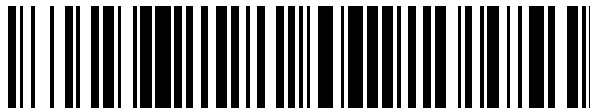


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 808**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2014 PCT/US2014/014466**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14121205**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2014 E 14746042 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2951574**

54 Título: **Medida del desarrollo embrionario y potencial de implantación con parámetros de tiempo y fenotipo de la primera citocinesis**

30 Prioridad:

**01.02.2013 US 201361759607 P**  
**14.03.2013 US 201361783988 P**  
**01.05.2013 US 201361818127 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.11.2019**

73 Titular/es:

**ARES TRADING SA (100.0%)**  
**Zone Industrielle de l'Ourietzaz**  
**1170 Aubonne, CH**

72 Inventor/es:

**SHEN, SHEHUA;**  
**CHEN KIM, ALICE, A.;**  
**WIRKA, KELLY, ATHAYDE;**  
**SURAJ, VAISHALI y**  
**TAN, LEI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 732 808 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

Medida del desarrollo embrionario y potencial de implantación con parámetros de tiempo y fenotipo de la primera citocinesis

**Referencia cruzada con solicitudes relacionadas**

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud provisional de EE. UU. núm. 61/759.607 presentada el 1 de febrero de 2013; Solicitud provisional de EE. UU. núm. 61/783.988, presentada el 14 de marzo de 2013; y Solicitud provisional de EE. UU. núm. 61/818.127, presentada el 1 de mayo de 2013, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

**Campo de la invención**

- 10 Esta invención se refiere al campo de las pruebas biológicas y clínicas, y particularmente la captación de imágenes y evaluación de cigotos/embriones de humanos y animales.

**Antecedentes de la invención**

- 15 La esterilidad es un problema de salud común que afecta al 10-15% de parejas en edad reproductiva. Solo en los Estados Unidos en el año 2006, se realizaron aproximadamente 140.000 ciclos de fecundación in vitro (FIV) (cdc.gov/art). Esto dio por resultado el cultivo de más de un millón de embriones anualmente con potencial variable, y a menudo mal definido, para la implantación y desarrollo a término. La tasa de nacimientos vivos, por ciclo, después de FIV fue solo 29%, mientras que en promedio el 30% de nacimientos vivos se llevaron a cabo en gestaciones múltiples (cdc.gov/art). Las gestaciones múltiples tienen resultados adversos bien documentado tanto para la madre como para los fetos, tales como aborto espontáneo, nacimiento prematuro y baja tasa de nacimientos. Las causas potenciales para el fallo de la FIV son diversas; sin embargo, desde la introducción del FIV en 1978, uno de los principales desafíos ha sido identificar los embriones que son los más adecuados para la transferencia y los que de forma más probable den lugar a un embarazo a término.

- 25 La comprensión en la técnica del desarrollo embrionario básico es limitada ya que los estudios en la biología del embrión humano continúan siendo un desafío y a menudo están exentos de financiación para la investigación. Por consiguiente, la mayoría del conocimiento actual del desarrollo embrionario deriva de estudios de organismos modelo. Los embriones de diferentes especies pasan por similares etapas de desarrollo, sin embargo, el ritmo varía por especies. Estas diferencias y muchas otras hacen inapropiado extrapolar directamente de una especie a otra. (Taft, R.E. (2008) *Theriogenology* 69(1):10-16). Las rutas generales del desarrollo humano, además de los determinantes moleculares subyacentes fundamentales, son únicos para el desarrollo embrionario humano. Por ejemplo, en ratones, la transcripción embrionaria se activa aproximadamente 12 horas después de la fecundación, simultáneo con la primera división por segmentación, mientras que en humanos la activación génica embrionaria (AGE) se da en el día 3, alrededor de la etapa de 8 células (Bell, C.E., et al. (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Braude, P., et al. (1988) *Nature* 332:459-461; Hamatani, T. et al., (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:10326-10331; Dobson, T. et al. (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Además, los genes que se modulan en el desarrollo temprano humano son únicos (Dobson, T. et al. (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470). Además, en otras especies tales como el ratón, más del 85% de los embriones cultivados in vitro alcanzan la etapa de blastocisto, uno de los primeros puntos de referencia principales en el desarrollo de mamíferos, mientras que los embriones humanos cultivados tienen una tasa de formación de blastocistos promedio de aproximadamente 30-50%, con una alta incidencia de mosaicismo y fenotipos aberrantes, tales como la fragmentación y detención de desarrollo (Rienzi, L. et al. (2005) *Reprod. Biomed. Online* 10:669-681; Alikani, M., et al. (2005) *Mol. Hum. Reprod.* 11:335-344; Keltz, M.D., et al. (2006) *Fertil. Steril.* 86:321-324; French, D.B., et al. (2009) *Fertil. Steril.*). A pesar de dichas diferencias, la mayoría de los estudios del desarrollo de embriones de preimplantación derivan de organismos modelo y son difíciles de relacionar con el desarrollo embrionario humano (Zernicka-Goetz, M. (2002) *Development* 129:815-829; Wang, Q. et al. (2004) *Dev Cell.* 6:133-144; Bell, C.E., et al. (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Zernicka-Goetz, M. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16:406-412; Mtango, N.R., et al. (2008) *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 268:223-290).

