

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 918**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6883** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2014 PCT/EP2014/062895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14202696**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2014 E 14731624 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3011047**

54 Título: **Métodos para determinar la calidad de un embrión**

30 Prioridad:

**18.06.2013 EP 13305820**

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

**29.11.2018**

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (25.0%)  
101, rue de Tolbiac  
75013 Paris , FR;  
UNIVERSITE DE MONTPELLIER (25.0%);  
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE MONTPELLIER (25.0%) y  
INSTITUT REGIONAL DU CANCER DE MONTPELLIER (25.0%)**

72 Inventor/es:

**HAMAMAH, SAMIR;  
EL MESSAOUDI, SAFIA;  
THIERRY, ALAIN y  
ASSOU, SAID**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 691 918 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Métodos para determinar la calidad de un embrión

**5 Sector de la técnica**

La presente invención se refiere en líneas generales a los campos de medicina reproductiva. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para determinar la calidad de un embrión.

**10 Estado de la técnica**

Actualmente, no hay un procedimiento genético o no genético disponible en el mercado fiable para determinar la calidad de un embrión durante tecnología de reproducción asistida (ART). De forma destacable, sigue habiendo un problema esencial para determinar si un embrión puede producir descendencia viable cuando se transfiere a un entorno uterino apropiado. Otro problema importante es determinar el perfil genético de un embrión que hará que el desarrollo del feto e incluso después del niño sea viable.

La selección de embriones con un potencial de implante mayor es uno de los retos principales en la tecnología de reproducción asistida (ART). Inicialmente, se usaba transferencia de múltiples embriones (MET) para maximizar las tasas de embarazo. Sin embargo, la calidad mejorada del embrión y la elevación de las tasas de embarazos múltiples ha provocado disminuciones en el número de embriones para el reemplazo. Por lo tanto, la selección del "mejor" embrión ha llegado a ser crucial, particularmente siendo enormemente recomendable la transferencia selectiva de un único embrión (SET). Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevas estrategias objetivo para la selección de embriones. Los métodos clásicos para seleccionar embriones sanos en condiciones de IVF e ICSI se basan en criterios morfológicos subjetivos tales como el grado de fragmentación y la presencia de multinucleación, la cantidad y tamaño de blastómeros, la escisión embrionaria prematura (Ebner *et al.*, 2003; Fenwick *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren que los embriones con aspecto morfológico apropiado únicamente no son suficientes para predecir un implante satisfactorio. Considerando la limitación de la evaluación morfológica y los métodos de cribado citogenético, ahora hay un movimiento hacia tecnologías más sofisticadas de alto rendimiento y la aparición de la ciencia "ómica", tal como transcriptómica y metabolómica. Estas estrategias se centran en una diversidad de células corporales, así como el medio de cultivo embrionario. Una estrategia indirecta y atractiva para predecir los resultados de embriones y embarazos se ha presentado por nuestro equipo usando datos transcriptómicos de expresión génica de células del cúmulo (CC) (Assou *et al.*, 2011; Assou *et al.*, 2008). Se observó que no hay relación entre los aspectos morfológicos del embrión y el perfil de expresión génica de CC (Assou *et al.*, 2010). Otros estudios presentaron que el perfil metabolómico del medio de cultivo usado por espectroscopia de Raman o de infrarrojo cercano (NIR) se correlaciona con el potencial reproductor de embriones individuales (Seli *et al.*, 2007; Vergouw *et al.*, 2008). Demostraron también que el perfil metabolómico del medio de cultivo de embriones era independiente de la morfología.

Otra causa principal de la tasa de implante reducida es una mala calidad genética del embrión implantado. Por ejemplo, la mayoría de los residuos y pérdidas embrionarias están causadas por aneuploidías (anomalías en el número de cromosomas) que con mortales y se producen en aproximadamente un 60 % de todos los abortos espontáneos y muertes fetales. Otras anomalías genéticas incluyen aneuploidía cromosómica, amplificación, translocación, inserción/eliminación, inversión, polimorfismos de repeticiones cortas en tándem, polimorfismos de microsatélites, polimorfismos de un único nucleótido (SNP) y otras anomalías estructurales. Las anomalías genéticas pueden causar muchas enfermedades fenotípicas y algunas son incluso mortales. Si se producen anomalías genéticas en embriones, muchos tipos de afecciones prenatales y enfermedades congénitas tienen probabilidad de desarrollarse. El cribado de estas anomalías por diagnóstico genético preimplante (PGD) es muy importante para asegurar una selección de embrión estructuralmente normal e implante viable. Sin embargo, los métodos actuales son invasivos y pueden causar perjuicio al embrión.

Se informó de que el ADN sin células puede detectarse en líquidos biológicos tales como sangre, líquido ascítico, orina, líquido amniótico, heces, saliva o líquido cefalorraquídeo. Diversos ácidos nucleicos tales como ADN, ARN, miARN se aislaron, de hecho, y se detectaron en formas sin células. Se encontró ADNsc en cantidad detectable en sujetos sanos, así como, en mayor cantidad, en algunos trastornos patológicos (cáncer, infarto de miocardio, enfermedad autoinmunitaria, septicemia, traumatismo, etc.) o estado fisiológico específico (esfuerzo intenso, etc.). Los mecanismos de liberación de ADNsc son muy poco conocidos, pero se ha sugerido que la necrosis, la apoptosis, la fagocitosis o la liberación activa podrían estar implicadas. El análisis de ADNsc es un área de investigación activa en el campo de diagnóstico especialmente en dos áreas que se somete a un alto escrutinio en este momento. El documento EP 1944611 divulga un método para determinar la calidad del embrión midiendo el nivel de MICA en el medio de cultivo del embrión o sobrenadante. El documento WO 2013/056002 divulga el uso de miARN para evaluar embriones cultivados *in vitro*.

## Objeto de la invención

La presente invención se basa en el drástico descubrimiento de la presencia de cantidad de ácidos nucleicos sin células en el medio de cultivo donde se cultiva el embrión en condiciones de fertilización *in vitro*. Los autores de la invención demuestran que el nivel de dichos ácidos nucleico sin células en el medio de cultivo es informativo sobre la capacidad del embrión de dar lugar a un embarazo. Además, los autores de la invención demuestran que el análisis de dichos ácidos nucleicos sin células, hacen que la detección y expresión de una expresión génica de secuencia específica sea posible y abre una vía para el desarrollo de un método no invasivo para el perfil genético de un embrión.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* no invasivo para determinar la calidad de un embrión, que comprende las etapas que consisten en i) proporcionar una muestra del medio de cultivo donde se cultiva el embrión, preparándose dicha muestra cuando el embrión ha alcanzado la fase de blastocisto correspondiente al día 5 o 6 del desarrollo del embrión; ii) extraer ácidos nucleicos sin células de la muestra; iii) determinar la concentración de ácidos nucleicos sin células en la extracción de ácido nucleico; iv) comparar la concentración determinada en la etapa iii) con un valor de referencia, correspondiendo dicho valor de referencia a la concentración de los ácidos nucleicos metida en un medio de cultivo en el día 3 de desarrollo del embrión; y v) concluir que el embrión es competente cuando la concentración determinada en la etapa i) es inferior que el valor de referencia. Como se usa en este documento, el término "embrión" tiene su significado general en la técnica y se refiere a un ovocito fertilizado o cigoto. El término "embrión" también se refiere a células en todas las fases del desarrollo desde un ovocito fertilizado o cigoto hasta los 5 o 6 días (fase de blastocisto). Dicha fertilización puede intervenir en las condiciones de fertilización *in vitro* clásicas (cIVF) o en un procedimiento de inyección de espermatozoides intracitoplasmática (ICSI). Los ejemplos de embriones incluyen embriones de 1 células (también mencionados como cigotos), embriones de 2 células, embriones de 3 células, embriones de 4 células, embriones de 5 células, embriones de 6 células, embriones de 8 células, etc., típicamente hasta e incluyendo embriones de 16 células, cualquiera de los cuales puede obtenerse de cualquier manera conveniente, por ejemplo, de un ovocito que ha madurado *in vivo* o de un ovocito que ha madurado *in vitro*. Como se usa en este documento, el término "blastocisto" se refiere a la estructura formada en la embriogénesis prematura de mamíferos, después de la formación de la mórula. Posee una masa celular interior (ICM), o embrioblasto, que posteriormente forma el embrión, y una capa exterior de células, o trofoblasto, que después forma la placenta. El trofoblasto rodea la masa de células interior y una cavidad de blastocisto rellena de líquido conocida como blastocoele. El blastocisto humano comprende 70-100 células. La formación del blastocisto empieza en el día 5/6 después de la fertilización en seres humanos. El ovocito puede resultar de un ciclo natural, un ciclo natural modificado o un ciclo estimulado para cIVF o ICSI. La expresión "ciclo natural" se refiere al ciclo natural por el que la hembra o mujer produce un ovocito. La expresión "ciclo natural modificado" se refiere al proceso por el cual la hembra o mujer produce un ovocito o dos en una estimulación suave de ovario con antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante. La expresión "ciclo estimulado" se refiere al proceso por el que una hembra o mujer produce uno o más ovocitos en estimulación con agonistas o antagonistas de GnRH asociados con FSH o hMG recombinante.

