

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 690 745**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

C12N 5/073 (2010.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2015 PCT/IB2015/055493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2016 WO16009416**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2015 E 15762723 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 3170001**

54 Título: **Evaluación de la viabilidad de embriones cultivados in vitro a partir del medio de cultivo**

30 Prioridad:

18.07.2014 EP 14462005

18.07.2014 HU P1400355

18.07.2014 US 201462026145 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2018

73 Titular/es:

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM (100.0%)

Vasvári Pál u. 4

7622 Pécs, HU

72 Inventor/es:

MONTSKÓ, GERGELY;

KOVÁCS, GÁBOR y

BÓDIS, JÓZSEF

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 690 745 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

Evaluación de la viabilidad de embriones cultivados *in vitro* a partir del medio de cultivo

Campo de la invención

5 La invención se refiere a métodos *in vitro* para una evaluación no invasiva de la viabilidad de embriones durante la reproducción asistida.

Técnica anterior

10 La infertilidad afecta a un porcentaje relativamente alto de la población madura, lo que conduce a una creciente necesidad del uso de tecnologías de reproducción asistida (TRA), y de fertilización *in vitro* (FIV). Desde el primer caso descrito y la introducción de la FIV por Steptoe y Edwards, la tecnología se ha extendido cada vez más, dando como resultado 125.000 ciclos por año en los EE.UU. en 2007. El número total de ciclos de TRA en Europa era de 493.184 en 2007, mientras que en 2008 y 2009 este número ascendió a más de 500.000 casos (1). El desarrollo de tecnologías de microcirugía, tales como la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ha significado que la mayoría de las parejas tienen la posibilidad de una fertilización con éxito. Otras mejoras tales como nuevos medios de cultivo, avances en las condiciones del cultivo celular, proporcionan la capacidad de cultivar embriones humanos *in vitro* hasta que se alcanza incluso el estadio de blastocisto, lo que significa 5-7 días. Todos los factores mencionados sugieren en teoría una tasa elevada de éxito entre los experimentos de FIV en la práctica, sin embargo, está muy por debajo de las expectativas. La tasa de implantaciones de embriones con éxito es sorprendentemente baja (2). En 1995, Dawson et al. (3) describían una tasa de éxito del 25%, mientras que en 2004, Scott (4) describía una tasa de éxito del parto del 27,7%. En 2009 en Europa esta tasa aumento a un 32% dependiendo de la tecnología TRA empleada (1).

25 Para superar esta limitación de la técnica, frecuentemente se transfieren múltiples embriones en un solo ciclo (5). La transferencia de embriones múltiples sin embargo aumenta el riesgo de embarazos múltiples, que tienen consecuencias no deseadas. Las gestaciones múltiples pueden dar lugar a un aumento del riesgo de parto prematuro, acompañado de bajo peso al nacer, y el riesgo de una parálisis cerebral o una discapacidad de por vida (4). En 2008 los nacimientos prematuros que eran el resultado de embarazos múltiples durante una FIV, causaron un coste de 1 mil millones de dólares extra a la seguridad social en los EE.UU. (5). Debido a estas consideraciones, la tendencia es transferir menos embriones, aunque esto da como resultado una tasa de éxito más baja, que es el aspecto más criticado de la FIV (6). De acuerdo con el presente consenso, la mejor opción podría ser todavía la transferencia de un solo embrión si la viabilidad del embrión se pudiera evaluar antes de la transferencia.

30 Por tanto, el objetivo es encontrar marcadores morfológica y/o bioquímicamente fiables para evaluar el embrión sin hacerle ningún daño y predecir el potencial de implantación. De esta manera, se podrían evitar los riesgos para la salud de los nacimientos múltiples sin renunciar a las posibilidades de éxito de un embarazo. La forma más fácil y obvia para predecir la viabilidad de un embrión es calificar el embrión utilizando marcadores morfológicos. Estos marcadores incluyen el tamaño del blastómero, la simetría y la tasa de escisión del embrión (18), la morfología celular del cúmulo-corona, granulosidad del citoplasma y polaridad del embrión. La evaluación de marcadores morfológicos también incluye el examen de la ruptura pronuclear temprana (2) y la morfología del cromosoma. El principal problema con estas técnicas basadas en la morfología del embrión es que incluso los embriones descritos con el mejor aspecto, tienden a dar lugar a un embarazo fallido, o se produce un aborto espontáneo con una tasa que no se puede aclarar solo por razones derivadas de la gestación (7). Una opción posiblemente mejor es el uso de marcadores moleculares, tales como el perfil de expresión génica (8), la expresión de ARN de genes específicos (7), la detección de aneuploidía o el examen del complemento cromosómico. El otro enfoque es el análisis metabólico del embrión utilizando los medios de cultivo, mediante una selección de compuestos específicos, o mediante el análisis del metaboloma total (9).

45 Un análisis específico se consigue convencionalmente mediante la medición de la glucosa y la captación de piruvato o la medición del recambio de aminoácidos. Algunos autores han informado de que la identificación de estos parámetros daba como resultado un éxito de la predicción del potencial de implantación de un embrión, pero algunos estudios describen resultados contradictorios. Existe un fuerte consenso de que más de un parámetro metabólico debe ser analizado, y en la actualidad el mejor enfoque parece ser la medición del metaboloma total (10). Las herramientas analíticas incluyen la espectroscopia de infrarrojo cercano, la espectroscopia Raman y más recientemente la espectrometría de masas (7). La espectrometría de masas (MS) tiene el potencial de una cuantificación específica y sensible en un amplio espectro de intervalos moleculares de masa y, por lo tanto, se adapta bien a las necesidades de la huella genética y la cuantificación metabólica o proteómica.

50 De acuerdo con los protocolos actuales, la viabilidad del embrión durante el proceso de IVF se evalúa mediante una inspección microscópica, lo que da como resultado una tasa de embarazo del 25-30%.

55 Además, el documento EP1847595A1 da a conocer un método *in vitro* para la evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión que comprende la detección de las proteínas p53, Cav12 o catalasa en el medio de cultivo del embrión como biomarcadores.

La haptoglobina (Hp) es una proteína tetramérica secretada por el hígado y que participa en la unión de la hemoglobina libre. La molécula de proteína madura consiste en dos cadenas α y β unidas por disulfuro. Las cadenas se originan a partir de una proteína precursora común, que se escinde proteolíticamente durante la síntesis proteica.

5 La haptoglobina se ha encontrado en todos los mamíferos estudiados hasta el momento y en su forma más simple, en los peces óseos. Parece estar presente en algunas aves, pero está ausente de las aves de tipo Neognato y de al menos algunos anfibios (*Xenopus*).

10 La estructura cuaternaria de la haptoglobina en organismos distintos de los seres humanos consiste normalmente en un dímero de cadenas alfa beta unidas covalentemente por un puente disulfuro entre el residuo Cys15 de cada cadena alfa. Sin embargo, en los seres humanos; las cadenas β son idénticas en todos los tipos de haptoglobina (glicosilada 40 KDa, 245 aminoácidos; no glicosilada 35 KDa) mientras que las cadenas α tienen dos formas alélicas en los seres humanos, alfa-1 y alfa-2, que determinan tres posibles genotipos. Cuando la haptoglobina se sintetiza como una preproteína, se escinde mediante el retículo endoplasmático en el péptido maduro que contiene dos cadenas alfa y dos cadenas beta conectadas por un enlace disulfuro (11). La haptoglobina se puede fragmentar en las cadenas alfa y beta mediante una escisión del enlace disulfuro por medio de enzimas de escisión o por reducción química.

15 La estructura proteica está constituida por monómeros ensamblados por una subunidad de α y una subunidad de β , los enlaces disulfuro mantienen unidas las dos subunidades (12). La subunidad β (40,0 KDa) no varía; sin embargo existen dos alelos α , a saber, la subunidad α_1 (8,9 KDa) y la subunidad α_2 (16,0 KDa). Puesto que α_1 y α_2 forman uno y dos enlaces entre monómeros, solo está presente el dímero $\beta\alpha_1 - \beta\alpha_1$ (fenotipo Hpt 1-1) en los homocigotos Hp1/Hp1, mientras que una población de isoformas circulares con monómeros $\beta\alpha_2$ (fenotipo Hpt 2-2) está presente en el homocigoto Hp2/Hp2. El heterocigoto Hp1/Hp2 muestra cadenas lineales de monómeros $\beta\alpha_2$, con los extremos protegidos con monómeros $\beta\alpha_1$ (fenotipo Hpt 1-2). La estructura de la haptoglobina se muestra en la Fig. 4, tomada a partir de (13). En la bibliografía, la nomenclatura de la haptoglobina y la zonulina es ambigua, muy probablemente la zonulina es la isoforma Pre-HP2 de la prehaptoglobina.

20 Se conoce que la haptoglobina humana se acumula en la norma de HSA (albúmina de suero humano) utilizada en medios de cultivo celular durante la purificación de HSA (14). La cadena alfa-1 de la haptoglobina humana es una proteína de 9186,5 Da presente en el medio de cultivo celular complementado con HSA, utilizado para el cultivo de embriones humanos. La fuente del fragmento alfa-1 de la haptoglobina en la norma de HSA y finalmente en el medio de cultivo, puede ser la escisión del enlace disulfuro que conecta las cadenas alfa y beta de la molécula de haptoglobina-1 madura (15).

25 Una detección específica de la subunidad alfa-1 de la haptoglobina se describe por ejemplo, en el documento de EE.UU. 2003/0017515 A1 y en (16) mediante una molécula que se une específicamente al epítipo para detectar el nivel del fragmento de haptoglobina (es decir, un anticuerpo policlonal contra HP-alfa).

30 Se planteó la hipótesis de que la haptoglobina era un marcador para la viabilidad del embrión en (17). Se describe que la presencia de haptoglobina tiene un papel en la implantación del embrión y que por tanto está correlacionada con el éxito del embarazo.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona una evaluación más precisa no invasiva de la viabilidad de un embrión mediante

- a) la evaluación del potencial reductor de un medio de cultivo de embriones;
- 40 b) la comparación de dicho potencial reductor con un potencial reductor predeterminado;
- c) la identificación del embrión cultivado en dicho medio como inapropiado para dar lugar a un embarazo con éxito, en donde dicho potencial reductor está por encima de dicho nivel predeterminado.

En una realización preferida, la presente invención tiene como fin proporcionar una evaluación no invasiva más precisa de la viabilidad de un embrión mediante una cuantificación del fragmento alfa-1 de la haptoglobina humana, que se ha encontrado que está presente en una cantidad significativamente más elevada en el medio de cultivo de embriones no viables que en el de embriones viables cultivados *in vitro* como parte del proceso de TRA. De acuerdo con nuestras mediciones, en el grupo de medios de cultivo de embriones, que se determinaron como no viables en el ensayo bioquímico (basado en la cantidad del fragmento de haptoglobina), no había embarazos detectados, por lo tanto este ensayo revelaba un éxito del 100% en la selección de los embriones no viables. En el grupo determinado como viables, la tasa de natalidad era del 54%.

50 En este aspecto de la invención, se proporciona una muestra de ensayo de un medio de cultivo de embriones y un medio de cultivo de control sin el embrión; tanto el medio de cultivo del embrión como el medio de cultivo de control comprenden haptoglobina, un fragmento de la haptoglobina se detecta en la muestra de ensayo y en la muestra de control; en donde un nivel más alto de dicho fragmento de haptoglobina en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de control, es indicativo de un embrión en el medio de cultivo del embrión, en donde dicho embrión

tiene una probabilidad limitada o no es adecuado para dar lugar a un embarazo con éxito.

De esta manera, aquellos embriones que tienen una probabilidad limitada o que no son adecuados para dar lugar a un embarazo con éxito, se pueden considerar como no viables y el resto se puede considerar como viables para el objeto de la presente invención (a menos que se consideren como no viables por cualquier otro método). Por lo tanto, solo un embrión considerado como viable se puede utilizar preferiblemente para la implantación. Por lo que la tasa de éxito de un embarazo es significativamente más elevada que sin una preselección.

