes, R. B., Confino, E., Milad, M., Kazer, R. R. (2005) "Studies of gene expression in human cumulus cells indicate pentraxin 3 as a possible marker for oocyte quality". *Fertil Steril*, 83 Supl 1, 1169-79.
- Zheng D, Haddadin S, Wang Y, Gu L. Q., Perry M. C., Freter C. E., Wang M. X.. (2011) "Plasma microARNs as novel biomarkers for early detection of lung cancer". *Int J Clin Exp Pathol*. 15 de agosto de 2011; 4(6):575-86. Epub 8 de agosto de 2011.
- 55 Zhu, X. M., Zhu, Y. M., Xu, C. M., Qian, Y. L., Jin, F., Huang, H. F. (2007) "Autologous mature follicular fluid: its role in in vitro maturation of human cumulus-removed oocytes". *Fertil Steril*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSERM

5 <120> MÉTODOS DE SELECCIÓN DE OVOCITOS COMPETENTES Y EMBRIONES COMPETENTES CON ALTO POTENCIAL PARA UN RESULTADO DE EMBARAZO

<130> BIO 10503 HamamaH

10 <160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1
<211> 26
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> adaptador

<400> 1
guucagaguu cuacaguccg acgauc 26

25 <210> 2
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> adaptador

<400> 2
ucguaugccg ucuucugcuu gu 22

35 <210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

<400> 3
caagcagaag acggcatacg a 21

45 <210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador

55 <400> 4
caagcagaag acggcatacg a 21

60 <210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
 aatgatacgg cgaccaccga 20
 <210> 6
 <211> 28
 5 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6
 agaaggaacg ucuggaguuu gugcuggu 28
 10 <210> 7
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 7
 guuuauucua gagagaauuc uuacuc 26
 <210> 8
 20 <211> 19
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8
 25 agacuuucgg ccuaggauc 19
 <210> 9
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9
 agguucuguc guaucaauc 19
 35 <210> 10
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40 <400> 10
 cgagccgggc ccuuccguc 19
 <210> 11
 <211> 19
 45 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 cggaaaggag ggaaagggc 19
 50 <210> 12
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 12
 cgggcggaga guaggcauc 19
 <210> 13
 60 <211> 19
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

	<400> 13 guggagccgg gcguggacu	19
5	<210> 14 <211> 19 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 14 cucuucgucu gucccauc	19
15	<210> 15 <211> 19 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 15 uccaucaaag aucggcauc	19
20	<210> 16 <211> 19 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 16 ugugggaaga gggcauccu	19
30	<210> 17 <211> 19 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 17 aggagcaaga gggcauccu	19
40	<210> 18 <211> 19 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 18 gcgaggcacu guggagauc	19
45	<210> 19 <211> 19 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 19 aggcagguga aggcauccu	19
55	<210> 20 <211> 19 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 20 ugggaucgagg aggcauccu	19
60	<210> 21 <211> 25 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 663 134 T3

	<400> 21		
	gcagaucuuc cuggguggug uggac	25	
5	<210> 22		
	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
10	<400> 22		
	gguagugucg cgggggugc	19	
	<210> 23		
	<211> 19		
15	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 23		
	aaggacugug aucauugaa	19	
20	<210> 24		
	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
25	<400> 24		
	agcgacguuu cauugaaaa	19	
	<210> 25		
30	<211> 19		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 25		
35	gggggcugua ucauugaca	19	