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

Por "determinar la calidad de un embrión" se entiende que el método de la invención tiene como objetivo determinar si un embrión es competente y/o alberga una anomalía genética o una secuencia específica en el contexto de fertilización *in vitro*. El método de la invención permite la evaluación de la capacidad de un embrión de realizar satisfactoriamente cualquiera o ambos en términos de conferir una alta tasa de embarazo y/o producir una persona sana.

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

Como se usa en este documento, la expresión "anomalía genética" se refiere a cualquier evento que pueda existir en el genoma de un individuo (es decir, un embrión) que puede dar lugar a causar enfermedad fenotípica y mortalidad. Las anomalías genéticas incluyen, aunque sin limitación, aneuploidía, translocación, amplificación de un gen/locus, inserciones, eliminaciones, reversiones, polimorfismos de repetición corta en tándem (STR), polimorfismo de microsatélite, polimorfismos de un único nucleótido (SNP), mutaciones genéticas individuales responsables de enfermedades hereditarias o una combinación de las mismas. En particular, cualquier enfermedad genéticamente

transmisible puede detectarse de acuerdo con el presente método. Por ejemplo, una alteración genética puede incluir alteraciones conocidas en uno o más de los genes: CFTR, factor VIII (gen F8), beta-globina, hemocromatosis, G6PD, neurofibromatosis, GAPDH, beta-amiloide y piruvato cinasa. Las secuencias y mutaciones comunes (por ejemplo, polimorfismo de un único nucleótido o SNP) de los genes son conocidas. Pueden detectarse otras anomalías genéticas, tales como las que implican una secuencia que se elimina en un cromosoma humano, se mueve en una translocación o inversión o se duplica en una duplicación de cromosoma, en la que dicha secuencia se caracteriza en un trastorno genético conocido en el material genético fetal. Por ejemplo, la aneuploidía cromosómica, tal como el síndrome de Down (o trisomía del 21), el síndrome de Edwards (trisomía del 18), el síndrome de Patau (trisomía del 13), el síndrome de Turner (45X0), el síndrome Klinefelter (un sujeto masculino con 2 cromosomas X), el síndrome de Prader-Willi y el síndrome de DiGeorge. Puede encontrarse un listado de las anomalías genéticas conocidas en la base de datos OMIM (<http://omim.org/>). Preferiblemente, se determina la calidad de un embrión humano, pero también puede determinarse la calidad de un embrión de otros mamíferos (por ejemplo, primates, perros, gatos, cerdos, vacas, ratones, etc.). Como se usa en este documento, la expresión "ácido nucleico" tiene su significado general en la técnica y se refiere a una secuencia de ácido nucleico codificante o no codificante. Los ácidos nucleicos incluyen ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). El ejemplo de ácido nucleico, por tanto, incluye, aunque sin limitación, ADN, ARNm, ARNt, ARNr, ARNmt, miARN, ARNip, ARNnop y ARNnp. De acuerdo con la invención, el ácido nucleico puede originarse en el núcleo del embrión o en el compartimento mitocondrial del embrión. Por "ácido nucleico sin células" se entiende que el ácido nucleico está liberado del embrión y está presente en el medio de cultivo en el que el embrión se cultiva después de fertilización *in vitro* o inyección de espermatozoides intracitoplasmática (ICSI).

En el método de la invención, la muestra del medio de cultivo se prepara cuando el embrión ha alcanzado la fase de blastocisto correspondiente al día 5 o 6 del desarrollo del embrión. Cualquier método bien conocido en la técnica puede usarse para preparar una muestra del medio de cultivo cuando el embrión se ha cultivado después de fertilización *in vitro* o inyección de espermatozoides intracitoplasmática (ICSI). Una característica esencial de la invención es que el embrión permanece viable durante la preparación de la muestra. No se usa enzima lítica o solución de lisis basada en reactivos químicos para mantener la integridad del embrión. El método de la invención es un método no invasivo perfecto y únicamente depende del hecho de que un embrión puede liberar ácidos nucleicos en el medio de cultivo por un mecanismo aún no determinado.

Cualquier método bien conocido en la técnica puede usarse por los expertos en la materia para extraer el ácido nucleico sin células de la muestra preparada. Por ejemplo, puede usarse el método descrito en el ejemplo. El método de la invención comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel del ácido nucleico en la extracción de ácido nucleico, ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un valor de referencia y iii) concluir que el embrión es competente cuando el nivel determinado en la etapa i) es inferior que el valor de referencia.

La determinación del nivel del ácido nucleico puede realizarse por una diversidad de técnicas bien conocidas en la técnica. En una realización particular, puede realizarse PCR cuantitativa para determinar el nivel de ADN tal como se describe en El Messaoudi *et al.*, 2013; Mouliere *et al.*, 2013; Thierry *et al.*, 2013 y el documento WO 2012/028746. En particular, la determinación del nivel del ácido nucleico puede realizarse como se describe en el ejemplo. En el método de la invención, el valor de referencia consiste en el nivel de los ácidos nucleicos determinado en un medio de cultivo embrionario en el día 3 del desarrollo del embrión. Por consiguiente, la disminución del nivel entre el día 3 del desarrollo del embrión y el día 5 o 6 (fase de blastocisto) indica que el embrión es competente.

En un aspecto de la divulgación, el valor de referencia es un valor umbral o un valor límite que puede determinarse de forma experimental, empírica o teórica. Un valor umbral también puede seleccionarse arbitrariamente basándose en las condiciones experimentales y/o clínicas existentes, como reconocería un experto en la materia. El valor umbral tiene que determinarse para obtener la sensibilidad óptima y la especificidad de acuerdo con la función del ensayo y el equilibrio de beneficio/riesgo (consecuencias clínicas de positivos falsos y negativos falsos). Típicamente, la sensibilidad óptima y la especificidad (y también el valor umbral) pueden determinarse usando una curva de eficacia diagnóstica (ROC) basada en datos experimentales. Preferiblemente, los expertos en la materia pueden comparar los niveles de ácido nucleico con un valor umbral definido. En una realización de la presente divulgación, el valor umbral se obtiene de los niveles de ácidos nucleico (o relación, o puntuación) determinados en un medio de cultivo embrionario derivado de uno o más pacientes que experimentan IVF o ICSI. Además, la medición retrospectiva de los niveles de ácido nucleico (o relación, o puntuaciones) en medios de cultivo embrionario históricos apropiadamente almacenados en una colección de pacientes que experimentan IVF o ICSI puede usarse a la hora de establecer estos valores umbral. Se divulga además en este documento un método que comprende las etapas que consisten en i) detectar al menos una mutación en la extracción de ácido nucleico y ii) concluir que el embrión alberga una anomalía genética cuando se detecta la mutación.

Las técnicas típicas para detectar una mutación en un ácido nucleico en particular ADN o ARNm incluyen, aunque sin limitación, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, técnicas de hibridación, secuenciación, resistencia a exonucleasa, microsecuenciación, extensión en fase sólida usando ddNTP, extensión en solución usando ddNTP, ensayos de oligonucleótidos, métodos para detectar polimorfismos de un único nucleótido tal como hibridación dinámica específica de alelo, reacción en cadena de ligamiento, minisequenciación, "chips" de ADN, hibridación de oligonucleótidos específica de alelo con sondas con marcaje individual o doble combinadas con PCR

o con balizas moleculares, y otras.

Típicamente, las mutaciones se detectan después de amplificación. Por ejemplo, el ARN aislado puede someterse a transcripción inversa y amplificación acopladas, tal como transcripción inversa y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), usando cebadores oligonucleotídicos específicos que son específicos para un sitio mutado o que posibilitan la amplificación de una región que contiene el sitio mutado. De acuerdo con una primera alternativa, las condiciones para la hibridación de cebador pueden elegirse para asegurar una transcripción inversa específica (cuando sea apropiado) y la amplificación; de modo que la aparición de un producto de amplificación sea un diagnóstico de la presencia de una mutación particular. De lo contrario, el ARN puede transcribirse de forma inversa y amplificarse, o puede amplificarse el ADN, después de lo cual puede detectarse un sitio mutado en la secuencia amplificado por hibridación con una sonda adecuada o por secuenciación directa, o cualquier otro método apropiado conocido en la técnica. Por ejemplo, puede clonarse un ADNc obtenido de ARN y secuenciarse para identificar una mutación.