La haptoglobina se propuso como un marcador para la viabilidad del embrión en (17). Se describe que la presencia de haptoglobina tiene un papel en la implantación del embrión y por tanto está correlacionada con el éxito de un embarazo. Por consiguiente, (17) se describe en una dirección distinta de la de la presente invención.

Con respecto a la realización que implica la medición de fragmentos/subunidades de haptoglobina, el documento EP1847595 se puede considerar como la técnica anterior más cercana. Se da a conocer un ensayo muy genérico para determinar la viabilidad de un embrión mediante el cultivo *in vitro* de un embrión en medio de cultivo; midiendo el nivel de un marcador en el medio de cultivo; y comparando el nivel medido del marcador en el medio de cultivo con al menos un nivel del marcador que es indicativo de la viabilidad del embrión y determinando de este modo la viabilidad del embrión. No existe ninguna indicación de que la haptoglobina se pueda utilizar como dicho marcador. El experto en la técnica no tendría una expectativa razonable de éxito para reemplazar la haptoglobina en ese método y obtener resultados creíbles.

Una realización de la presente invención proporciona una evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión, en donde dicho potencial reductor se evalúa en la etapa a) mediante un seguimiento durante el cultivo del embrión.

Otra realización de la presente invención proporciona una evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión, en donde dicho potencial reductor se evalúa en la etapa a) en una muestra tomada a partir del medio de cultivo después de la retirada del embrión.

En una realización preferida de la invención, dicho potencial reductor se evalúa con una medición directa.

En otra realización preferida de la invención, dicha medición directa se realiza con un electrodo redox.

En otra realización preferida de la invención, dicho potencial reductor se evalúa detectando la reducción de un compuesto reducible presente en dicha muestra tomada en la etapa a).

En otra realización preferida de la invención, dicho potencial reductor se evalúa mediante la detección de la reducción de un compuesto reducible añadido a dicha muestra tomada en la etapa a) después de la retirada del embrión.

En otra realización preferida de la invención, dicha muestra tomada en la etapa a) se mantiene en condiciones que permiten que dicho compuesto reducible se reduzca.

En otra realización preferida de la invención, dicho compuesto reducible contiene al menos un enlace disulfuro.

En una realización específica de la invención, dicho compuesto reducible se selecciona a partir del grupo que consiste en macromoléculas, péptidos y moléculas pequeñas, y preferiblemente es haptoglobina, disulfuro de glutatión (GSSG), ácido mercapto-succínico oxidado o mercapto-butanol oxidado.

En otra realización preferida de la invención, el potencial reductor se indica mediante una cantidad detectable de una forma reducida de dicho compuesto reducible.

En otra realización preferida de la invención, el potencial reductor se indica por un valor numérico del potencial redox.

En una realización adicional preferida de la invención, dicho potencial reductor predeterminado se determina mediante

i) el cultivo de un grupo de embriones en medio de cultivo de embriones;

ii) una evaluación del potencial reductor del medio de cultivo de cada uno de los embriones en dicho grupo;

iii) una correlación retrospectiva del potencial reductor evaluado en la etapa ii) de cada medio de cultivo de embriones para el éxito de los embarazos que son el resultado de la implantación de los embriones cultivados en dicho medio de cultivo; y

iv) una determinación de dicho potencial reductor predeterminado como el nivel más elevado del potencial reductor con el que se había observado un embarazo con éxito.

En otra realización preferida de la invención, dicha evaluación en la etapa ii) se realiza a través de una medición directa o mediante la detección de la reducción de un compuesto reducible.

En otra realización preferida de la invención, dicha evaluación en la etapa ii) se realiza mediante la detección de la reducción de un compuesto reducible y dicho nivel más alto del potencial reductor en la etapa iv) se indica por la falta de capacidad de detección de la reducción de dicho compuesto reducible.

5 En una realización preferida, el fragmento de la molécula de haptoglobina es un fragmento de haptoglobina reducida obtenido mediante la reducción de un enlace disulfuro entre las cadenas alfa y beta de la haptoglobina, en donde dicho fragmento tiene una secuencia específica para dicha cadena de haptoglobina.

Preferiblemente, el fragmento de la haptoglobina humana se selecciona a partir de un fragmento alfa de haptoglobina y un fragmento beta de haptoglobina. Preferiblemente, el fragmento alfa de haptoglobina es un fragmento alfa-1 de haptoglobina.

10 En una realización, en el método de acuerdo con la invención, la detección de dicho fragmento de haptoglobina se lleva a cabo por un método de ensayo seleccionado a partir del grupo que consiste en

– espectrometría de masas,

– inmunoensayo,

– un método espectroscópico

15 – una prueba de funcionamiento,

– un método de secuenciación o una combinación de los mismos.

Cualquier método usado para la detección debe ser preferiblemente específico para el fragmento de haptoglobina cuyo nivel se va a detectar.

Los métodos preferidos son la espectrometría de masas y los inmunoensayos.

20 Los inmunoensayos incluyen cualquier método en el que se aplica una molécula que se une específicamente a un epítipo para detectar el nivel del fragmento de haptoglobina de acuerdo con la invención. Tales moléculas que se unen específicamente a un epítipo incluyen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos y moléculas que tienen una región de unión adecuada para la unión a un epítipo, tal como minicuerpos y miméticos de anticuerpos, como aficuerpos, anticalinas, monocuerpos, etc.

25 Los ensayos preferidos son ELISA, transferencia Western, etc. Hay muchos enfoques prácticos para llevar a cabo estos tipos de ensayos. Los preferidos son los que se pueden automatizar fácilmente, tales como ensayos de tipo chip (un ejemplo del mismo se muestra en <http://www.raybiotech.com/quantibody-multiplex-elisa-array.html>). Del mismo modo, los ensayos de tipo tiras humedecidas también se pueden desarrollar para las realizaciones de inmunoensayos.

30 Se prevé una prueba unida a un chip de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) basada en un anticuerpo monoclonal específico, generado contra la subunidad alfa-1 de la haptoglobina humana. Un primer anticuerpo está unido a la superficie de un chip de vidrio o de policarbonato. Después de la aplicación de una muestra del medio de cultivo de embriones (viable, no viable y de control, a continuación todos se denominan "muestra") se llevará a cabo una etapa de lavado para evitar una tinción inespecífica, y después la reacción se cuantifica utilizando un segundo anticuerpo en solución que contiene un resto cromóforo. La reacción se detecta usando un lector de chips con luz UV, VIS o fluorescente, en función de las características del resto marcador.

35 En una realización preferida, una etapa de separación para separar dicho fragmento de la muestra del ensayo y de la muestra de control, se lleva a cabo antes de la detección del fragmento. Esta etapa de separación se puede utilizar también para hacer que el método sea específico de un fragmento, si la resolución de la separación es suficientemente alta para separar el fragmento de haptoglobina que se va a detectar, de los otros fragmentos de haptoglobina o proteínas que interfieren con la medición.

La separación se puede realizar basándose en cualquier propiedad molecular para la que los fragmentos son diferentes y que es adecuada para lograr una separación suficiente, como el tamaño, la carga, la hidrofobicidad, el punto isoeléctrico, la afinidad, etc.

45 Por ejemplo, en un experimento de transferencia Western, una etapa electroforética puede preceder a la etapa de transferencia lo que da lugar a una separación de los fragmentos.

50 Una solución práctica preferida para la separación es una electroforesis en gel de microfluidos basada en un chip, un ejemplo de la misma se muestra en <http://www.perkinelmer.com/catalog/product/id/760528>). El gel de poli(acrilamida) (PAGE) electroforético está miniaturizado en un chip, que contiene canales de microfluidos. Un análisis de las muestras se realiza en un instrumento combinado que lleva a cabo la separación electroforética de la muestra en paralelo con la detección y la cuantificación de los resultados. La subunidad alfa-1 de la haptoglobina humana está

marcada inespecíficamente utilizando un colorante cromóforo o fluoróforo. La especificidad se consigue utilizando la masa molecular conocida de la subunidad alfa-1 de la haptoglobina humana. En contraste con otros productos ya existentes, el chip desarrollado será capaz de separar un intervalo de masa diseñado específicamente para el análisis de un medio de cultivo de embriones.

- 5 En una realización preferida del método, si el nivel del fragmento de haptoglobina en la muestra de ensayo es mayor que el de la muestra de control y al menos es igual que un valor umbral, preferiblemente un valor umbral predeterminado, este hecho es indicativo de una posibilidad limitada de que el embrión sea inapropiado, o que llegue a serlo, para proporcionar un embarazo con éxito.

- 10 En una realización preferida del método, si el nivel del fragmento de haptoglobina en la muestra de ensayo es al menos 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135% o 140% del de la muestra de control, el embrión se clasifica como no viable. Opcionalmente, si el nivel del fragmento de haptoglobina en la muestra de ensayo es menor de 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135% o 140% del de la muestra de control, el embrión se clasifica como viable.

En una realización preferida, el valor umbral se predetermina experimentalmente.

- 15 En una realización, los niveles en el caso de que los embriones den lugar a un nacimiento, se comparan con los niveles en el caso de que los embriones no den lugar a un nacimiento.

En una realización, el umbral se fija en un valor en el que los embriones para los que el nivel es inferior al umbral no dan lugar a un nacimiento en el 100% de las implantaciones (ciclos).

En otra realización, el umbral se fija en un valor en el que los embriones para los que el nivel es al menos igual al umbral dan lugar a un nacimiento en al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de las implantaciones (ciclos).

- 20 En una realización preferida, el embrión es un mamífero, preferiblemente un embrión humano. Muy preferiblemente, el embrión es un embrión humano.

En una realización preferida, la haptoglobina es una haptoglobina de mamífero, preferiblemente una haptoglobina humana. Muy preferiblemente, la haptoglobina es una haptoglobina humana.

- 25 En una realización preferida, el embrión es un embrión humano, la haptoglobina es una haptoglobina humana, y el fragmento de haptoglobina se selecciona a partir de un grupo que consiste en un fragmento beta de haptoglobina, un fragmento alfa de haptoglobina, un fragmento alfa-1 de haptoglobina, un fragmento alfa-2 de haptoglobina, un fragmento alfa-beta de haptoglobina, un fragmento alfa-1-beta de haptoglobina, un fragmento alfa-2-beta de haptoglobina; preferiblemente a partir de un grupo que consiste en un fragmento beta de haptoglobina, un fragmento alfa-1 de haptoglobina, un fragmento alfa-1-beta de haptoglobina, preferiblemente a partir de un fragmento alfa-1 de haptoglobina o un fragmento que comprende múltiples fragmentos, sin embargo, menos fragmentos que la haptoglobina completa.
- 30

En una realización preferida, tanto la muestra como los medios de cultivo de control comprenden albúmina del suero.

- 35 En una realización preferida, el método para la evaluación no invasiva de la viabilidad de embriones de la invención se combina con otro método de evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión. Preferiblemente, si el embrión se evalúa como que es viable basándose en cada uno de los métodos de evaluación de la viabilidad, se selecciona para la implantación. Preferiblemente, el método para la evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión se combina con la evaluación microscópica de la viabilidad del embrión basándose en la morfología del embrión. La descripción también se refiere a un método para la fertilización *in vitro* de una paciente femenina, en donde el método comprende el método de evaluación de embriones de la invención, y la etapa adicional de implantar al menos un embrión en el útero de una paciente femenina. Preferiblemente, la paciente femenina es un pez, un ave o un mamífero que tiene haptoglobina. Más preferiblemente, la paciente femenina es un mamífero. Incluso más preferiblemente la paciente femenina es un ser humano. La descripción también se refiere a un uso de un medio de cultivo de embriones para una evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión midiendo el nivel de un
- 40
- 45 fragmento de haptoglobina como se define en este documento, comprendiendo dicho medio haptoglobina. La descripción también se refiere al uso de un fragmento de haptoglobina como se define en este documento para una evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión. La descripción también se refiere al uso de una molécula de unión detectable capaz de unirse específicamente a un fragmento de una haptoglobina como se define en este documento, para una evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión.