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que consiste en la secuencia de nucleótidos según lo expuesto en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25.
2. Un método *in vitro* de selección de un ovocito que producirá, tras la fecundación, un embrión viable con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea a dicho ovocito, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsalet-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsa-let-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsamir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsa-mir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsamir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsa-mir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, en el que dichos al menos 5 microARN comprenden al menos un microARN seleccionado de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.
3. Un método *in vitro* de selección de un embrión con una alta tasa de implantación que conducirá al embarazo, que comprende una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea a dicho embrión, del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados del grupo que consiste en hsa-mir-103-1, hsa-mir-103-2, hsa-mir-1826, hsa-let-7a-1, hsa-let-7a-2, hsa-let-7a-3, hsalet-7b, hsa-let-7c, hsa-let-7f, hsa-mir-1244, hsa-mir-182, hsa-mir-21, hsa-mir-30a, hsa-mir-30d, hsa-mir-320a, hsamir-508, hsa-mir-92a-1, hsa-mir-92a-2, hsa-mir-16-1, hsa-mir-16-2, hsa-mir-1974, hsa-mir-146b, hsa-mir-886, hsamir-210, hsa-mir-1979, hsa-mir-125a, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21, en el que dichos al menos 5 microARN comprenden al menos un microARN seleccionado de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 21.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, en el que dicho método comprende además una etapa de medición, en una célula del cumulus que rodea dicho ovocito o dicho embrión, del nivel de expresión de uno o más genes seleccionados del grupo que consiste en ATF3, SIAT6, PRKACA, PLA2G5, GPC6, G0S2, RBMS1, NFIC, SLC40A1 y WNT6.
5. Un método *in vitro* para el diagnóstico de la infertilidad, comprendiendo dicho método una etapa de medición del nivel de expresión de al menos 5 microARN seleccionados de las moléculas de ácido nucleico según lo definido en la reivindicación 1.
6. Uso de un kit para realizar el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5.