En particular, la secuenciación representa una técnica ideal que puede usarse en el contexto de la presente invención. Los expertos en la materia están familiarizados con varios métodos para secuenciar polinucleótidos. Estos incluyen, aunque sin limitación, secuenciación de Sanger (también mencionado como secuenciación con dideoxi) y diversos métodos de secuenciación por síntesis (SBS) como se revisa por Metzger (Metzger ML 2005, Genome Research 1767), secuenciación por hibridación, por ligamiento (por ejemplo, documento WO 2005/021786), por degradación (por ejemplo, patentes de Estados Unidos n.º 5622824 y 6140053), secuenciación en nanoporos. Preferiblemente, en un ensayo combinado, se prefiere secuenciación profunda. La expresión "secuenciación profunda" se refiere a un método de secuenciación de una pluralidad de ácidos nucleicos en paralelo. Véase, por ejemplo, Bentley *et al.*, Nature 2008, 456:53-59. Las plataformas disponibles en el mercado principales producidas por Roche/454 (Margulies *et al.*, 2005a), Illumina/Solexa (Bentley *et al.*, 2008), Life/APG (SOLiD) (McKernan *et al.*, 2009) y Pacific Biosciences (Eid *et al.*, 2009) pueden usarse para secuenciación profunda. Por ejemplo, en el método 454, el ADN a secuenciar se fracciona y se le suministra adaptadores o segmentos de ADN que pueden amplificarse por PCR usando cebadores que contienen los adaptadores. Los adaptadores son oligómeros de 25 nucleótidos requeridos para la unión a microesferas de captura de ADN y para hibridar la emulsión de cebadores de amplificación por PCR y el cebador de secuenciación. Los fragmentos de ADN se hacen monocatenarios y se adhieren a microesferas de captura de ADN de una manera que permite que únicamente un fragmento de ADN se adhiera a una microesfera. A continuación, las microesferas que contienen ADN se emulsionan en una mezcla de agua en aceite que provoca microrreactores que contienen solamente una microesfera. Dentro del microrreactor, el fragmento se amplifica por PCR, produciendo un número de copias de varios millones por microesfera. Después de la PCR, la emulsión se descompone y las microesferas se cargan en una placa de pivalización. Cada pocillo de la placa de pivalización puede contener únicamente una microesfera. Se añaden enzimas de secuenciación a los pocillos y los nucleótidos se hacen fluir a través de los pocillos en un orden fijo. La incorporación de un nucleótido produce la liberación de un pirofosfato, que cataliza una reacción que da lugar a una señal quimioluminiscente. Esta señal se registra por una cámara CCD y se usa un programa informático para traducir las señales en una secuencia de ADN. En el método Illumina (Bentley (2008)), se adhieren fragmentos monocatenarios a los que se ha suministrado adaptador a una superficie ópticamente transparente y se someten a "amplificación de puentes". Este procedimiento produce varios millones de grupos, conteniendo cada uno copias de un único fragmento de ADN. Se añaden la ADN polimerasa, cebadores y cuatro nucleótidos terminadores reversibles marcados y se toman imágenes de la superficie por fluorescencia láser para determinar la ubicación y naturaleza de los marcadores. Los grupos de protección entonces se retiran y se repite el proceso durante varios ciclos. El proceso SOLiD (Shendure (2005)) es similar a la secuencia 454, los fragmentos de ADN se amplifican en la superficie de las microesferas. La secuenciación implica ciclos de ligamiento y detección de sondas marcadas. Otras varias técnicas para secuenciación de alto rendimiento se están desarrollando actualmente. Los ejemplos de estas son el sistema Helicos (Harris (2008)), Complete Genomics (Drmanac (2010)) y Pacific Biosciences (Lundquist (2008)). Como este es un campo técnico en desarrollo extremadamente rápido, la aplicabilidad a la presente invención de métodos de secuenciación de alto rendimiento será obvia para un experto en la materia. En este documento se divulga además un método que comprende las etapas que consisten en i) determinar el nivel de al menos una secuencia de ácido nucleico específica, ii) comparar el nivel determinado en la etapa i) con un valor de referencia y iii) concluir que el embrión alberga una anomalía genética cuando el nivel determinado en la etapa i) es diferente del valor de referencia (es decir, inferior o superior dependiendo del ácido nucleico observado).

Determinar el nivel de expresión de un ácido nucleico (en particular un gen, miARN, ARNnp y ARNnop) puede evaluarse por cualquiera de una amplia diversidad de métodos bien conocidos. Típicamente, el ácido nucleico preparado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, aunque sin limitación, análisis de Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa, tales como PCR cuantitativa (TaqMan) y micromatrices de sondas tales como micromatrices de ADN GeneChip™ (AFF YMETRIX). De forma ventajosa el análisis del nivel de expresión de un ácido nucleico implica el proceso de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, por RT-PCR (la realización experimental expuesta en la patente de Estados Unidos n.º 4683202), la reacción en cadena de la ligasa (BARANY, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 88, pág.: 189-193, 1991), la replicación de secuencias automantenida (GUATELLI *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 57, pág.: 1874-1878, 1990), sistema de amplificación transcripcional (KWOH *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, pág.: 1173-1177, 1989), Q-Beta Replicasa (LIZARDI *et al.*, Biol. Technology, vol. 6, pág.: 1197, 1988), replicación por círculo rodante

(patente de Estados Unidos n.º 5854033) o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas para los expertos en la materia. Se prefiere PCR cuantitativa en tiempo real o RT-PCR semicuantitativa. En una realización particular, la determinación comprende hibridar la muestra con reactivos selectivos tales como sondas o cebadores y detectar de ese modo la presencia, o medir la cantidad del ácido nucleico. La hibridación puede realizarse por cualquier dispositivo adecuado, tal como una placa, placa de microvaloración, tubo de ensayo, pocillo, vidrio, columna y similares. Los ácidos nucleicos que muestran complementariedad de secuencia u homología con el ácido nucleico de interés de este documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que dichos ácidos nucleicos no tienen que ser idénticos, sino que típicamente son al menos aproximadamente un 80 % idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferiblemente un 85 % idénticos incluso más preferiblemente un 90-95 % idénticos. En determinadas realizaciones, será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como un marcador detectable, para detectar la hibridación. Una amplia diversidad de indicadores apropiados, son conocidos en la técnica incluyendo ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina). Las sondas y cebadores son "específicos" para el ácido nucleico con el que hibridan, es decir, hibridan preferiblemente en condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondiente a la temperatura de fusión - T<sub>m</sub> - más elevada, por ejemplo, formamida al 50 %, SCC 5x o 6x. SCC 1x es NaCl 0,15 M, Na-citrato 0,015 M). Muchos ensayos de cuantificación están disponibles en el mercado de Qiagen (S.A. Courtaboeuf, Francia) o Applied Biosystems (Foster City, EE. UU.). El nivel de expresión del ácido nucleico puede expresarse como perfil de expresión absoluta o perfil de expresión normalizada. Típicamente, los perfiles de expresión se normalizan corrigiendo el perfil de expresión absoluta del ácido nucleico de interés comparando su expresión con la expresión de un ácido nucleico que no es un ARNm relevante, por ejemplo, constitutivo, que se expresa de forma constitutiva. El ARNm adecuado para la normalización incluye ARNm constitutivos tales como U6, U24, U48 y S18. Esta normalización permite la comparación del perfil de expresión en una muestra, por ejemplo, una muestra del paciente, con otra muestra, o entre muestras de diferentes fuentes.

La sonda y/o los cebadores se marcan típicamente con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radiactiva o cualquier otro marcador conocido en la técnica. Se conocen en la técnica marcadores que generalmente proporcionan (directa o indirectamente) una señal. El término "marcado" pretende abarcar marcaje directo de la sonda y cebadores por acoplamiento (es decir, uniéndose físicamente) una sustancia detectable, así como marcaje indirecto por reactividad con otro reactivo que está marcado directamente. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen, aunque sin limitación, agentes radiactivos o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)).

El valor de referencia puede determinarse como se describe anteriormente y dependerá del ácido nucleico para el que se requiere la determinación del nivel de expresión para concluir que el embrión alberga una anomalía genética o una secuencia específica de ácido nucleico.

Los métodos divulgados en este documento son particularmente adecuados para alcanzar una decisión clínica. En particular, el método como se describe anteriormente, por tanto, ayudará al embriólogo a evitar la transferencia al útero de embriones con un bajo potencial de resultado de embarazo. El método como se describe anteriormente es también particularmente adecuado para evitar embarazos múltiples seleccionando el embrión competente que puede dar lugar a un implante y un embarazo y, por lo tanto, podrían transferirse menos embriones en cada ciclo, produciendo una incidencia disminuida de embarazados múltiples.