- 50 Preferiblemente la evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión se lleva a cabo mediante un método para la evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión como se define en este documento. La descripción también se refiere a kits para determinar el nivel de un fragmento de haptoglobina que contiene una molécula que se une específicamente a un epítipo, que contiene uno o varios inmunoensayos listos para el uso, para detectar el nivel de un fragmento de haptoglobina de acuerdo con la invención.

- 55 En un ejemplo, un kit contiene un medio de cultivo adecuado para el cultivo de embriones con un contenido en

haptoglobina predeterminado.

En un ejemplo preferido, el kit contiene un medio de cultivo adecuado para el cultivo de embriones con un contenido en haptoglobina predeterminado y un inmunoensayo listo para el uso como se ha definido anteriormente.

5 En un ejemplo altamente preferido, el kit está en forma de un chip adecuado para llevar a cabo diversas mediciones bioquímicas simultáneamente.

Definiciones

10 El término "embrión" tal y como se utiliza en este documento se refiere a un embrión, preferiblemente a un embrión humano en el primer estadio de desarrollo, entre la fusión de los gametos y el estadio de blastocisto. El término "embrión" tal y como se utiliza en este documento, se refiere al estadio de mórula del desarrollo de un embrión. También, el término "embrión" tal y como se utiliza en este documento, se refiere a un embrión fertilizado y cultivado *in vitro* antes de la implantación.

15 El término "viable", cuando se utiliza en este documento haciendo referencia a un embrión, se refiere a un embrión que no se identifica como un embrión que tiene una posibilidad limitada o ninguna de implantación, basándose en el nivel de potencial reductor, o basándose en cualquier indicador adicional que muestra dicho cambio en el nivel del potencial reductor. Un indicador de ese tipo puede ser un nivel de haptoglobina por debajo de un nivel umbral predeterminado que indica que el embrión no se ha deteriorado y puede ser apropiado para la implantación. Preferiblemente, el medio de cultivo *in vitro* del embrión contiene menos de 110%, 120%, 130%, 140% o 150% de la cantidad de un fragmento de la haptoglobina del medio de cultivo de control que no comprende el embrión. Por el contrario, un nivel incrementado de un fragmento de haptoglobina puede indicar que el embrión no es apropiado para la implantación y para dar lugar a un embarazo con éxito.

20 Sin embargo, la implantación de un embrión viable en el útero de una paciente femenina puede dar lugar o no a un embarazo con éxito y/o puede dar lugar o no a un nacimiento, ya que estos resultados dependen de muchos otros factores. Por el contrario, la implantación de un embrión no viable no va a dar lugar a un embarazo con éxito. Un embarazo con éxito se entiende que llega hasta el parto.

25 De acuerdo con ello, se mejora la posibilidad de una implantación de embriones viables y de embarazos con éxito resultantes. Por lo tanto, el experto en TRA será capaz de implantar menos embriones para evitar complicaciones posteriores, como se ha detallado anteriormente.

30 El "potencial de reducción" (también conocido como potencial redox, potencial de oxidación/reducción) es una medida de la tendencia de una especie química para adquirir electrones y de ese modo ser reducida. El potencial de reducción se mide en voltios (V), o mili voltios (mV). Cada especie química tiene su propio potencial de reducción intrínseco; cuanto más positivo es el potencial, mayor es la afinidad de la especie hacia los electrones y la tendencia a reducirse. La expresión "potencial reductor" tiene un significado más amplio, tal y como se usa en el presente documento, indica que un compuesto o una mezcla (por ejemplo, un sistema biológico complejo, es decir, la mezcla de un embrión y el medio de cultivo del mismo) es capaz de reducir otra especie química. Puede ser una medida cualitativa más que cuantitativa. Dado que la otra especie química, que es reducible por el compuesto o la mezcla que tiene un "potencial reductor" específico, tiene un valor de potencial redox propio, por lo tanto a dicho compuesto o a la mezcla también se les asigna un valor de potencial redox. La medición directa del "potencial reductor" a través de la medición de este potencial de reducción se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales, tales como mediante el uso de electrodos adecuados. El "potencial reductor" significa la capacidad para reducir y es específico para un entorno dado.

35 La expresión "compuesto reducible" no está limitada si su potencial redox puede cambiar en las condiciones del medio de cultivo de embriones.

40 La expresión "valor de corte predeterminado" significa un nivel de potencial reductor por encima del cual los embriones se evalúan como no viables mediante estudios de correlación retrospectivos. No es necesariamente un valor numérico definitivo, se puede indicar mediante la identidad de un compuesto reducible/indicador que se reduce en las condiciones del medio de cultivo de embriones desde su forma oxidada. Como el experto en la técnica sabrá, la forma oxidada puede que no se convierta totalmente en la forma reducida, ya que existe un equilibrio de esas reacciones químicas. Por lo tanto, para un compuesto reducible dado, se puede proporcionar un nivel o relación umbral para la forma reducible, por encima del cual se considerará que la reducción ha tenido lugar.

45 La "haptoglobina" es una proteína multimérica que tiene subunidades ligadas por enlaces disulfuro, y que se expresa como una cadena polipeptídica precursora (zonulina) y se procesa en cadenas alfa y beta. La haptoglobina pertenece a la familia de peptidasas S1 y contiene un dominio de peptidasa S1 y dominios sushi (CCP/CCP). Preferiblemente, la haptoglobina de acuerdo con la invención muestra al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de identidad con una secuencia de haptoglobina de un pez, un ave o un mamífero, preferiblemente una secuencia de haptoglobina de un mamífero, por ejemplo, una secuencia de haptoglobina humana. Las secuencias de mamífero se proporcionan, por ejemplo, en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot, por ejemplo, con los siguientes números de referencia: P00738; G3RSR8; J3QR68; H2RAT6; G3RB80; P00738-2; Q28800; Q28803;

G3S6B1. La haptoglobina está codificada por el gen HP (en seres humanos) o un gen correspondiente al mismo. Preferiblemente la haptoglobina natural actúa uniéndose a la hemoglobina libre en el plasma lo que permite que las enzimas degradantes accedan a la hemoglobina, mientras que al mismo tiempo se evita la pérdida de hierro a través de los riñones y se protege a los riñones de una lesión a través de la hemoglobina.

- 5 Un "fragmento de haptoglobina" es una parte de la molécula de haptoglobina que consiste en una cadena más corta y/o una subunidad de la misma o ambas. Los términos "fragmento" y "subunidad" se emplearán de forma indistinta en este documento. El término "fragmento" no incluye ninguna cadena de aminoácidos que sea el resultado de una rotura aleatoria de la cadena del polipéptido, o fragmentos sintéticos basados en la secuencia de haptoglobina que no se producen *in vivo*.
- 10 Un "fragmento reducido" de una proteína de cadenas múltiples se obtiene mediante la reducción de un enlace disulfuro entre las cadenas de dicha proteína, teniendo dicho fragmento una secuencia específica para dicha cadena. Por lo tanto, un "fragmento de haptoglobina reducida" es un fragmento obtenido mediante la reducción de un enlace disulfuro entre subunidades de la haptoglobina, en donde dicho fragmento tiene una secuencia específica para dicha cadena de haptoglobina.
- 15 En la presente invención se contemplan secuencias mutadas de subunidades, fragmentos o cadenas de haptoglobina, siempre que su secuencia sea al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% idéntica a secuencias naturales de peces, aves o mamíferos, cálculo realizado haciendo referencia a la longitud completa de la secuencia natural de la subunidad, el fragmento o la cadena, y en donde con un método de detección se detecta tal secuencia mutada junto con la subunidad, el fragmento o la cadena natural. Por lo tanto, una secuencia mutada debe entenderse que incluye cualquier diferencia incluyendo sustituciones, deleciones y opcionalmente adiciones. Por lo tanto, los fragmentos que tienen una longitud de cadena más corta se contemplan con tal de que se puedan detectar junto con y/o específicamente para la subunidad, el fragmento o la cadena natural.

25 La "cadena alfa-1 de haptoglobina" se refiere a la cadena de longitud completa de una subunidad alfa-1 de la haptoglobina. Las expresiones "fragmento alfa-1 de haptoglobina", "subunidad alfa-1 de haptoglobina" y "cadena alfa-1 de haptoglobina" se usan indistintamente. La expresión "fragmento alfa-1 de haptoglobina" se puede entender como una "cadena alfa-1 de haptoglobina" y, tal y como se usa en el presente documento, también se puede referir a cualquier fragmento de la cadena alfa-1 de haptoglobina, que tiene una secuencia de aminoácidos específica para dicha cadena y se genera a partir de la cadena alfa-1 de haptoglobina original *in vivo*. Esto se refiere mutatis mutandis a otras subunidades. El experto en la técnica será capaz de evaluar sin una carga excesiva si un fragmento/subunidad/cadena alfa-1 de haptoglobina se genera *in vivo* mediante la realización de experimentos de modelo simple haciendo uso de la cadena alfa-1 de la haptoglobina original natural o mutada en el medio de cultivo, y analizando las secuencias de polipéptidos resultantes.

Una "muestra" de una sustancia, por ejemplo, un medio de cultivo, significa una parte o un todo (por ejemplo, una parte completa) de dicha sustancia que es adecuada para manipular en un experimento o ensayo.

- 35 Tal y como se usa en este documento, en un sentido más amplio, una "parte" de una entidad se entiende como que incluye también la entidad completa a menos que se especifique lo contrario, mientras que dicha entidad esté compuesta de una o varias partes. Un fragmento es una parte que no implica el todo. En un sentido más estricto, una parte es un fragmento de la entidad completa. Preferiblemente, un fragmento es una parte que es específica de la entidad completa. En un aspecto, una o varias partes conforman la entidad completa.
- 40 Un "medio de cultivo" tal y como se usa en el presente documento, es una sustancia útil y apropiada para el cultivo de células, ya sea células individuales o células unidas entre sí o un tejido. En una realización preferida, el medio de cultivo es un medio de cultivo (o para cultivar) de embriones, apropiado para el cultivo de un embrión, de preferencia desde el estadio de una célula hasta el estadio de blastocisto. Preferiblemente, el embrión es un embrión de pez, de ave o de mamífero, preferiblemente un embrión de mamífero, muy preferiblemente un embrión humano.
- 45 Un "nivel más elevado" de una sustancia en una primera muestra que en una segunda muestra indica que el nivel, dependiendo del método para la medición y, en su caso, del cálculo de dicho nivel, incluyendo opcionalmente el método estadístico implicado, es mayor de forma notable, detectable o significativa en la primera muestra que en la segunda muestra. Preferiblemente, un "nivel superior" significa que el nivel es superior o es al menos igual a un valor umbral, por ejemplo, como se define en este documento.
- 50 La "detección" implica un método técnico en el que una sustancia se detecta en una muestra e incluye o comprende una detección cuantitativa o semicuantitativa; por lo tanto, el término se puede entender como que incluye unas etapas de medición, de evaluación y/o de cálculo o una combinación de las mismas, según sea necesario para obtener la información deseada. Por lo tanto, en una versión preferida, detectar significa medir y/o evaluar.

55 Tal y como se emplea en este documento, las formas singulares "un", "una" y si el contexto lo permite "el", incluyen también las formas plurales, a menos que el contexto indique lo contrario.

Los términos "comprende" o "que comprende" o "que incluye" se deben interpretar en este documento que tienen un significado no exhaustivo y permiten la adición o la participación de características o etapas del método o

componentes adicionales, además de cualquiera que comprenda las características o etapas del método o componentes enumerados.

La expresión "que consiste esencialmente en" o "que comprende sustancialmente" ha de entenderse como que consiste en características o etapas del método o componentes obligatorios, enumerados en una lista, por ejemplo, en una reivindicación, mientras que permite contener adicionalmente otras características o etapas del método o componentes que no afectan materialmente a las características esenciales del uso, el método, la composición u otra materia. Ha de entenderse que "comprende" o "que comprende" o "que incluye" se pueden reemplazar en el presente documento por "que consiste esencialmente en" o "que comprende sustancialmente", si así se requiere, sin añadir un contenido nuevo.