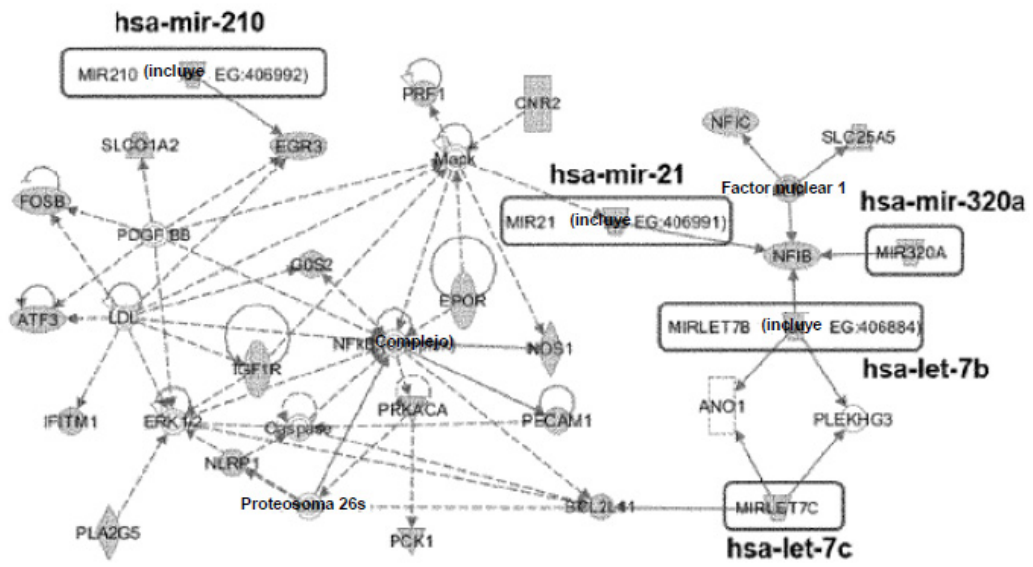


FIG. 1

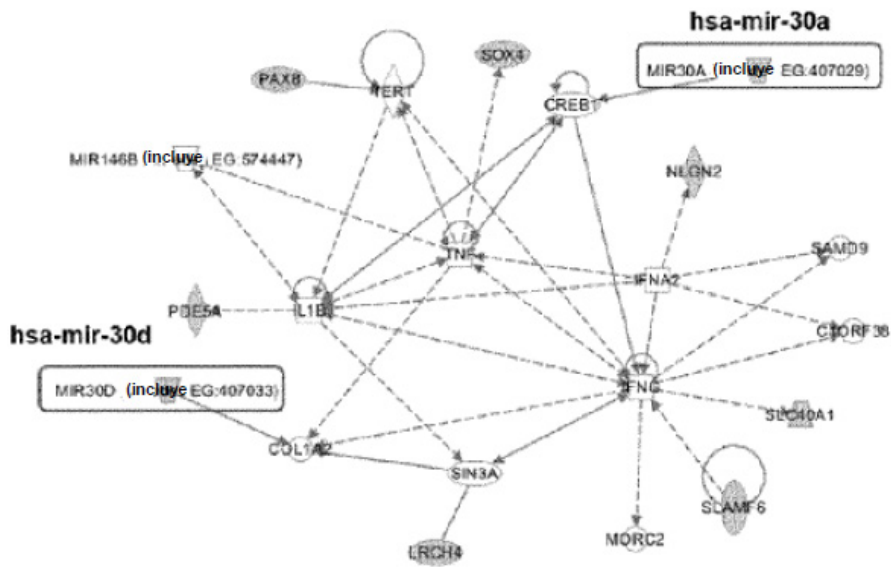


FIG. 2

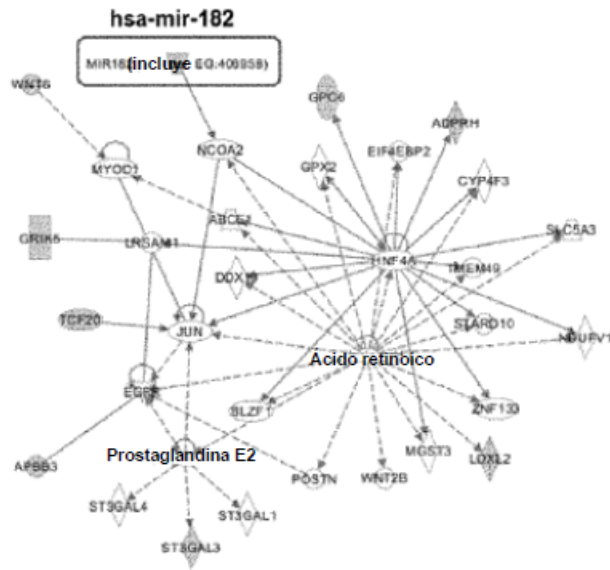


FIG. 3

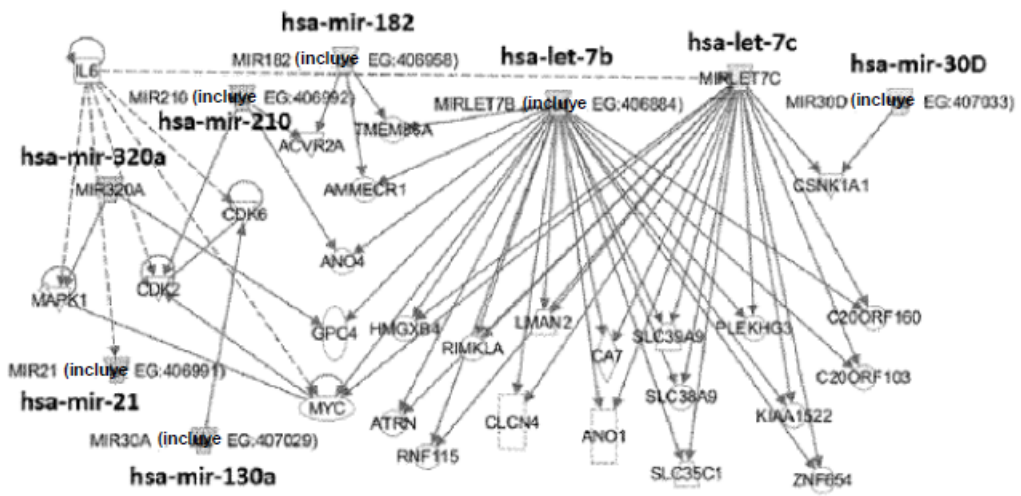


FIG. 4