Los métodos divulgados en este documento son particularmente adecuados para potenciar el resultado de embarazo de un bebé con un riesgo mínimo de tener una anomalía genética. En este documento se describe además un kit para realizar los métodos como se describe anteriormente, en el que dicho kit comprende un medio para determinar el nivel de ácido nucleico sin células y/o un medio para determinar el nivel de expresión de al menos un ácido nucleico específico y/o un medio para detectar al menos una mutación, un SNP o una secuencia específica en la extracción de ácido nucleico. Típicamente, los kits incluyen sondas, micromatrices de cebadores y micromatrices como se describe anteriormente. Por ejemplo, el kit puede comprender un conjunto de sondas como se define anteriormente, y que pueden estar premarcadas. Como alternativa, las sondas pueden estar sin marcar y los ingredientes para el marcaje pueden incluirse en el kit en recipientes diferentes. El kit puede comprender además reactivos de hibridación u otros reactivos envasados adecuadamente y materiales necesarios para el protocolo de hibridación particular, incluyendo matrices en fase sólida, si fuera aplicable, y patrones. Como alternativa, el kit puede comprender cebadores de amplificación (por ejemplo, cebadores de tallo-bucle) que pueden estar premarcados o pueden contener un resto de purificación por afinidad o adhesión. El kit puede comprender además reactivos de amplificación y también otros reactivos envasados adecuadamente y materiales necesarios para el protocolo de amplificación particular.

La invención se ilustrará además por las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención, que está limitada únicamente por la reivindicación adjunta.

## Descripción de las figuras

**Figura 1: Concentraciones de ADNsc en medio de cultivo de varios embriones de dos pacientes en el día 3.**

**Figura 2: Concentraciones de ADNsc en medio de cultivo de varios embriones de 9 pacientes en el día 5/6.**

**Figura 3: Concentraciones de ADNsc en medio de cultivo de varios embriones de dos pacientes en el día 3 y día 5.** Histograma oscuro, concentración D5/6. Histograma transparente, concentración D3.

**Figura 4A: Diferencia de las concentraciones de ADNsc entre el día 3 y el día 5/6 respecto al grado del embrión.** Histogramas de la serie 1, concentración D3-D5/6 (ng/ml de ADNsc); histogramas de la serie 2, clasificación respecto al grado de crecimiento (1-10). Valores de concentración de ADNsc obtenidos en la serie del embrión del paciente de HSC.

**Figura 4B: Concentraciones de ADNsc respecto al grado del embrión.** Histogramas de la serie 1, concentración día 5/6 (ng/ml de ADNsc), histogramas de la serie 2, clasificación respecto al grado de crecimiento (1 a 10). Valores de concentración de ADNsc obtenidos en la serie del embrión del paciente de HSC.

**Figura 5: Relación entre el ADNsc en medio de cultivo y resultado de embarazo.** Histogramas que comparan la cantidad de ADNsc media en medio de cultivo de embriones en el día 5/6 emitido de pacientes con embarazo positivo y pacientes con embarazo negativo.

**Figura 6A y 6B: Los histogramas muestran los valores de señal de la micromatriz para genes en ovario, testículos, ovocitos MII, embriones del día 3, blastocistos del día 5/6, muestras de trofotodermo y endometrio.** Los datos de la micromatriz de ovocitos MII, embriones del día 3, blastocistos del día 5/6, muestras de trofotodermo y endometrio se obtuvieron de nuestro equipo y los de muestras de ovario y testículos se obtuvieron del Gene Expression Omnibus (GEO) mediante los números de acceso provisionales (GPL570).

## Ejemplo:

### Material y métodos

#### **Procedimiento IVF**

Las mujeres se sometieron a un tratamiento con hormona liberadora de gonadotropina (Gn-RH) largo o protocolos con antagonista, que estuvieron seguidos por estimulación del ovario por hMG (gonadotropina menopaúsica humana) u hormona foliculoestimulante (FSH) recombinante. Cuando al menos tres folículos alcanzaron un diámetro medio de 17 mm en examen por ultrasonido transvaginal, se administraron 5000 IU de hCG. Después, 36 h más tarde los ovocitos se recuperaron por punción transvaginal guiada por ultrasonido. Se usó IVF o ICSI convencional como se indica. La fertilización se confirmó 16 a 20 h después de la inseminación de los ovocitos o microinyección por la presencia de dos pronúcleos distintos en cuerpos de dos polos + en microscopio invertido. Los cigotos entonces se colocaron individualmente en gotas de 30 µl recientes de medio de cultivo (G1.5, Vitolife, Suecia) cubiertas con aceite mineral y se mantuvieron en incubadora Tri-gas, que proporciona un entorno de oxígeno al 5 %. Todos los embriones se cultivaron en gotas individuales en todo momento. Los embriones se colocaron en medio de cultivo extendido y se continuó hasta el día 5. Se usó medio G2.5 (Vitolife, Suecia) para cultivo extendido.

#### **Cuantificación del ADNsc en medio de cultivo**

##### ***Muestreo de medio de cultivo de embriones***

Después de retirar los embriones, el medio de cultivo se colocó individualmente en crioviales marcados y después se marcaron de nuevo con un número de acceso asignado aleatoriamente. Las muestras recogidas se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80 °C. También se recogió una muestra de control incubada en las mismas condiciones sin un embrión. Pueden muestrearse hasta 50 µl del medio de cultivo.

##### ***Extracción de ADNsc***

Para muestras del día 3 o día 5/6, el volumen inicial de 30 µl se completó hasta 200 µl con 170 µl de PBS IX. Para las muestras D5, el volumen inicial de 10 µl se completó hasta 200 µl con 190 µl de PBS IX. Posteriormente, las muestras se manipularon inmediatamente para la extracción del ADN. Se extrajo ADNsc de 200 µl de la muestra usando el minikit de sangre de ADN QIAmp (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el "protocolo de sangre y líquido corporal". Las muestras de ADN se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

### Cuantificación de ADNsc por Q-PCR

La metodología y la descripción de los datos se realizó de acuerdo con las directrices MIQE. Se realizaron amplificaciones por q-PCR al menos por duplicado en un volumen de reacción de 25 µl en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX 96™ usando el programa informático CFX manager™ (Bio-Rad, Hercules, CA). Cada mezcla de PCR estaba compuesta de 12,5 µl de mezcla de PCR (Bio-Rad Supermix SYBR Green), 2,5 µl de cada cebador de amplificación (0,3 pmol/µl), 2,5 µl de agua analizada por PCR y 5 µl de extracto de ADN. El termociclado consistía en tres etapas repetidas: una etapa de activación-desnaturalización con polimerasa de punto caliente de 3 minutos a 95 °C seguida por 40 ciclos repetidos de 95 °C durante 10 segundos y después a 60 °C durante 30 segundos. Se obtuvieron curvas de fusión aumentando la temperatura de 55 a 90 °C con un lector de placa cada 0,2 °C. Se usaron diluciones en serie de ADN genómico de células de placenta humana (Sigma, Múnich, Alemania) como patrón para la cuantificación y su concentración y calidad se evaluaron usando un fluorímetro Qubit® 2.0 (Life Technologies). Cada ejecución de Q-PCR comprendía controles negativos y positivos rutinarios de calidad. Cada muestra se analizó por triplicado y cada ensayo se repitió al menos una vez. Las concentraciones de ADNsc obtenidas se normalizaron a la concentración precisa usando la curva patrón. El coeficiente de variación del valor de concentración debido a la extracción de ADNsc y el análisis de Q-PCR se calculó como un 24 % a partir de dos experimentos (n = 12). La cuantificación de ADNsc en las muestras y la realización de la curva patrón se realizaron usando los sistemas de cebador descritos en la tabla 1 (KRAS B1 inv k con sentido: SEQ ID NO: 1; y KRAS B2 inv k antisentido: SEQ ID NO: 2). El valor de concentración determinado por el ensayo muestra un coeficiente de variación de un 24 %.

**Tabla 1:** Cebadores Intplex para cuantificación de ADNsc

Especie	Gen	Nombre del cebador Intplex	Secuencia de dirección 5-3'	Tm (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
Humana	<i>Kras</i>	KRAS B1 inv k con sentido	CCTTGGGTTTCAAGTTATATG	54,0	67
Humana	<i>Kras</i>	KRAS B2 inv k antisentido	CCCTGACATACTCCAAGGA	59,4	

### Diseño del cebador

Las secuencias y características de los cebadores seleccionados se presentan en la tabla 1. Los cebadores se diseñaron usando el programa informático Primer 3 y todas las secuencias se comprobaron para la hibridación automolecular o intermolecular con el programa informático de plegamiento de ácido nucleico (mfold y oligoAnalyzer 1.2). se realizaron análisis de alineación local con el programa BLAST para confirmar la especificidad de los cebadores diseñados. Los oligonucleótidos se sintetizaron y purificaron en cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) por Eurofins (Ebersberg, Alemania) y se realizó control de calidad de los oligonucleótidos por ionización por desorción con láser asistido por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

El sistema de Q-PCR se diseñó para que pudiera cuantificar una secuencia presente de dos copias del genoma humano. Posibilita la cuantificación altamente específica y sensible de esta secuencia en un alelo. La mayor especificidad se obtiene usando alelo específico con PCR bloqueante usando los mismos cebadores (Mouliere 2011). Este método permite distinguir dos secuencias que tienen únicamente una diferencia de un nucleótido con una relación de mutante/WT de 0,005. Por tanto, detectar y cuantificar una secuencia específica puede corresponder a distinguir una secuencia WT frente a secuencias con una diferencia de unos pocos nucleótidos hasta una diferencia de únicamente un nucleótido tal como en ciencias con una mutación puntual o un SNP. Por lo tanto, la demostración de la cuantificación de ADNsc en medio de cultivo de embriones como se muestra en esta ocasión muestra el potencial de este método para detectar la presencia de una mutación de un único nucleótido, SNP, u otras alteraciones genéticas.