10 Breve descripción de las figuras

Figura 1 Espectro de masas del fragmento de haptoglobina identificado. El ion más intenso con una m/z de 1149,7 m/z , se corresponde con el ion $[M+8H]^{8+}$ de la molécula. Los que tienen m/z de 1022,1 y m/z de 1313,7 son los otros dos iones cargados de forma múltiple $[M+7H]^{7+}$ y $[M+9H]^{9+}$, detectados con una relación aceptable entre señal y ruido.

15 Figura 2 Resultados del análisis ciego de un medio de cultivo de embriones después de tres días de incubación ($n = 80$).

Figura 3 Diagrama de barras de la cantidad media de cantidad de fragmento alfa-1 de haptoglobina en las muestras de embrión de control ($n = 12$), de embrión viable y de embrión no viable (total $n = 90$). Se encontró una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre el grupo de embriones no viables y los otros dos grupos.

20 Figura 4 A: Transferencia Western de anticuerpos policlonales anti-Zot que tienen una reacción cruzada con la zonulina que muestran una banda inmunorreactiva de 18 KDa y una banda más débil de ~45 KDa (carril 1), sueros que muestran solamente una banda de 9 KDa (carril 2), y sueros que muestran tanto la banda de 18 KDa como la de 9 KDa (carril 3). B: esquema que muestra la estructura tanto de pre-haptoglobina (HP) 1 como de pre-HP2 y sus proteínas maduras (en el lado extremo derecho). Las pre-HPs se traducen como proteínas precursoras de cadena sencilla. Las pre-HPs se pueden escindir proteolíticamente de forma intracelular en las cadenas α y β que se mantienen unidas con puentes disulfuro, a las que se hace referencia como HPs maduras de dos cadenas, escindidas.

25 Figura 5 Diagrama de barras de los experimentos en los que GSSG (panel A) y ácido mercapto-succínico oxidado (panel B) se incubaron en el medio de cultivo de embriones durante tres días. Hay que tener en cuenta que la solución de ácido mercapto-succínico oxidado solo tenía una pureza del 84%, que contenía 16% de ácido mercapto-succínico reducido.

Descripción detallada de la invención

Una evaluación de la viabilidad antes de la transferencia de los embriones es una cuestión crucial, ya que la tasa de éxito de las intervenciones de FIV es sorprendentemente baja a nivel mundial. La práctica de una transferencia de embriones múltiples para superar esta limitación viene acompañada de varios factores de riesgo que conducen a un consenso de que la mejor opción es la transferencia de un solo embrión (32) cuando el potencial de implantación del embrión se puede evaluar *in vitro* durante los primeros días de desarrollo. En lugar de los enfoques basados en la morfología del embrión que se utilizan rutinariamente, tales como la tasa de división o la simetría del blastocisto, la medición de los procesos metabólicos del embrión en desarrollo, o la búsqueda de biomarcadores en el medio de cultivo celular, parece ser una opción mejor. El objetivo de nuestro trabajo era encontrar cualquier marcador biológico presente en el medio de cultivo de embriones mediante espectrometría de masas, lo que diferiría cualitativa o cuantitativamente en las muestras de embriones viables y no viables.

Se ha descubierto inesperadamente que la cantidad de un fragmento de un polipéptido presente en el medio de cultivo, utilizado convencionalmente para el cultivo de embriones como parte del proceso de FIV, se incrementa en los medios de cultivo de embriones que más tarde se demostró que no eran viables, es decir, cuya implantación no dio lugar a un parto con éxito, en comparación con la cantidad del mismo fragmento medido en los medios de cultivo de embriones que demostraron ser viables y en los medios de cultivo de control sin embrión. Se identificó dicho fragmento como el fragmento alfa-1 de la haptoglobina humana, obtenido a partir de la proteína haptoglobina por medio de la escisión del enlace disulfuro que conecta la cadena alfa y la beta de la molécula de haptoglobina.

45 Durante la preimplantación, el número de células embrionarias aumenta; sin embargo, este aumento es el resultado de la proliferación celular y la muerte celular. En contraste con los embriones que se desarrollan normalmente, los que tienen una viabilidad menor muestran una mayor tasa de apoptosis, similar a la de los embriones detenidos, dando finalmente como resultado una necrosis secundaria y un aumento de la permeabilidad de la membrana (18). La apoptosis implica la activación de proteasas y otras enzimas que, debido a la desintegración de la membrana, se podrían liberar al medio de cultivo. Cuando tiene lugar una desintegración de la membrana celular que acompaña a la muerte celular, estas enzimas proteolíticas activadas salen de la célula y comienzan a escindir las proteínas que se encuentran en el medio de cultivo.

5 Cuando la haptoglobina se sintetiza como una preproteína, se escinde mediante el retículo endoplasmático en el péptido maduro que contiene una cadena alfa y una beta conectadas por un enlace disulfuro (11). En un entorno químico reductor, este enlace se puede romper formando dos grupos sulfhidrilo. La explicación para el aumento de la cantidad de este fragmento alfa-1 en las muestras de embriones sin éxito, podría ser el hecho de que los embriones que se desarrollan anormalmente muestran frecuentemente las características de la apoptosis en una mayor medida que los embriones normales, que posteriormente viene seguida por una necrosis secundaria acompañada por un aumento de la permeabilidad de la membrana (18).

10 Se sugiere que durante su desarrollo, el embrión no viable cambia la composición química del medio de cultivo a un entorno más reductor, provocando de este modo el aumento de la escisión o la reducción del enlace disulfuro que conecta la cadena alfa y beta de la haptoglobina. Los procesos de apoptosis y, finalmente, de necrosis acompañados por un aumento de la permeabilidad de la membrana y los cambios en la composición química del medio de cultivo, pueden dar lugar al aumento de la cantidad de varios fragmentos de polipéptidos escindidos por las enzimas proteolíticas activadas procedentes de proteínas del medio de cultivo. Esto puede ocurrir solo en los medios de cultivo de embriones con desarrollo anormal, ya que el nivel de apoptosis es más bajo en los embriones que se desarrollan normalmente. Junto con la cantidad del fragmento alfa-1 de la proteína haptoglobina humana, la cantidad de la cadena β o las cantidades de fragmentos más cortos específicos de esta proteína, puede aumentar. El hecho de que la escisión del enlace disulfuro sea el origen del fragmento alfa-1 de la haptoglobina, se confirmó en nuestro experimento en el que se añadió el agente ditiotreitolo que reduce el enlace disulfuro al medio G1+HSA de control (que no contenía un embrión) y se observó un aumento de la cantidad de fragmento alfa-1. La presencia de grupos tiol libres se confirmó mediante la adición de 2-yodoacetamida, un agente alquilante de los grupos tiol. De cara al procedimiento, descrito anteriormente, de apoptosis observada cuando un embrión se desarrolla anormalmente, se sugiere que las proteínas de los medios de cultivo de un embrión cultivado *in vitro* como parte de un proceso de FIV, y en particular la haptoglobina, se fragmentan con enzimas de escisión o mediante reducción química y estos fragmentos se pueden detectar, cuantificar y por lo tanto se pueden utilizar como indicadores de un desarrollo anormal. Tales fragmentos se pueden identificar antes de la implantación del embrión procedente de una muestra del medio de cultivo, sin hacer ningún daño al embrión, por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante HPLC. La cantidad de tales fragmentos se puede cuantificar y comparar con la cantidad de fragmentos en una muestra de control, así como por métodos bien conocidos en la técnica, tales como espectrometría de masas o diversos inmunoensayos.

25 Además de la reducción del enlace disulfuro que conecta las cadenas alfa y beta naturales de la haptoglobina, otras versiones mutadas de la haptoglobina se pueden contemplar siempre que el o los enlaces disulfuro reducibles estén presentes.

30 Para ampliar la hipótesis anterior basada en el fenómeno observado originalmente, a saber, la reducción del enlace disulfuro que conduce a la fragmentación de la molécula de haptoglobina humana, hemos diseñado experimentos adicionales para ver si es específica de la haptoglobina, o es universal. El embrión que tiene un aumento de la apoptosis posee un entorno reductor que puede afectar a moléculas adicionales que contienen enlaces disulfuro. Está claro que no se puede añadir ningún compuesto nuevo a los medios de cultivo de embriones, debido a cuestiones éticas. Sin embargo, es evidente que el potencial reductor que causa la reducción del enlace disulfuro dentro de la molécula de haptoglobina todavía se conserva después de que el embrión se retira del medio de incubación.

35 Como se muestra en los ejemplos, la haptoglobina sirve como un ejemplo macromolecular originalmente presente en el medio de cultivo de embriones. Sin embargo, otras macromoléculas que contienen enlaces disulfuro se pueden añadir al medio después de la retirada del embrión, y se puede observar su reducción de manera similar.

40 Unas realizaciones específicas de este aspecto pueden emplear cualquier tipo de compuesto que se puede reducir fácilmente en el campo de un potencial redox del medio de cultivo de embriones, cuando los embriones se cultivan y se pueden deteriorar, y por lo tanto dar lugar a embriones no viables. Este campo de potencial reductor se puede medir de varias maneras. Cualquiera de las mediciones directas es posible (con un electrodo adecuado) o también se prevé una evaluación indirecta del potencial reductor. En la última técnica, una serie de compuestos reducibles se someten a ensayo para estudiar una reducción a través del medio de cultivo del embrión, y luego se analizan (incluyendo retrospectivamente una comparación con nacidos vivos) si la reducción de los compuestos específicos se llevó a cabo o no en las muestras. De esta manera, la evaluación de los embriones viables se puede llevar a cabo mediante el establecimiento de un nivel de corte que por ejemplo, se puede definir como un compuesto definitivo de las series de calibración anteriores que se escinde/reduce con el nivel de potencial reductor que es capaz de diferenciar embriones viables de no viables.

45 Los péptidos más cortos o incluso moléculas pequeñas son conocidos por la persona experta en la técnica y se pueden seleccionar como un compuesto reducible. Los compuestos reducibles ejemplares son indicadores redox, o preferiblemente compuestos que contienen disulfuro. En la presente memoria descriptiva, los compuestos de ensayo eran disulfuro de glutatión, un péptido compuesto por seis aminoácidos y disulfuro de mercapto succinato, un ácido mercaptocarboxílico. Como se muestra a continuación en los ejemplos, ambos se utilizaron con éxito para distinguir entre embriones viables y no viables, basándose en el análisis del medio de cultivo agotado después de retirar el embrión. La persona experta en la técnica será capaz de elegir entre un conjunto extenso de compuestos reducibles

comercialmente disponibles. Los compuestos reducibles pueden ser macromoléculas, péptidos, moléculas pequeñas. Una macromolécula preferible es la haptoglobina, como se detalla en otra parte en la descripción. Otros ejemplos son moléculas oxidadas, cuya forma reducida contiene grupos sulfhidrilo libres. La detección y la medición de grupos sulfhidrilo libres son bien conocidas en la técnica.

5 Como soluciones prácticas, un chip, una placa de microtitulación o un ensayo basado en un microtubo de ensayo existen para detectar la conversión de glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). Una solución de GSSG está contenida en un microtubo de ensayo preparado, una placa de microtitulación o un chip microfluídico. Después de la aplicación de la muestra y un tiempo de incubación predeterminado a 37°C, se cuantifica la cantidad de GSH. Se puede llevar a cabo mediante el uso de una tinción con colorante fluoróforo o cromóforo de los grupos sulfhidrilo
10 libres. Existen kits fácilmente disponibles (véase, <http://www.abcam.com/gshgssg-ratio-detection-assay-kit-fluorometric-green-ab138881.html>, https://worldwide.promega.com/products/cell-health-and-metabolism/oxidative-stress-assays/gsh_gssg_glo-assay/). La cuantificación puede estar basada en la absorbancia, la colorimetría o la fluorimetría usando un lector de chips o un lector de placas. La reacción también se puede cuantificar empleando la colorimetría, en donde el colorante marcador se une a una tira de ensayo sobre la que se aplica una gota de muestra/solución de glutatión incubada (en un microtubo de ensayo, por ejemplo).
15

La gran mayoría de los medios de cultivo de embriones *in vitro* utilizados actualmente contiene proteínas del suero, ya que estas moléculas son un componente crucial, aparentemente insustituible. En el caso de embriones humanos, las proteínas del suero utilizadas son proteínas obtenidas convencionalmente a partir de suero humano. Un complemento macromolecular de los medios de cultivo, en forma de suero completo, proteínas del suero aisladas,
20 proteínas del suero recombinantes o polímeros alternativos, proporciona tanto una interfaz química como física de los embriones con su microentorno y son cruciales para maximizar la viabilidad embrionaria (19). El papel de la complementación macromolecular de los medios de cultivo de embriones humanos se describe con detalle, por ejemplo, en Patrick Quinn: Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART, Cambridge University Press, 2014. (19) y en Manual of Assisted Reproductive Technologies and Clinical Embryology, JP Medical Ltd., 2012 (20).