Pueden obtenerse valores de concentración mayores cuando se abordan secuencias repetidas en el genoma nuclear tal como las secuencia line o secuencias mitocondriales.

### Resultados

#### Detección de ADNsc en medio de cultivo de embriones

La secuencia abordada tiene 2 copias por genoma del núcleo de célula diploide. El ADNsc podría detectarse significativamente en medio de cultivo de embriones en D3 o D5/6 (figura 1). El ensayo puede detectar hasta 1,5 ng/ml de medio y, por tanto, se encontró un mínimo de 2 copias GE en el medio de cultivo. Se observó hasta 27 ng/ml de ADNsc o 36 GE en medio de cultivo D5/6 (figura 2). Obsérvese que esos números pueden ser relevantes para el desarrollo del embrión. Por tanto, estos datos revelan la posibilidad de la detección de la presencia de una secuencia de ADN específica (como mucho 2 copias por células diploide) y, por lo tanto, la presencia potencial de alteración genética o epigenética homocigótica o heterocigótica. El ADNsc podría detectarse significativamente en todas las muestras y para cada paciente (figura 2).

Hay intra e intervariación significativa (1 Log) entre muestras, que refuerza que la noción de la dinámica de medición posibilita la comparación entre muestras (figura 3).

**Relación entre ADNsc y resultado de embrión *in vitro***

La relación entre el contenido ADNsc del medio de cultivo de embriones y el desarrollo del embrión *in vitro* también se investigó:

5 La concentración de ADNsc determinada en D3 y D5/6 podría compararse en medio de cultivo de 11 embriones. Como se muestra en la figura 4A, los valores de la diferencia de la concentración de ADNsc entre D3 y D5/6 son crecientes respectivamente con el buen desarrollo del embrión evaluado por criterios morfológicos. Como se presenta en la figura 4B, los valores de concentración de ADNsc son inversamente proporcionales al buen desarrollo del embrión. Por tanto, tanto la disminución de la concentración de ADNsc D5/6 como la concentración D3-D5/6 aparecen como un marcador del desarrollo embrionario *in vitro*.

15 El ADNsc aislado de medio de cultivo de embriones que se desarrolló en embrión de 8 células de buena calidad en el día 3 y que da lugar a la fase de blastocisto en el día 5/6 se seleccionó y dividió en 3 grupos: i) ADNsc de embrión en el día 3 que se desarrolló en blastocisto de buena calidad en el día 5/6 (grado 4AA, 4AB o 4BA, 5AA, 5AB o 5BA) y que da lugar a embarazo, ii) ADNsc de embrión en el día 3 desarrollado en blastocisto de calidad intermedia en el día 5/6 (grado 4BB o 5 BB), iii) ADNsc de embrión en el día 3 desarrollado en blastocisto de mala calidad en el día 5/6 (grado 4CC o 5CC) (véase la tabla 2 para el paciente de HSC). La cantidad de ADNsc en medio de cultivo del embrión en el día 3 que se desarrolló en blastocisto de buena calidad en día 5/6 (grado 4AA, 4AB, 4BA) y que da lugar a embarazo fue 22,16 ng/ml y 2,75 ng/ml en el día 3 y en el día 5/6, respectivamente (88 % de disminución). La variación del valor de ADNsc entre el día 3 y el día 5/6 disminuyó hasta 7,55 ng/ml y 1,80 ng/ml (76 % de disminución) en el grado intermedio y hasta 6,46 ng/ml (día 3) y 3,78 (día 5/6) (41 % de disminución) en el blastocisto que no es de buena calidad (tabla 3). De forma interesante, esta variación es muy baja en el embrión lisado de 8,36 ng/ml (día 3) y 5,57 (día 5/6) (33 % de disminución). Adicionalmente, las cantidades de ADNsc en el medio de cultivo de embriones en el día 5/6 se evaluaron de acuerdo con el resultado del paciente. Se muestra que el ADNsc era mayor en medio de cultivo de embriones en el día 5/6 de pacientes sin embarazo que de pacientes con embarazo (figura 5).

**El ADNsc en medio de cultivo de embriones podría usarse para detectar embriones masculinos**

30 Podrían usarse genes tales como TSPY1 (proteína específica de testículo, 1 ligada a Y) y RPS4Y1 (proteína ribosómica S4, 1 ligada a Y) para revelar el género del embrión. Esto abre una estrategia apropiada para cribar embriones de parejas que se sabe que están en riesgo de una enfermedad ligada al X. Los chips de micromatriz Affymetrix HG-U133P de oligonucleótidos de alta densidad se usaron para investigar la expresión de TSPY1 y RPS4Y1 en muestras XX y XY. Nuestros resultados revelan que TSPY1 y RPS4Y1 pueden demostrar ser biomarcadores valiosos de la determinación del género del embrión por amplificación de las múltiples copias de estos genes (ADNsc) en el medio de cultivo de embriones (figura 6A y 6B). Los métodos pueden aplicables a otros genes ubicados en el cromosoma Y: DDX3Y (polipéptido 3 de secuencia DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), ligado a Y), EIF1AY (traducción eucariota) y gen del cromosoma Y (SRY).

40

Tabla 2: Resultado de ICSI de un paciente (HSC) en relación con el ADNsc detectado en medio de cultivo de embriones. Los datos generados de cada ovocito MII maduro (fertilización, escisión del embrión y desarrollo del blastocisto) se registraron por un embriólogo de acuerdo con los criterios morfológicos de Gardner y Schoolcraft 1999.

Paciente (HSC)	Día 1		Día 2		Día 3		Día 5	Día 6	Día de descenso 3	Día de descenso 5	
	Fertilización	No fertilizado	Número de blastómeros	Uniformidad del blastómero	Número de blastómeros	Uniformidad del blastómero					% de fragmentación
N.º 2	No fertilizado										13,871
N.º 3	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	10 %	7 bl Iguales	Homo.		3CC			6,46
N.º 4	Fertilizado		2P8			2P8					2,938
N.º 5	No fertilizado										4,73
N.º 6	Fertilizado	4 bl Diferentes	±Homo.	30 %	8 bl Diferentes	Homo.	40 %	Lisado			8,365
N.º 7	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	10 %	8 bl Iguales	Homo.	30 %	5BB (Congelación)			12,726
N.º 8	Fertilizado	4 bl Iguales	±Homo.	5 %	8 bl Iguales	Homo.	15 %	Detenido			12,137
N.º 9	No fertilizado										4,255
N.º 10	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	10 %	8 bl Iguales	Homo.	15 %	B1	otro		12,653
N.º 11	No fertilizado										33,647
N.º 12	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	10 %	8 bl Iguales	Heter.	10 %	4AB (Congelación)			13,542
N.º 13	No fertilizado										0,777
N.º 14	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	15 %	8 bl Iguales	Homo.	15 %	B1+	5BB (Congelación)		7,55
N.º 15	Fertilizado	4 bl Diferentes	Homo.	15 %	6 bl Diferentes	Heter.	30 %	B1	4BC (Detenido)		11,167
N.º 16	No fertilizado										6,923
N.º 17	Fertilizado	4 bl Diferentes	±Homo.	20 %	10 bl Diferentes	±Homo.	30 %	3CC (Detenido)			20,515
N.º 18	Fertilizado	4 bl Diferentes	±Homo.	15 %	9 bl Diferentes	Heter.	30 %	4AC	5BA (Congelación)		12,07
N.º 19	No fertilizado										20,988
N.º 20	Fertilizado	5 bl Diferentes	±Homo.	10 %	8 bl Iguales	Homo.	15 %	B1	5BB (Congelación)		75,392
N.º 21	Fertilizado	3 bl Iguales	Homo.	30 %	8 bl Diferentes	Homo.	30 %	B1	5CC (Detenido)		14,219
N.º 22	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	20 %	8 bl Iguales	Homo.	25 %	3BB	3BB (Congelación)		14,083
N.º 23	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	10 %	8 bl Iguales	±Homo.	20 %	iAA (Transfer.)	Positivo		22,168
N.º 24	No fertilizado										6,41

**Tabla 3: Relación entre el ADNsc en medio de cultivo y el desarrollo embrionario *in vitro*.** Se obtuvieron tres grados de blastocistos en el día 5/6 (buena calidad (AA), calidad intermedia (BB) o mala calidad (CC)) de buenos embriones de 8 células en el día 3. Los resultados indican que la variación del ADNsc en medio de cultivo entre el día 3 y el día 5/6 es diferente de acuerdo con el grado del blastocisto.

Paciente (HSC)	Día 1		Día 2		Día 3			Día 5	Día 6	Día de descenso 3	Día de descenso 5
	Fertilización	Número de blastómeros	Uniformidad del blastómero	% de fragmentación	Número de blastómeros	Uniformidad del blastómero	% de fragmentación	Grado	Grado	Concentración de ADNsc (ng/ml)	Concentración de ADNsc (ng/ml)
N.º 23	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	10 %	8 bl ±Iguales	±Homo.	20 %	5AA (Transfer.)	Positivo	22,168	2,755
N.º 14	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	15 %	8 bl Iguales	Homo.	15 %	B1+	5BB (Congel.)	7,55	1,804
N.º 3	Fertilizado	4 bl Iguales	Homo.	10 %	7 bl Iguales	Homo.	15 %		3CC	6,46	3,787

**Referencias:**

Durante toda esta solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

- 5 Antonatos, D., Patsilnakos, S., Spanodimos, S., Korkonikitas, P. y Tsigas, D. (2006). Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci* 1075, 278-81.
- Arnalich, F., Maldifassi, M. C., Ciria, E., Quesada, A., Codoceo, R., Herruzo, R., Garcia-Cerrada, C., Montoya, F., Vazquez, J. J., Lopez-Collazo, E. et al., (2010). Association of cell-free plasma DNA with perioperative mortality in patients with suspected acute mesenteric ischemia. *Clin Chim Acta* 411, 1269-74.
- 10 Assou, S., Boumela, I., Haouzi, D., Anahory, T., Dechaud, H., De Vos, J. y Hamamah, S. (2011). Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Hum Reprod Update* 17, 272-90.
- Assou, S., Haouzi, D., De Vos, J. y Hamamah, S. (2010). Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod* 16, 531-8.
- 15 Assou, S., Haouzi, D., Mahmoud, K., Aouacheria, A., Guillemin, Y., Pantesco, V., Reme, T., Dechaud, H., De Vos, J. y Hamamah, S. (2008). A non-invasive test for assessing embryo potential by gene expression profiles of human cumulus cells: a proof of concept study. *Mol Hum Reprod* 14, 711-9.
- Czamanski-Cohen, J., Sarid, O., Cwikel, J., Lunenfeld, E., Douvdevani, A., Levitas, E. y Har-Vardi, I. (2013). Increased plasma cell-free DNA is associated with low pregnancy rates among women undergoing IVF-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 26, 36-41.
- 20 Destouni, A., Vrettou, C., Antonatos, D., Chouliaras, G., Traeger-Synodinos, J., Patsilnakos, S., Kitsiou-Tzeli, S., Tsigas, D. y Kanavakis, E. (2009). Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. *Acta Cardiol* 64, 51-7.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Wiesinger, R., Puchner, M. y Tews, G. (2003). Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod* 18, 2406-12.
- 25 Patente europea PCT N.º EP2011/065333 AR Thierry y F. Molina, Analytical methods for cell free nucleic acids and application, 5 de septiembre de 2011.
- Fenwick, J., Platteau, P., Murdoch, A. P. y Herbert, M. (2002). Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 17, 407-12.
- 30 Goldshtein H, Hausmann MJ, Douvdevani A. (2009). A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem.* 46(Pt 6):488-94.
- Lazar, L., Rigo, J., Jr., Nagy, B., Balogh, K., Mako, V., Cervenak, L., Mezes, M., Prohaszka, Z. y Molvarec, A. (2009). Relationship of circulating cell-free DNA levels to cell-free fetal DNA levels, clinical characteristics and laboratory parameters in preeclampsia. *BMC Med Genet* 10, 120.
- 35 Li CN, Hsu HL, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. (2003). Cell-free DNA is released from tumor cells upon cell death: a study of tissue cultures of tumor cell lines. *J Clin Lab Anal.* 17(4):103-7.
- Mouliere, F., Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR. (2011). High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *Plos One* 6.
- 40 Mussolin, L., Burnelli, R., Pillon, M., Carraro, E., Farruggia, P., Todesco, A., Mascarini, M. y Rosolen, A. (2013). Plasma cell-free DNA in paediatric lymphomas. *J Cancer* 4, 323-9.
- Schwarzenbach, H., Hoon, D.S.B. y Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* 11, 426-437.
- 45 Seli, E., Sakkas, D., Scott, R., Kwok, S. C., Rosendahl, S. M. y Burns, D. H. (2007). Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 88, 1350-7.
- Thierry, A.R., Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, Del Rio M, Molina F.(2010). Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res* 38, 6159-6175.
- 50 Vergouw, C. G., Botros, L. L., Roos, P., Lens, J. W., Schats, R., Hompes, P. G., Burns, D. H. y Lambalk, C. B. (2008). Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, noninvasive method for embryo selection. *Hum Reprod* 23, 1499-504.
- Wroclawski, M. L., Serpa-Neto, A., Fonseca, F. L., Castro-Neves-Neto, O., Pompeo, A. S., Machado, M. T., Pompeo, A. C. y Del Giglio, A. (2013). Cell-free plasma DNA as biochemical biomarker for the diagnosis and follow-up of prostate cancer patients. *Tumour Biol.* 29 de mayo.
- 55 Yakimovich A, Gumpert H, Burckhardt CJ, Lutschg VA, Jurgeit A, Sbalzarini IF, Greber UF. (2012). Cell-free transmission of human adenovirus by passive mass transfer in cell culture simulated in a computer model. *J Virol.* Sep;86(18)

**60 Listado de secuencias**

<110> Inserm

<120> Métodos para determinar la calidad de un embrión

65

<130> BIO13192-HAMAMAH-AN

<160>2

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1  
<211>21  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 1  
cctggggtt caagtatat g 21

<210>2  
<211> 20  
15 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 2  
20 ccctgacata ctccaagga 20

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* no invasivo para determinar la calidad de un embrión, que comprende las etapas que consisten en:

- 5
- i) proporcionar una muestra del medio de cultivo donde el embrión se ha cultivado, preparándose dicha muestra cuando el embrión ha alcanzado la fase de blastocisto que corresponde al día 5 o 6 del desarrollo del embrión;
  - ii) extraer ácidos nucleicos sin células de la muestra;
  - iii) determinar la concentración de ácidos nucleicos sin células en la extracción de ácido nucleico;
  - 10 iv) comparar la concentración determinada en la etapa iii) con un valor de referencia, correspondiendo dicho valor de referencia a la concentración de los ácidos nucleicos medida en un medio de cultivo en el día 3 de desarrollo del embrión; y
  - v) concluir que el embrión es competente cuando la concentración determinada en la etapa i) es inferior al valor de referencia.
- 15