25 La preocupación respecto a las enfermedades transmisibles mediante el uso de una proteína obtenida a partir de donantes (por ejemplo, enfermedades asociadas con priones) en los medios de cultivo de embriones humanos, ha conducido a varios intentos de sustituir el suero obtenido a partir del donante y las proteínas séricas, y también para el desarrollo de medios exentos de proteínas (PFM). El uso de proteínas recombinantes (por ejemplo, albúmina) se ha sugerido (21). El documento EP 2 235 160 describe un medio de cultivo sustancialmente exento de proteínas para ser utilizado en la fertilización *in vitro* y otras tecnologías de reproducción asistida en los seres humanos. Sin embargo, el uso de esos medios alternativos sigue siendo marginal hasta la fecha de esta solicitud.
30

Convencionalmente, los medios de cultivo de embriones empleados contienen albúmina del suero humano (HSA) como agente promotor del crecimiento. La HSA se purifica lo más frecuentemente a partir de suero de un donante y es un hecho descrito que durante la purificación diversos otros polipéptidos, tales como la haptoglobina, se pueden acumular en los estándares disponibles comercialmente (14). Se ha investigado cómo afectan diferentes lotes del estándar de HSA al contenido inicial en fragmento alfa-1 de la haptoglobina del medio. La variación encontrada era mucho menor que la diferencia expresada como un porcentaje entre los grupos de embriones viables y no viables.
35

Durante la fase de descubrimiento de nuestro estudio (n = 10), se encontró un nuevo marcador de polipéptidos que mostraba una diferencia significativa (p <0,001) en cantidad entre los grupos de embriones con éxito y sin éxito. Esta molécula se identificó con espectrometría de masas en tándem como el fragmento alfa-1 de la haptoglobina humana. La detección y la cuantificación del fragmento alfa-1 de la haptoglobina del medio de cultivo demostró ser un buen método adicional a la inspección microscópica empleada convencionalmente. El método de la invención identifica embriones no viables. Utilizando el método de la invención, hemos sido capaces de seleccionar con una precisión del 100%, los embriones con un potencial cero para dar lugar a un embarazo. En ese grupo, el aumento de la cantidad observada del fragmento de haptoglobina de 9186,5 Da, resultó ser un indicador cuantitativo de una predicción negativa antes de la transferencia del embrión. La combinación de una evaluación microscópica con la medición del fragmento de haptoglobina, incrementa la tasa de éxito hasta un 50%.
40
45

De acuerdo con nuestros resultados, la determinación de la cantidad de fragmento alfa-1 de la haptoglobina humana en una muestra de los medios de cultivo de embriones antes de la transferencia y la comparación de la cantidad de dicho fragmento con muestras de control en blanco, incubadas junto con los embriones en las mismas circunstancias, pueden proporcionar una evaluación no invasiva más precisa de la viabilidad del embrión para aumentar la tasa de éxito de los procesos de FIV.
50

La detección de la cantidad de fragmentos de la molécula de haptoglobina en las muestras de los medios de cultivo se puede lograr a través de diversos métodos de detección de proteína/péptido conocidos en la técnica. Tales métodos incluyen, por ejemplo, procedimientos de espectrometría y espectroscópicos, tales como la espectrometría de masas.
55

Por ejemplo, la espectrometría de masas MALDI-TOF se ha convertido en una herramienta popular. El alto rendimiento y la simplicidad relativa de esta tecnología han hecho que sea atractiva para el descubrimiento y la validación de biomarcadores. Además, se han desarrollado enfoques técnicos para el chip de proteínas basado en la

espectrometría de masas SELDI-TOF (22), véase el documento de EE.UU. 2003/0017515A1. Tales métodos se pueden acompañar de técnicas de purificación para enriquecer la muestra en el fragmento de haptoglobina. Tales técnicas implican una purificación con perlas magnéticas, métodos cromatográficos, tales como cromatografía de líquidos, etc. En la espectrometría de masas, el área del pico se puede correlacionar con la concentración.

- 5 Una opción preferida adicional implica diferentes inmunoensayos, tales como transferencia Western, ensayo radioinmune, ELISA, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de tipo sándwich, etc.

En un inmunoensayo se suelen utilizar anticuerpos. En la presente invención, de forma análoga, se pueden utilizar otras moléculas de unión tales como miméticos de anticuerpos. Un requisito para emplear anticuerpos y miméticos de anticuerpos de tipo moléculas de unión en la presente invención es que deben ser capaces de reconocer el fragmento de la haptoglobina que se va a detectar y diferenciarlo de la haptoglobina completa o de un fragmento de la misma que no se va a detectar en el la realización del ensayo. Por ejemplo, se pueden emplear moléculas de unión de tipo anticuerpos, específicas contra las cadenas alfa o beta (23).

Los anticuerpos ya preparados contra tanto la cadena alfa como la beta están comercialmente disponibles para los métodos de detección mencionados anteriormente. Los anticuerpos contra la molécula de haptoglobina intacta también están disponibles comercialmente (Abcam, Randox LifeSciences, Santa Cruz Biotechnology, Acris Antibodies GmbH etc.). El uso combinado de un anticuerpo contra la cadena alfa o la cadena beta y contra la haptoglobina intacta, puede mejorar la precisión de las mediciones de la cuantificación. La preparación de anticuerpos hechos a medida también se describe ampliamente en la bibliografía y está incluida en los conocimientos del experto en la materia.

Una descripción detallada de las técnicas que se pueden usar cuando se lleva a cabo el método de la invención se encuentra, por ejemplo, en *The Immunoassay Handbook*, cuarta edición: Wild D: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques Elsevier Science; 4ª edición, 2013, y en Gosling, JP *Immunoassays: A Practical Approach* Oxford University Press; 2000 (24 y 25).

Estos métodos se pueden combinar con un método de secuenciación rápida que permita una detección específica de las cadenas de anticuerpo.

Por lo tanto, tales anticuerpos o moléculas de unión se pueden utilizar en kits para la evaluación de la viabilidad de embriones con la finalidad de los métodos de fertilización *in vitro*. Un kit de este tipo también puede comprender un medio de cultivo o componentes del mismo para el cultivo de embriones, así como medios de control, un patrón de haptoglobina o composiciones que comprenden un patrón de haptoglobina de este tipo. Un patrón de haptoglobina comprende preferiblemente un fragmento de la misma que se va a detectar y/u otros fragmentos o la misma haptoglobina como controles que no se van a detectar. Los medios para la separación de fragmentos de haptoglobina también se pueden incluir.

Es posible usar el método de la invención incluso en procesos de ART en los que el medio de cultivo se complementa con albúmina que no se obtiene a partir del suero o el medio de cultivo es un medio exento de proteínas. La haptoglobina se puede añadir a tales medios después de la fertilización como un marcador bioquímico sin el riesgo de interferir con el desarrollo del embrión.

Ejemplos

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

40 Nuestro estudio se llevó a cabo entre el 24 de marzo de 2013 y el 9 de mayo de 2013, en la Unidad de Reproducción Asistida, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Pécs, Hungría. En ese periodo empezamos 90 ciclos de FIV no seleccionados y realizamos una aspiración del líquido folicular guiada por una ecografía transvaginal. Los pacientes que participaron en nuestro programa de FIV tenían edades de 23-40 años (media: $32,3 \pm 5,1$ años) y tenían un IMC de 21,3-29,7 (media: $23,80 \pm 1,9$). Presentaban el siguiente diagnóstico principal infertilidad: factores masculinos (14, 33,3%), trompas de Falopio dañadas o bloqueadas (10, 23,8%), endometriosis grave (7, 16,7%) e infertilidad sin aclarar (11, 26,2%). Estos últimos pacientes habían experimentado antes seis inseminaciones intrauterinas sin éxito. Los pacientes se recogieron en este estudio de acuerdo con la fecha del procedimiento, de modo que eran una población no seleccionada. Entre los pacientes no había individuos con diabetes mellitus (tipo I y II) o con tolerancia reducida a la glucosa.

Protocolo del estudio

El agonista de GnRH, triptorelina (Gonapeptyl; Ferring®, Alemania) se usó en un protocolo largo o corto, y la estimulación se realizó con dosificaciones individuales de rFSH (Gonal-F; Serono® Aubonne, Suiza), variando desde 100 hasta 225 UI por día, dependiendo de la maduración folicular. La dosis inicial se adaptó de acuerdo con el IMC y la edad. Para los pacientes con una baja respuesta previamente conocida, se aumentó a una dosis máxima de 300-350 UI al día. La maduración folicular se determinó mediante un examen con ultrasonidos desde el sexto día del

ciclo, cada dos días. Se cambió individualmente la cantidad de las gonadotropinas administradas de acuerdo con el tamaño de los folículos. La ovulación fue inducida mediante una inyección de 250 ug de hCG (Ovitrelle; Serono® Aubonne, Suiza) cuando al menos dos folículos excedían los 17 mm de diámetro, y la aspiración del líquido folicular se realizó 36 horas después, mediante una punción transvaginal guiada por ultrasonografía, con sedación intravenosa de rutina. La recogida de los ovocitos se realizó utilizando un escáner de ultrasonidos en tiempo real, bidimensional Sonoace 6000C, equipado con un transductor endovaginal de 4-8 MHz. La recogida de los ovocitos se realizó en medio G-MOPS® (Vitrolife, Göteborg, Suecia).

Métodos de fertilización

Se realizó la fertilización con una inyección de espermia intracitoplasmática (ICSI) en función del estado andrológico (recuento de espermia menor de 15 M/ml), la edad materna (>35) y el número de ciclos de FIV anteriores que el paciente había tenido anteriormente (>2). Los ovocitos seleccionados para la ICSI se habían desnudado con hialuronidasa y se evaluó la madurez. Solamente los ovocitos en metafase II, identificados por la presencia del primer cuerpo polar, se eligieron para la fertilización. La ICSI se realizó 3-6 h después de la recuperación de los ovocitos en el medio G-MOPS®. Los ovocitos restantes se fertilizaron con el método de FIV convencional en un medio tamponado con bicarbonato (G-IVF®, Vitrolife®, Göteborg, Suecia). La fertilización se evaluó 24 horas más tarde en el medio G-1® v5 (Vitrolife®, Göteborg, Suecia).

Las transferencias de embriones se realizaron 3 o 5 días después de la recuperación de los ovocitos. A partir del día 3 hasta el estadio de blastocisto, utilizamos el medio G-2® v5 (Vitrolife®, Göteborg, Suecia) complementado con albúmina de suero humano (HSA, Vitrolife®, Göteborg, Suecia) con una concentración de 5 mg/ml. De acuerdo con la petición del paciente, transferimos uno, dos o tres embriones. La crioconservación de los embriones restantes se llevó a cabo en este estadio de acuerdo con la legislación húngara. El complemento con progestágeno se proporcionó usando 300 mg de progesterona 3 veces al día (Utrogestan; Lab. Besins International S.A.®, Paris, Francia). Para evaluar el éxito del tratamiento, se realizó un examen transvaginal con ultrasonidos, 21 días después de la transferencia de embriones para detectar el saco gestacional. Después, de la transferencia las muestras del medio de cultivo se mantuvieron a -24°C en partes alícuotas de 40 µl hasta la medición.