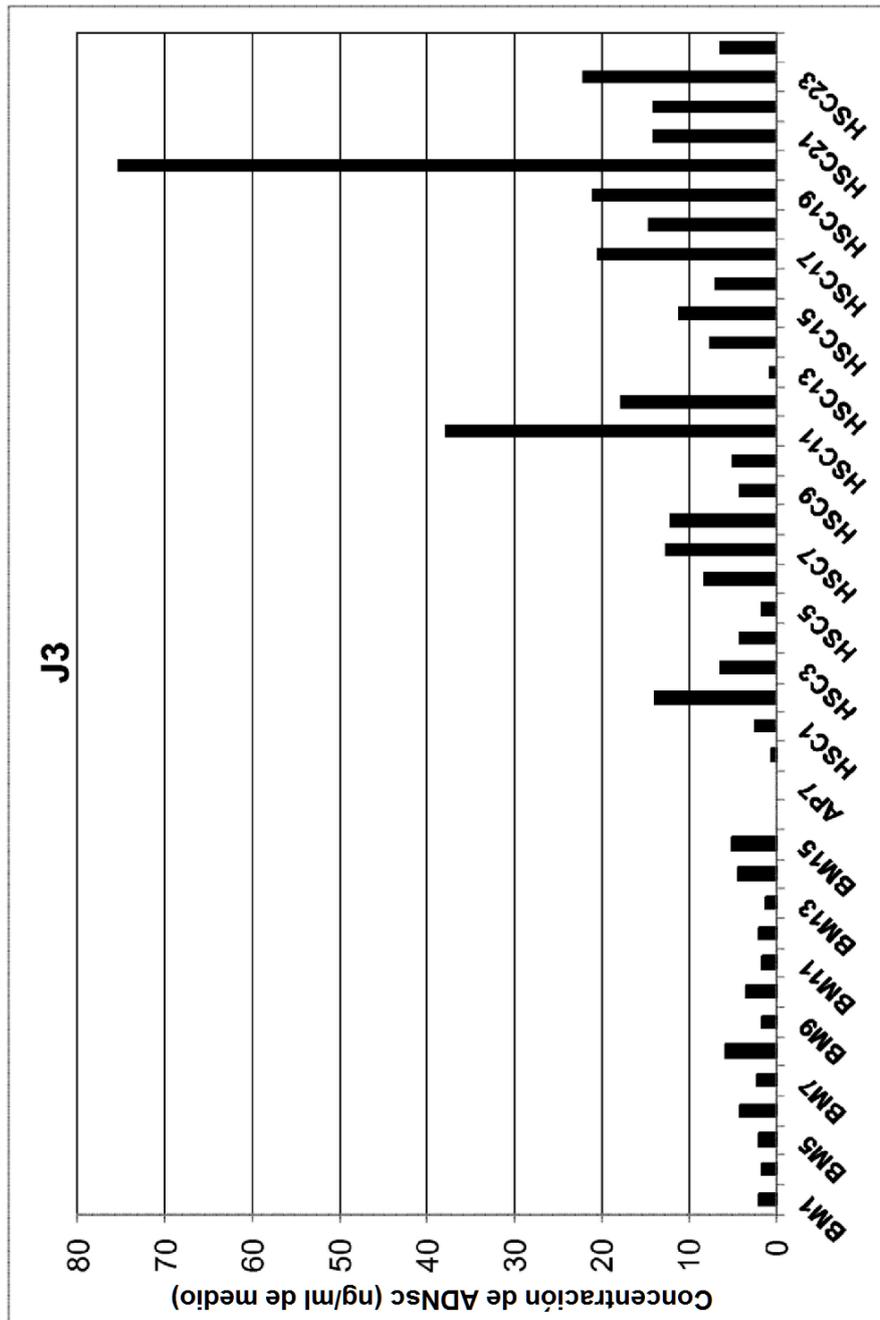


Figura 1

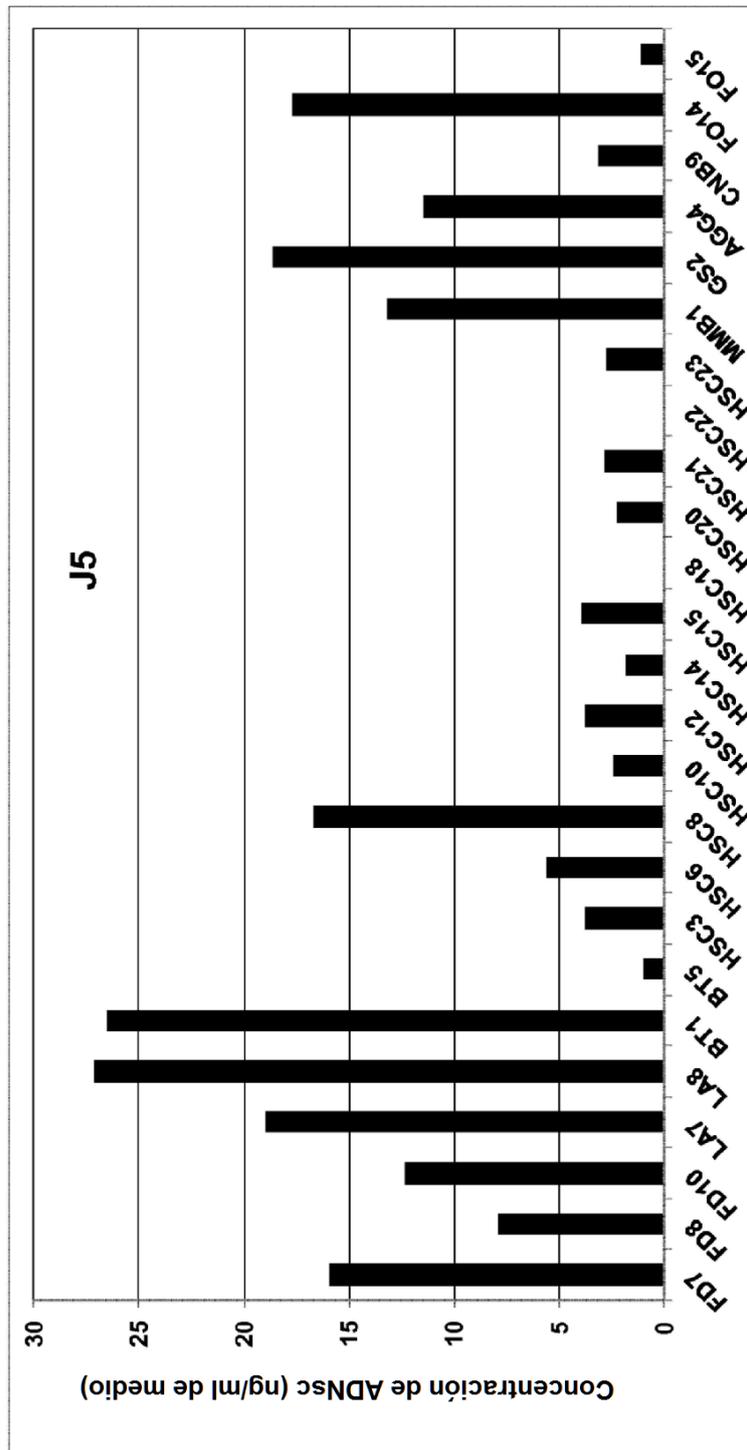


Figura 2

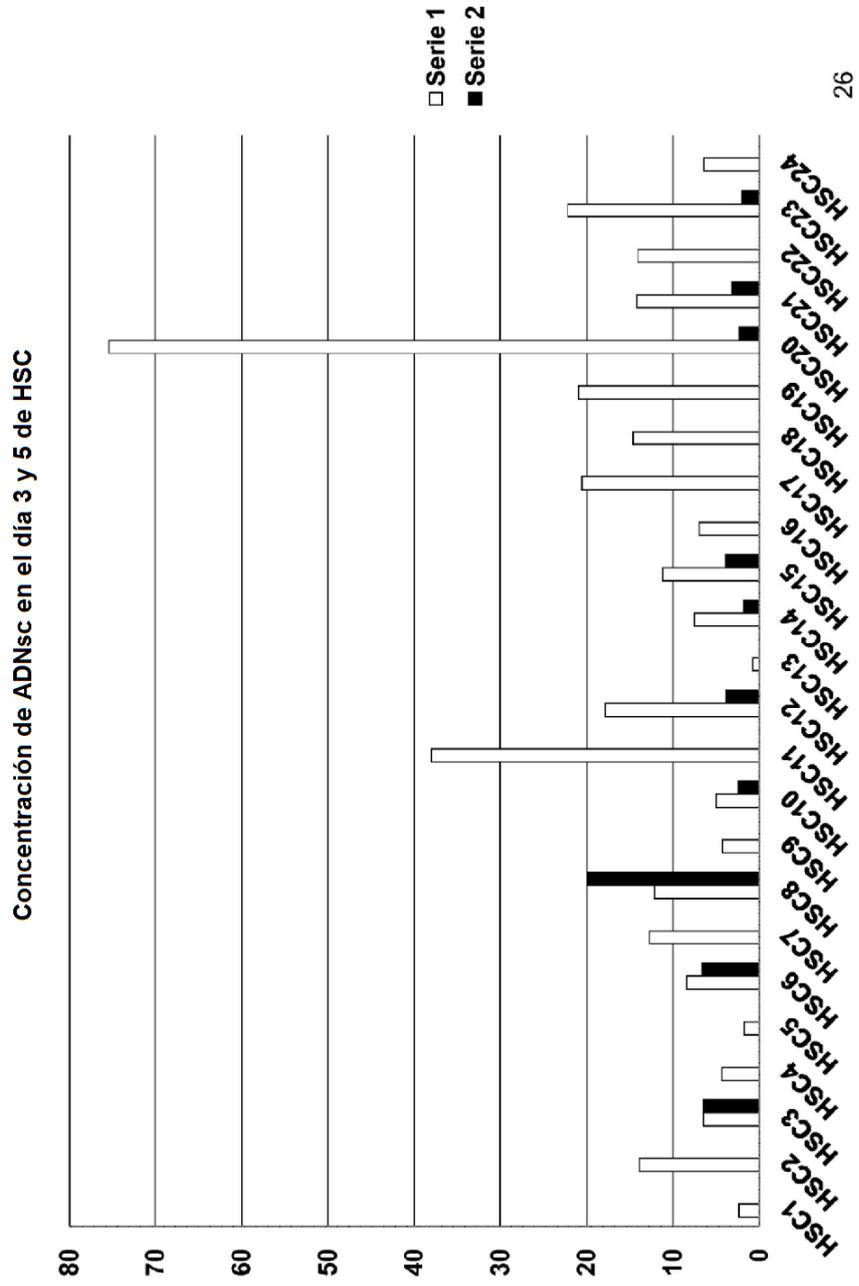


Figura 3

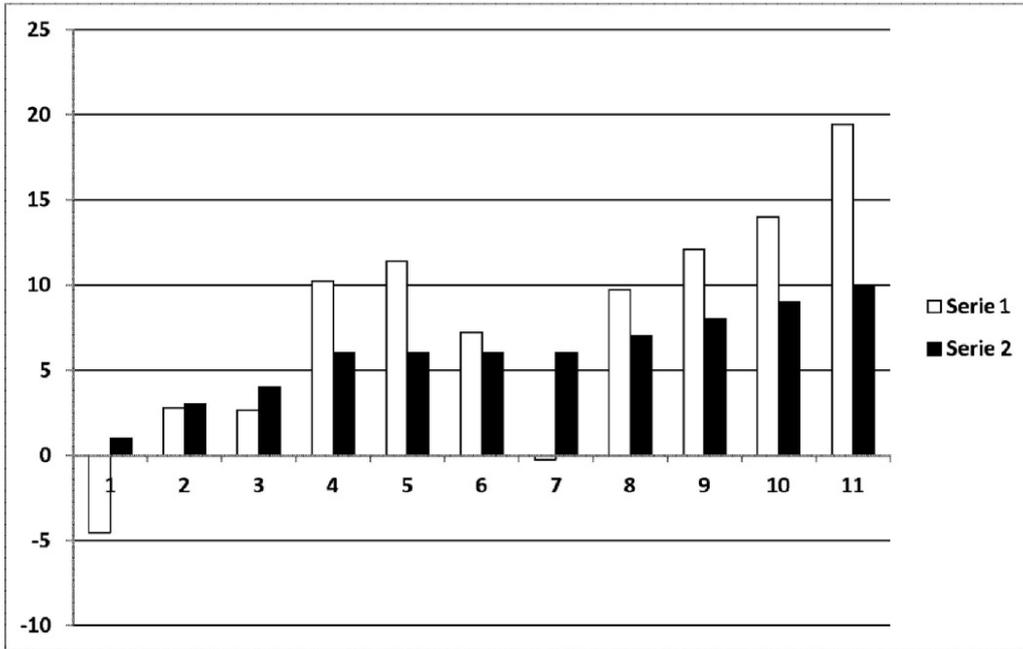


Figura 4A

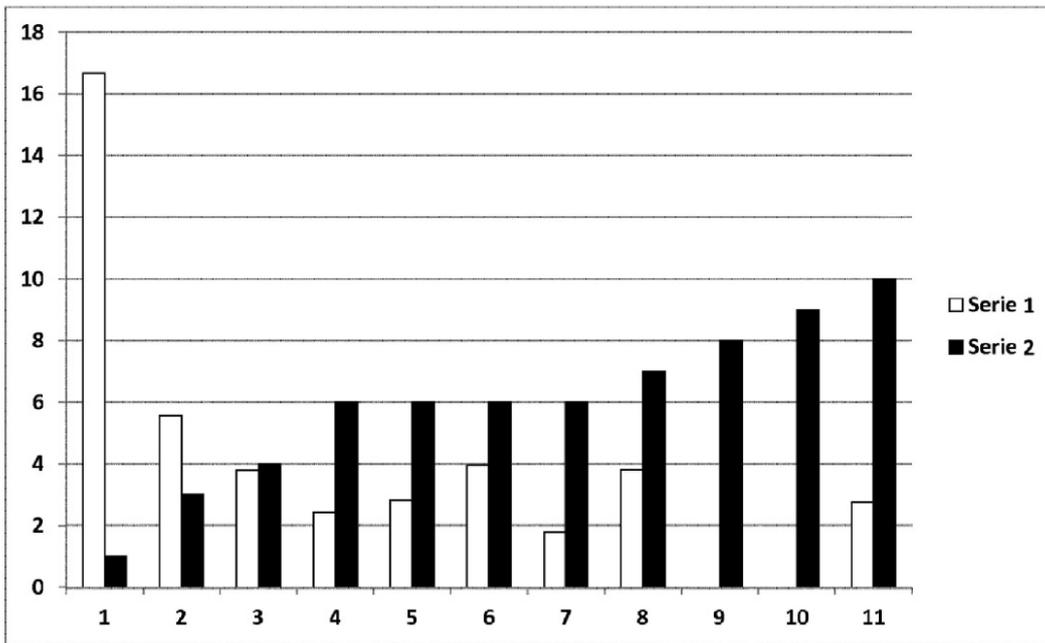
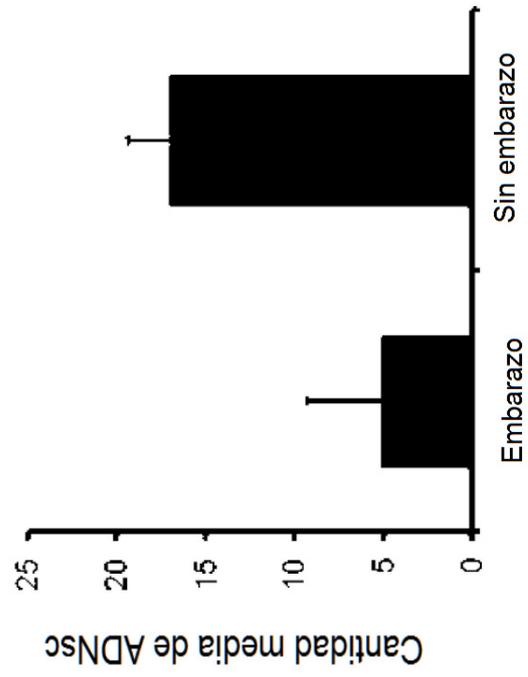


Figura 4B



Paciente	Día 5	
	ADNsc (ng/ml)	Embarazo
HSC	2,75	Si
BT	0,998	Si
AGG	11,4	Si
GS	18,57	No
MMB	13,16	No
LA	18,98	No

Figura 5

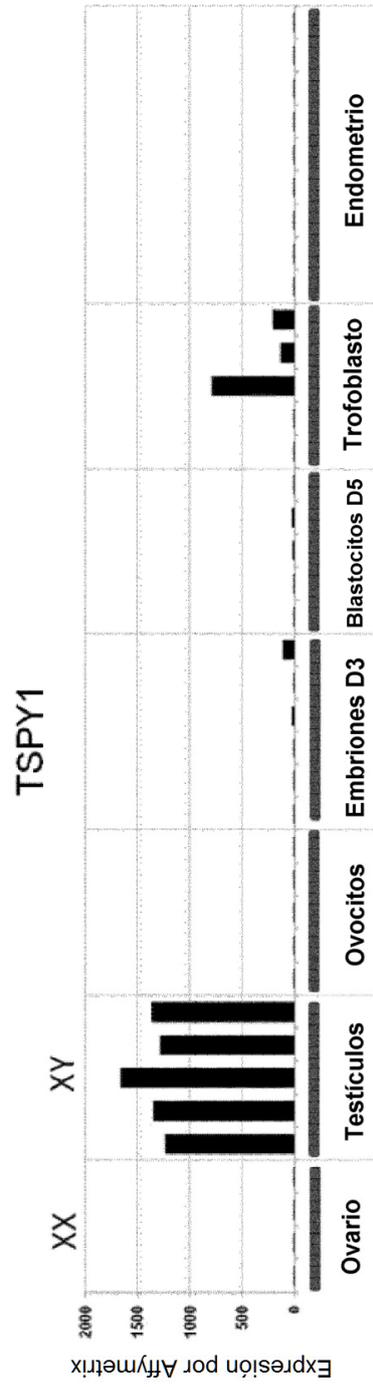


Figura 6A

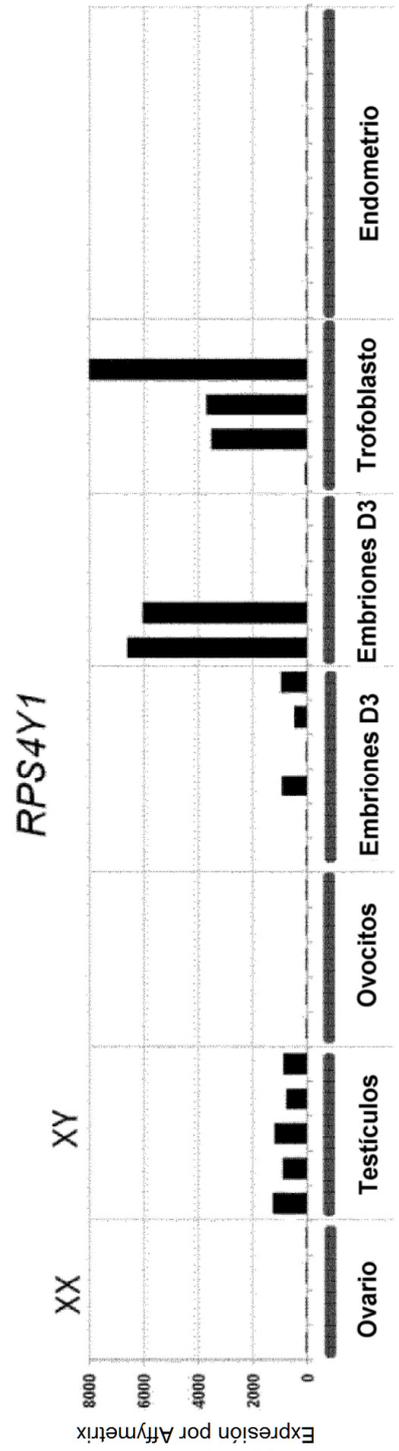


Figura 6B