Análisis de la proteómica

El medio de cultivo no utilizado se cromatografió en una columna Aeris Peptide HPLC (2,1 x 150 mm) utilizando un gradiente de elución y las fracciones se recogieron. Las fracciones que contenían proteínas de interés se establecieron con 10 ejecuciones consecutivas y se liofilizaron. La o las proteínas en esa muestra combinada se identificaron por el método de la proteómica. Los puentes disulfuro se redujeron (DTT) y se alquilaron (yodoacetamida) y los polipéptidos se digirieron con tripsina [1]. Los péptidos en la mezcla de reacción se separaron mediante nanoHPLC en una columna EASY (75 µm x 100 mm, C18-3 µm, Thermo Scientific) y se analizaron mediante un espectrómetro de masas MAXIS 4G QTOF conectado en línea, equipado con una fuente de iones ESI CaptiveSpray (Bruker, Bremen). El espectrómetro de masas se manejó en el modo de ciclos de análisis dependiente de datos (DDA) para recoger automáticamente los espectros de fragmentación MS/MS de los 3 iones más abundantes en cada escaneo MS. Los archivos de datos sin procesar se procesaron y las listas de picos MS/MS se produjeron en Broker DataAnalysis 4.0. Las listas de picos se enviaron para realizar una identificación de proteínas a Mascot 2.4 (Matrixscience,) usando Broker Proteinscape 2.1. Se usó la base de datos Swissprot (versión 2013.10, que contenía 541.561 secuencias) para la identificación. Las búsquedas adicionales se realizaron en una base de datos creada en nuestro laboratorio, que contenía todas las variantes de las proteínas HPT_HUMAN y HPTR_HUMAN. Los parámetros de búsqueda utilizados en todos los casos para la identificación eran: 120 ppm y 0,25 Da de precisión para la masa parental y los espectros de fragmentos, respectivamente. La tripsina como enzima para la digestión (suponiendo como máx. 2 sitios de escisión perdidos), la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, y la oxidación de metioninas como modificación variable, se utilizaron para el análisis de datos. Los espectros MS/MS identificados fueron validados manualmente utilizando el programa informático Broker Biotools 3.2.

Disolventes y preparación de patrón interno y muestras

Todos los disolventes utilizados para la solución de patrón interno y la preparación del disolvente de HPLC eran de calidad LC-MS, adquiridos en Molar Chemicals (Molar Chemicals, Hungría). El agua, el acetonitrilo y el ácido fórmico se utilizaron en los disolventes de HPLC.

El cortisol (Sigma-Aldrich, Budapest, Hungría) se utilizó como patrón interno; una solución de 3,86 µm/L se preparó en 20% de metanol. Después de descongelar las soluciones de medios de cultivo, a cada 25 µl de medio se añadieron 5 µl de solución IS y se mezcló con vórtice durante cinco segundos. El volumen de inyección era de 20 µl.

Condiciones de LC-MS

Se utilizó una HPLC analítica Dionex Ultimate 3000 (Dionex Corp., EE.UU.) equipada con un muestreador automático y un termostato de columna ajustado a 30°C. La separación se llevó a cabo en una columna analítica Kinetex C18 2,6 µm, 2,1 x 100 mm (Phenomenex, EE.UU.) con un gradiente de elución de etapas múltiples con un caudal de 200 µl/min. Los disolventes de la HPLC contenían ácido fórmico al 0,1% en 5% (A) y 95% de acetonitrilo

(B) en agua. El perfil del gradiente se describe en la Tabla 1; el tiempo de ejecución total es de 27 minutos.

TABLA 1 Descripción del gradiente de HPLC utilizado en la ejecución de LC-MS.

Tiempo (minutos)	% de A	% de B
0,0	100	0
16,0	60	40
20,0	0	100
21 ^a	100	0

^a Al final de cada ejecución cromatográfica una fase de reequilibrado de seis minutos se insertó para iniciar la nueva ejecución con 100% de concentración de disolvente "A".

El espectrómetro de masas acoplado a la HPLC era un instrumento de masa exacta Bruker micrOTOF equipado con una fuente de ionización por electroespray (ESI) operado en el modo positivo. Los parámetros de la fuente principal eran: voltaje capilar: 4500V, presión del nebulizador: 2,4 bar, gas de secado (N₂): 8 L/min y temperatura de secado: 210°C. Los espectros de masas se recogieron entre 500 m/z y 1500 m/z. La calibración de la masa interna se realizó al comienzo de cada ejecución, utilizando los picos de clústeres de Na⁺ formiato.

Estadística

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa informático de IBM SPSS Statistics versión 20 (IBM Magyarország Kft. Budapest, Hungría). La normalidad del conjunto de datos se investigó utilizando la prueba de Kolmogorov-Smirnov, mientras que las diferencias en la cantidad del fragmento de péptido entre los grupos experimentales (medio incubado en blanco, embriones con éxito y sin éxito) mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba t de Student.

Ejemplo 1. Identificación de proteínas en el medio de cultivo

Las condiciones cromatográficas del gradiente aplicado se resumen en la Tabla 1. Nuestro objetivo principal era encontrar cualquier diferencia cualitativa o cuantitativa entre los medios de incubación de embriones con y sin éxito. Esto se hizo mediante la medición de un número menor de muestras de medios de cultivo de embriones transferidos el día 3 (n = 10) y de embriones transferidos el día 5 (n = 10), todos con un resultado clínico conocido. La mitad de las muestras procedían de embriones con éxito y la otra mitad de embriones sin éxito. Como control se empleó G-1[®] v5 incubado vacío (transferencia 3 días) o G-2[®] v5 (transferencia 5 días) que contenía 5 mg/ml de HSA (n = 4). La incubación de las muestras de control se realizó en paralelo con los embriones en las mismas circunstancias e intervalo de tiempo. No se encontraron diferencias cualitativas, sin embargo se detectaron cuatro polipéptidos que eran diferentes de forma notable, en donde todos ellos diferían en cantidad entre los dos grupos de embriones. Estas moléculas también estaban presentes en las muestras de control en blanco, sin embargo estaban ausentes de G-1[®] v5 y G-2[®] v5 que no contenía HSA. Se detectaron los compuestos a una m/z de 798,9 [M+6H]⁶⁺, m/z 745,1 [M+6H]⁶⁺, m/z 771,9 [M+6H]⁶⁺ y m/z 1149,3 [M+8H]⁸⁺. La deconvolución de los espectros de masas obtenidos revelaba que las masas monoisotópicas de las cuatro moléculas eran 4787,4 Da, 4464,6 Da, 4622,4 Da y 9186,5 Da, respectivamente. La cuantificación se realizó utilizando las áreas de pico (sin unidad de medida) de los correspondientes picos cromatográficos de los iones. Las áreas de pico de los compuestos detectados se estandarizaron usando las áreas de los picos resumidas de los iones de aductos H⁺ y Na⁺ del cortisol IS. Se encontró que los compuestos estaban presentes en las muestras de los embriones sin éxito en un grado 30-60% más elevado que en las muestras de los embriones con éxito, o las muestras de control. Sin embargo, no se observó una diferencia notable entre las muestras de control y las muestras de los embriones con éxito. Una observación similar se hizo en el caso de embriones de 3 días y 5 días, aunque en este último caso la diferencia era solo del 10-30%, dependiendo del compuesto seleccionado. Para averiguar si la diferencia observada era significativa, se realizó la prueba t de Student que puso de manifiesto que solo la molécula de 9186,5 Da difiere significativamente en su cantidad entre los dos grupos de embriones (p = 0,005). Por esta razón, nos concentramos adicionalmente solo en la molécula de 9186,5 Da (Fig. 1).

La siguiente etapa era la identificación de MS/MS del polipéptido de acuerdo con el protocolo descrito en la sección de materiales y métodos. Con una búsqueda en la base de datos utilizando los datos MS/MS, se identificaron dos fragmentos de péptidos asignados a la haptoglobina humana. De acuerdo con la investigación manual de las anotaciones de las secuencias de entradas de la base de datos y con los datos de la bibliografía, la proteína de interés fue identificada por los dos fragmentos MS/MS que resultaron ser la cadena alfa-1 de la haptoglobina. Esta forma de la subunidad alfa-1 de la haptoglobina tiene una masa monoisotópica de 9186,4; todas las secuencias identificadas corresponden a esa región de la proteína precursora de haptoglobina. La cobertura de la secuencia global de la identificación era del 62%. La secuencia completa del fragmento alfa-1 de la haptoglobina con los dos fragmentos de MS/MS identificados con importantes éxitos, se resume en la Tabla 2.

TABLA 2 Identificación de los péptidos asignados a la haptoglobina alfa-1. Las secuencias subrayadas corresponden a los dos fragmentos MS/MS identificados de forma significativa del polipéptido. La identificación se llevó a cabo

sobre una base de datos construida de forma interna de variantes de haptoglobina humana.

P00738 (HPT_HUMAN) haptoglobina VAR_017112 [19-102] (Haptoglobina alfa-1)								
Secuencia			Masa			Puntuación Mascot	Valor esperado	Secuencia peptídica
Inicio	-	Fin	Observada	Mr (esp.)	Mr (calc.)			
VDSGNDVTDIADDGCPKPEIAHGYVEHSVRYQCKNYYKLRTEGDGVYTLNDEKQWINKAVGDKLP ECEAVCGKPKNPANPVQ								
42	-	54	720,9006	1439,787	1439,642	88	1,50E-09	<u>R.TEGDGVYTLNDEK.Q</u>
60	-	76	620,043	1857,107	1856,912	58	1,60E-06	<u>K.AVGDKLPECEAVCGKPK.N</u>

Ejemplo 2. Determinación de la viabilidad de los embriones mediante una medición del fragmento alfa-1 de la haptoglobina humana

5 El análisis ciego que se realizó después de la identificación del fragmento, se llevó a cabo sobre una serie de 80 muestras de embriones transferidos el tercer día. El análisis se realizó sobre un mayor número de muestras de medio de cultivo, compuesto por las muestras de embriones con un resultado clínico desconocido (n = 80) y muestras de control en blanco (n = 10). Solamente se integraron los picos correspondientes a los dos iones de aductos de IS ([M+H]⁺ y [M+Na]⁺) y del ion [M+8H]⁸⁺ del fragmento alfa-1 de la haptoglobina. En esta fase solo se midieron las muestras de los embriones transferidos el tercer día y los controles G-1[®] v5, ya que la transferencia el día tres es más común y se observaba el mismo fenómeno en ambos grupos de muestras (embriones del día 3 y del día 5, controles G-1[®] v5 y G-2[®] v5). Además, es mejor para evaluar la viabilidad del embrión en el estadio más temprano posible del desarrollo de la preimplantación.

15 Los datos de este conjunto de mediciones se utilizaron en paralelo para dos enfoques, en primer lugar para construir una base de datos estadística, y en segundo lugar para poner a prueba la fiabilidad de nuestro método. Este último se hizo mediante el análisis ciego de muestras codificadas que únicamente se resolvieron después de completar la medición, y de que se hubiera establecido un "diagnóstico" bioquímico de si el embrión posiblemente pertenecía al grupo viable o al grupo no viable. Los valores de datos del área de pico en bruto de las muestras se compararon con los valores medidos en medio de control vacío incubado en circunstancias similares a las de las muestras que contenían embriones. Si el área del pico del fragmento de haptoglobina era inferior al valor de 120% medido en el control en blanco, la muestra se clasificaba como viable. Este umbral fue establecido empíricamente. Si el valor medido era superior al 120% del control, el embrión se clasificaba como no viable. Entre las 80 muestras, 32 resultaron ser no viables a través de la caracterización bioquímica y 48 resultaron ser viables. De los 32 embriones clasificados como no viables, no había ni un solo caso en el que la transferencia diera lugar a un parto con éxito. En el grupo en el que los embriones se clasificaron como viables, la tasa de nacimiento era del 54% (Fig. 2). Durante el período de recogida de muestras, nacieron solo tres pares de gemelos, en su caso, ambos embriones transferidos se clasificaron como bioquímicamente viables.

30 El análisis estadístico de los resultados implicaba 90 muestras de embriones y 12 muestras de control en blanco incubado. También se investigó cómo lotes diferentes (n = 10) de HSA afectan al contenido inicial en haptoglobina alfa-1 del medio de cultivo. La normalidad de los datos se sometió a ensayo usando la prueba de una sola muestra de Kolmogorov-Smirnov, que reveló una distribución normal. Posteriormente, se calcularon los valores promedio y la desviación estándar de la cantidad de fragmento alfa-1 de la haptoglobina para los controles, los diferentes lotes de medio de cultivo y todas las muestras de embriones medidos (n = 90) con resultado viable (n = 55) y no viable (n = 35). El análisis de la correlación de la cantidad de fragmento del péptido con el diagnóstico establecido durante las mediciones ciegas, y el análisis de si existen o no diferencias significativas entre los grupos de embriones viables, embriones no viables y de control en blanco, se examinaron utilizando la prueba ANOVA. El valor promedio del fragmento de haptoglobina era 226,4 (CV 7,9%) en las muestras de control, pero 240,9 (CV 23,5%) en las muestras de los embriones viables y 378,8 (CV 25,4%) en las muestras de los embriones no viables. La prueba ANOVA reveló una diferencia significativa entre los dos grupos de embriones (p <0,001) y una correlación significativa (p <0,001) entre la cantidad de fragmento del péptido y el resultado de embarazo. La diferencia cuantificada entre estos dos grupos era de 57,2% (Fig. 3). Una diferencia significativa se observó también (p <0,001) entre el grupo medio de control incubado y el grupo no viable, aunque no hubo ninguna diferencia entre el grupo de control blanco incubado y el grupo viable. Las muestras de medio blanco se midieron antes y después de la incubación, pero no se observó ninguna diferencia significativa. Sin embargo, como control se utilizaron muestras de medio blanco incubado.

45 Diez lotes diferentes de medios de cultivo también se midieron después de una incubación concurrente en las mismas circunstancias. Estas mediciones no se incluyeron entre los controles utilizados en las estadísticas descritas anteriormente. El valor promedio del área del pico del fragmento alfa-1 de la haptoglobina en los diez medios procedentes de diferentes lotes después de la incubación, era de 257,3 (CV 8,9%). El valor del pico mínimo era 213 mientras que el máximo 283. (Datos no presentados).

Ejemplo 3. Determinación de la viabilidad de los embriones mediante la medición del potencial reductor del medio de cultivo de embriones agotado

Los patrones analíticos de disulfuro de glutatión (GSSG), glutatión (GSH) y ácido mercapto-succínico se adquirieron en Sigma-Aldrich Kft. (Budapest, Hungría). El ácido mercapto-succínico no estaba disponible como disulfuro; la solución de la forma reducida, se sometió a una oxidación con aire (26), una reacción espontánea que formaba un disulfuro a partir de cualquier compuesto que contenía grupos tiol. La eficacia de esta reacción se detectaba mediante espectrometría de masas directa con ionización por electroespray (ESI). La solución de ácido mercapto-succínico utilizada en los experimentos contenía 84% de disulfuro de ácido mercapto succínico y 16% de la forma reducida original.

A 25 μ l de los medios de cultivo agotados anteriormente descritos de embriones viables (n = 10) y no viables (n = 10), se añadieron 5 μ l de una solución 8 pmol/ μ l de GSSG (40 pmol), o μ l de una solución 7,5 pmol/ μ l de pmol de ácido mercapto-succínico (34,6 pmol de disulfuro y 2,9 pmol de la forma reducida). Para control servía una solución de G1+HSA (n = 5+5) vacía, preparada de la misma manera. Con el fin de evitar la auto-oxidación de GSH (27) o el ácido mercapto succínico reducido, se añadió tiosulfato de sodio 100 pmol a cada solución. La solución se incubó durante tres días, en condiciones idénticas a las de los embriones fertilizados *in vitro*. Después de la incubación, las muestras se midieron mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC MS), el cortisol se utilizó como patrón interno.

Resultados:

Las mediciones de LCMS revelaron que después de tres días de incubación se producía una disminución significativa de GSSG (p = 0,001) o de disulfuro de ácido mercapto-succínico (p <0,001) en las muestras del grupo de embriones no viables, en comparación con el grupo de control o el grupo viable. De forma paralela, también se observó un aumento cuantitativo en la cantidad de GSH y ácido mercapto-succínico reducido. Los resultados se resumen en la Figura 5. La diferencia cuantificada de la cantidad de GSSG en las muestras del grupo de no viables era un 29% menor, en comparación con el grupo de viables y un 37% menor que el grupo de control. La diferencia cuantificada en la cantidad de ácido mercapto-succínico oxidado era un 25% menor en comparación con el grupo de viables y un 35% menor con el grupo de control.

Conclusiones:

La especificidad del potencial de reacción responsable de la reducción del enlace disulfuro dentro de la molécula de haptoglobina que daba lugar al aumento de formación del fragmento alfa-1, no solo se limita a la haptoglobina, sino también a otros disulfuros. En circunstancias clínicas actuales, sin embargo, estas reacciones no se pueden utilizar para evaluar la viabilidad del embrión directamente, ya que el uso de tiosulfato sódico, un reactivo que se une al oxígeno no permite detectar esas reacciones como indicadores de la viabilidad de un embrión. En un entorno con el oxígeno agotado, las células de mamífero no se pueden desarrollar, por no mencionar las consecuencias desconocidas de compuestos adicionales que están presentes en el medio de incubación aprobado. Sin el uso de tiosulfato sódico ambos compuestos tienden a sufrir una autooxidación durante el tiempo de incubación, lo que enmascara la reducción del enlace disulfuro. Por alguna razón, el enlace disulfuro reducido dentro de la molécula de haptoglobina que conecta la cadena alfa-1 de la haptoglobina con el resto de la proteína, no tiende a autooxidarse, el fragmento alfa-1 formado permanece estable dentro del medio de cultivo del embrión.

Sin embargo, el formato tal y como se describe en este ejemplo es fácilmente adaptable a los ensayos de la vida real. Aunque el presente ejemplo empleaba 3 días de tiempo de incubación, se llevaron a cabo experimentos adicionales con períodos de incubación significativamente más cortos (datos no mostrados) que permitirán que el presente método se aplique en condiciones clínicas reales.

Aplicabilidad industrial

La invención se refiere a métodos *in vitro* para una evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión durante la reproducción asistida. La solución es adecuada para incrementar los embarazos y las tasas de nacimiento en los métodos de fertilización *in vitro*.

Referencias

1. Ferraretti AP, Goossens V, Kupka M, Bhattacharya S, de Mouzon J, Castilla JA et al. European IVF-monitoring (EIM); Consortium, for The European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2009: results generated from European registers by ESHRE. Hum Reprod 2013; 28:2318-31.
2. Fancsoviits P, Toth L, Takacs ZF, Murber A, Papp Z, Urbancsek J. Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. Fertil Steril 2005; 84:881-7.
3. Dawson KJ, Conaghan J, Oстера GR, Winston RM, Hardy K. Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non-arrested embryos, increases development to the fetal heart stage. Hum Reprod 1995; 10(1):177-82.

4. Scott R, Seli E, Miller K, Sakkas D, Scott K, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study. *Fertil Steril* 2008; 90:77-83.
5. Kovalevsky G, Patrizio P. 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* 2005; 84:325-30.
6. Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008; 14:679-90.
7. Cortezzi SS, Cabral EC, Trevisan MG, Ferreira CR, Setti AS, Braga DP et. al. Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium. *Reproduction* 2013; 145:453-62.
10. 8. Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology* 2007; 68(Supl 1):77S-83S.
9. Singh R, Sinclair KD. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology* 2007; 68(Supl 1):56S-62S.
15. 10. Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril* 2013; 99:1062-72.
11. Polticelli F, Bocedi A, Minervini G, Ascenzi P. Human haptoglobin structure and function a molecular modelling study. *FEBS J* 2008; 275:5648-56.
12. Cigliano L, Spagnuolo MS, Abrescia P. Quantitative variations of the isoforms in haptoglobin 1-2 and 2-2 individual phenotypes. *Arch Biochem Biophys*. 2003 416:227-37.
20. 13. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. 2011, 91:151-175.
14. Darcel CL, Kaldy MS. Further evidence for the heterogeneity of serum albumin. *Comp Biochem Physiol B* 1986; 85:15-22.
25. 15. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev* 2011; 91:151-75.
16. Ye, Bin et al., Haptoglobin- Subunit As Potential Serum Biomarker in Ovarian Cancer: Identification and Characterization Using Proteomic Profiling and Mass Spectrometry. *Clinical Cancer Research*, 9, (2003) 2904-2911.
17. Keegan DA et al.: "P-229", *Fertility and Sterility*, 86, (2006), S219.
30. 18. Brill A, Torchinsky A, Carp H, Toder V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16:512-9.
19. Quinn P. *Culture Media, Solutions, and Systems in Human TRA* Cambridge University Press, 2014.
20. *Manual of Assisted Reproductive Technologies and Clinical Embryology* JP Medical Ltd., 2012.
21. Bungun M, Humaidan P, Bungun L. Recombinant human albumin as protein source in culture media used for IVF: a prospective randomized study *Reproductive BioMedicine Online* 20024 (3) 233-236.
35. 22. Karpova, MA, Moshkovskii, SA, Toropygin, IY and Archakov, AI, Cancer-specific MALDI-TOF profiles of blood serum and plasma: Biological meaning and perspectives. *Journal of Proteomics* 73 (2010) 537 - 551.
23. Gebauer M, Skerra A. "Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics". *Curr Opin Chem Biol* 13 (3) (Junio 2009) 245-255.
40. 24. Wild D. *The Immunoassay Handbook, Fourth Edition: Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques* Elsevier Science, 2013.
25. Gosling, JP *Immunoassays: A Practical Approach* Oxford University Press; 2000 (48, 49).
26. Jose Luis Garcia Ruano, Alejandro Parraa, Jose Alemána. Efficient synthesis of disulfides by air oxidation of thiols under sonication. *Green Chem.*, 2008 10:706-711.
45. 27. Isabella Squellerioa, Donatella Carusob, Benedetta Porroa, Fabrizio Vegliaa, Elena Tremolia, Viviana Cavalcaa. Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2012 71:111-8.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Pecsí Tudományegyetem
- 5 <120> Evaluación de la viabilidad de embriones humanos cultivados *in vitro* usando marcadores de proteína del medio de cultivo.
- <130> 01537
- 10 <140> 14462005.1
<141> 18-07-2014
- <160> 3
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
<211> 83
<212> PRT
- 20 <213> Homo sapiens
- <400> 1
Val Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly Cys Pro
1 5 10 15
Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr
20 25 30
Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr
35 40 45
Thr Leu Asn Asp Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys
50 55 60
Leu Pro Glu Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn
65 70 75 80
Pro Val Gln
- 25 <210> 2
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- 30 <400> 2
Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asp Glu Lys
1 5 10
<210> 3
<211> 17
- 35 <212> PRT
<213> Homo sapiens
- <400> 3
Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro
1 5 10 15
Lys
- 40

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para una evaluación no invasiva de la viabilidad de un embrión que comprende
 - a) la evaluación del potencial reductor de un medio de cultivo de embriones;
 - b) la comparación de dicho potencial reductor con un potencial reductor predeterminado;
- 5 c) la identificación del embrión cultivado en dicho medio como inapropiado para dar lugar a un embarazo con éxito, en donde dicho potencial reductor es superior a dicho nivel predeterminado.
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho potencial reductor se evalúa en la etapa a) mediante un seguimiento durante el cultivo del embrión.
3. El método según la reivindicación 1, en el que dicho potencial reductor se evalúa en la etapa a) en una muestra
10 tomada a partir del medio de cultivo después de la retirada del embrión.
4. El método según la reivindicación 1-3, en el que dicho potencial reductor se evalúa mediante una medición directa.
5. El método según la reivindicación 4, en el que dicha medición directa se realiza con un electrodo redox.
6. El método según la reivindicación 3, en el que dicho potencial reductor se evalúa mediante la detección de la
15 reducción de un compuesto reducible presente en dicha muestra tomada en la etapa a).
7. El método según la reivindicación 3, en el que dicho potencial reductor se evalúa mediante la detección de la reducción de un compuesto reducible añadido a dicha muestra tomada en la etapa a) después de la retirada del embrión.
8. El método según la reivindicación 6 o 7, en el que dicha muestra tomada en la etapa a) se mantiene en
20 condiciones que permiten que dicho compuesto reducible se reduzca.
9. El método según la reivindicación 6-8, en el que dicho compuesto reducible contiene al menos un enlace disulfuro.
10. El método según la reivindicación 9, en el que dicho compuesto reducible se selecciona a partir del grupo que consiste en macromoléculas, péptidos y moléculas pequeñas, y preferiblemente es haptoglobina, disulfuro de glutatión (GSSG), ácido mercapto-succínico oxidado o mercapto-butanol oxidado.
- 25 11. El método según la reivindicación 6-10, en el que el potencial reductor se indica mediante una cantidad detectable de una forma reducida de dicho compuesto reducible.
12. El método según la reivindicación 1-5, en el que el potencial reductor se indica mediante un valor numérico de potencial redox.
13. El método según la reivindicación 1, en el que dicho potencial reductor predeterminado se determina mediante
30
 - i) el cultivo de un grupo de embriones en medio de cultivo de embriones;
 - ii) una evaluación del potencial reductor del medio de cultivo de cada uno de los embriones en dicho grupo;
 - iii) una correlación retrospectiva del potencial reductor evaluado en la etapa ii) de cada medio de cultivo de embriones para el éxito de embarazos que son el resultado de una implantación de los embriones cultivados en dicho medio de cultivo; y
- 35 iv) una determinación de dicho potencial reductor predeterminado como el nivel más elevado de potencial reductor con el que se había observado un embarazo con éxito.
14. El método según la reivindicación 13, en el que dicha evaluación en la etapa ii) se realiza mediante una medición directa o mediante una detección de la reducción de un compuesto reducible.
- 40 15. El método según la reivindicación 14, en el que dicha evaluación en la etapa ii) se realiza mediante una detección de la reducción de un compuesto reducible y dicho nivel más alto de potencial reductor en la etapa iv) se indica por la falta de capacidad de detección de la reducción de dicho compuesto reducible.

Figura 1

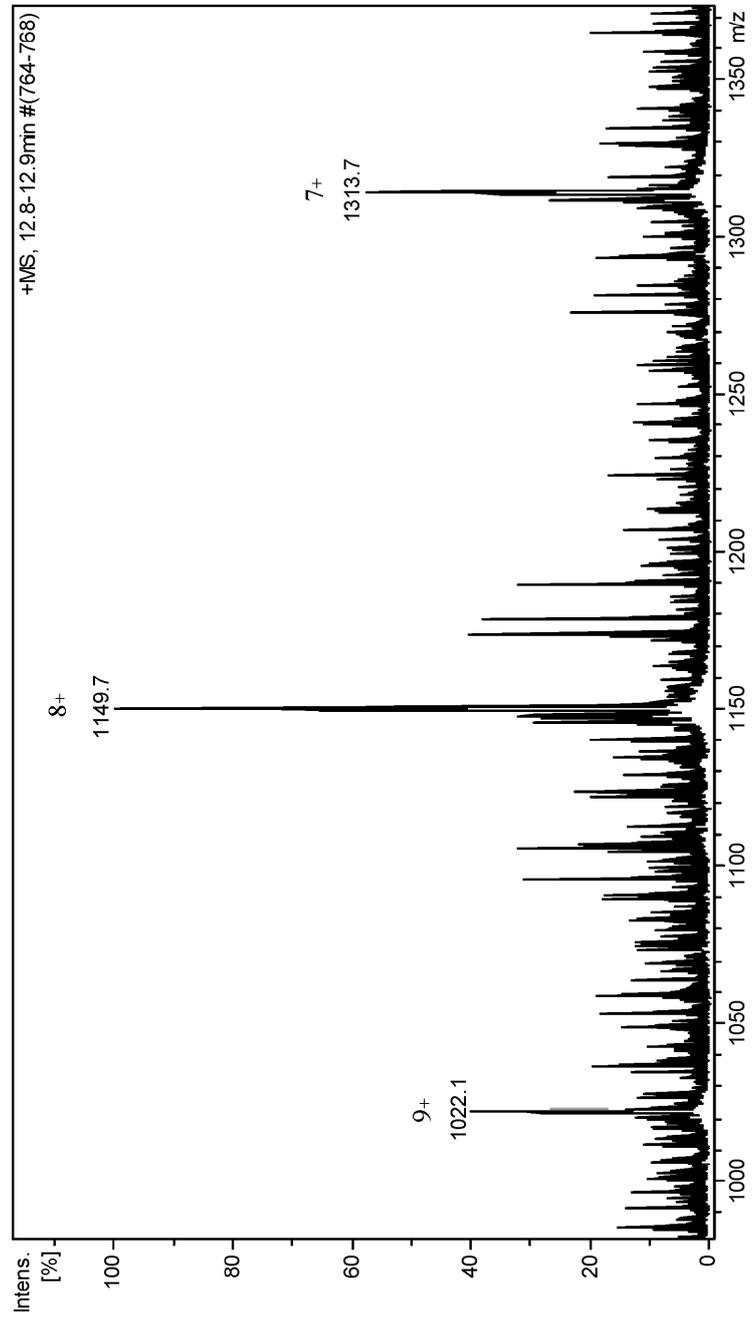


Figura 2

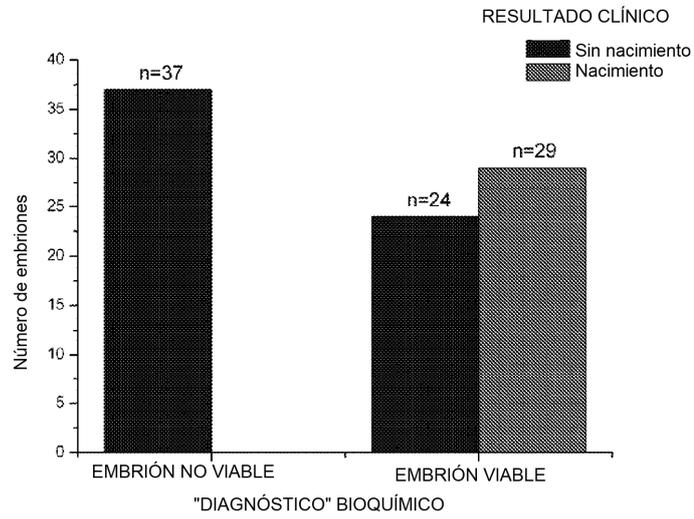


Figura 3

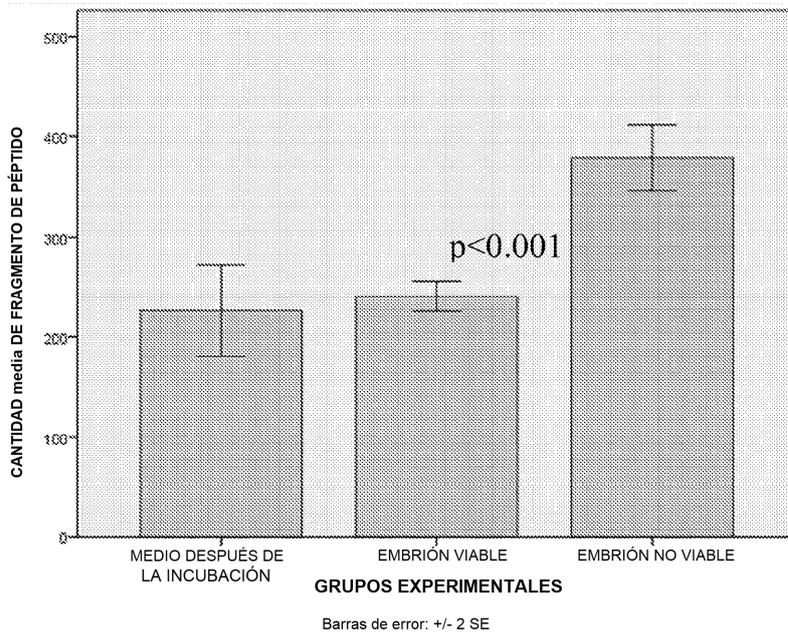


Figura 4

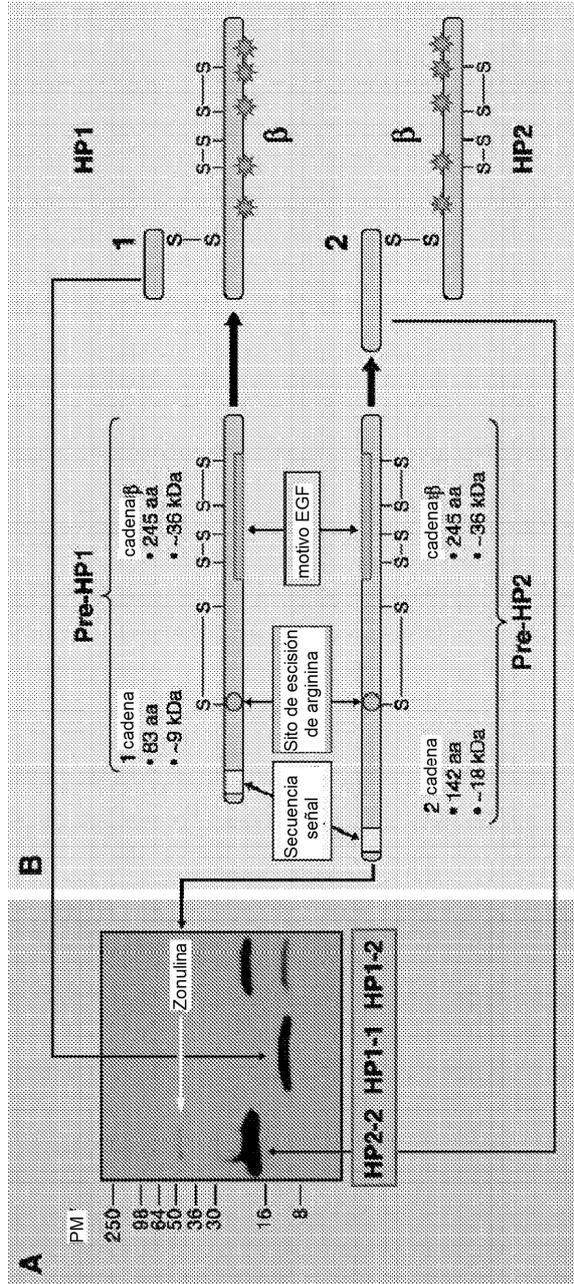
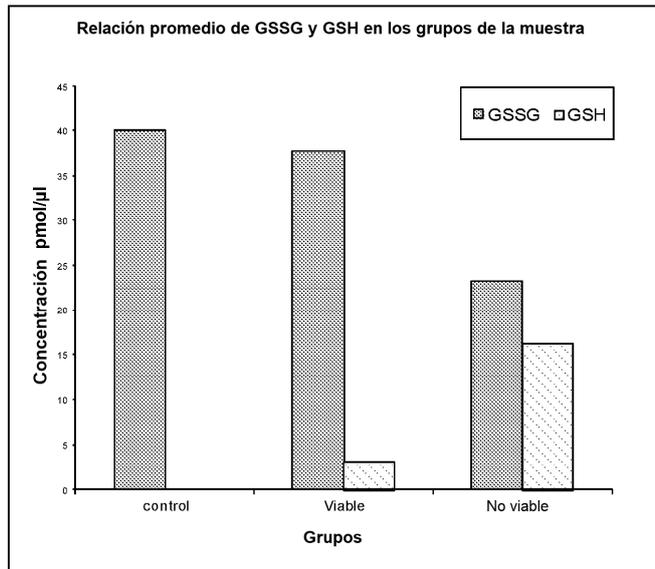


Figura 5

A



B