- 50 Tradicionalmente en las clínicas de FIV, la viabilidad de embriones humanos se ha evaluado por observaciones morfológicas simples tales como la presencia de blastómeros mononucleados de tamaño uniforme y el grado de fragmentación celular (Rijinders PM, Jansen CAM. (1998) *Hum Reprod* 13:2869-73; Milki AA, et al. (2002) *Fertil Steril* 77:1191-5). Más recientemente, métodos adicionales tales como el cultivo extenso de embriones (a la etapa de blastocistos en el día 5) y el análisis del estado cromosómico por medio del diagnóstico genético preimplantación (DGP) se han usado también para evaluar la calidad embrionaria (Milki A, et al. (2000) *Fertil Steril* 73:126-9; Fragouli E, (2009) *Fertil Steril Jun* 21 [EPub antes de la impresión]; El-Toukhy T, et al. (2009) *Hum Reprod* 6:20; Vanneste E, et al. (2009) *Nat Med* 15:577-83). Sin embargo, los riesgos potenciales de estos métodos también existen en que prolongan el periodo de cultivo y alteran la integridad embrionaria (Manipalviratn S, et al. (2009) *Fertil Steril* 91:305-15; Mastenbroek S, et al. (2007) *N Engl J Med.* 357:9-17).

Las patentes de EE. UU. núms. 7.963.906; 8.323.177 y 8.337.387 describen nuevos parámetros de tiempo que incluyen la duración de la primera citocinesis, el intervalo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, el intervalo entre la mitosis 1 y la mitosis 2, el intervalo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 y el intervalo entre la mitosis 2 y la mitosis 3 que son útiles en la selección de embriones con buen potencial de desarrollo que es probable que alcancen la etapa de blastocistos, se implanten en el útero y/o nazcan vivos.

A pesar de los recientes desarrollos en la captación de imágenes secuenciales que permiten a los médicos seleccionar embriones con mayor potencial de desarrollo en base a parámetros de tiempo de los primeros ciclos celulares, la selección embrionaria actual depende principalmente de las evaluaciones morfológicas que son muy subjetivas y ofrecen un valor predictivo limitado de la viabilidad del embrión. El fallo para identificar correctamente los embriones más viables puede llevar al tratamiento FIV fallido o al embarazo con gestación múltiple. La tecnología de captación de imágenes secuenciales permite monitorizar al embrión en tiempo real y proporciona una visión adicional en la biología del desarrollo embrionario humano. Esta tecnología ha permitido la identificación de nuevos fenotipos embrionarios atípicos y nuevos parámetros de tiempo que pueden afectar al desarrollo embrionario incluyendo los nuevos parámetros de singamia descritos en la presente memoria.

### Compendio de la invención

La invención proporciona métodos, composiciones y kits para determinar la probabilidad de que uno o más embriones alcancen la etapa de blastocistos, se conviertan en blastocistos de buena calidad, o se implanten en el útero o nazcan vivos o sean euploides. Estos métodos, composiciones y kits son útiles en métodos para tratar la esterilidad en humanos y otros animales.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para determinar la probabilidad de que un embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero. En algunos aspectos que determinan la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploide se determina deseleccionando con alta especificidad uno o más embriones humanos que no es probable que alcance la etapa de blastocistos, se convierta en un blastocisto de buena calidad, se implante en el útero, nazca vivo o sea euploide en el que al menos aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más o 100% de los embriones humanos deseleccionados no es probable que alcancen la etapa de blastocistos y/o se implanten en el útero y/o nazcan vivos y/o sean euploides. En dichos aspectos, los parámetros celulares de un embrión se miden para llevar a una medida de parámetro celular que puede emplearse para proporcionar una determinación de la probabilidad del embrión de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en un útero y/o ser euploide, cuya determinación puede usarse para guiar una línea de acción clínica. En algunas realizaciones, el parámetro celular es un suceso morfológico que es medible mediante microscopía secuencial. En ciertas realizaciones, el suceso morfológico incluye la determinación de números de células durante los sucesos de división, específicamente, determinar el número de células hijas producidas a partir de un único suceso de división.

En realizaciones particulares, el suceso morfológico es la duración de P1 o primera citocinesis (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular) y/o uno o más fenotipos P1. En una realización particular, los embriones que tienen una P1 o primera citocinesis prolongada (es decir el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular)  $\geq 0,5$  h es menos probable que sean euploides, alcancen la etapa de blastocisto, se desarrollen a un blastocisto de buena calidad y/o se implanten en el útero y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, los embriones que tienen una P1 o primera citocinesis prolongada (es decir el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular)  $\geq 0,5$  h mientras se muestran también uno o más fenotipos P1 anormales (que incluyen, p.ej., plegado de membrana, plegado del oolema con o sin formación de uno o más pseudo surcos de división antes de completarse la primera citocinesis (P1)) es menos probable que sean euploides, alcancen la etapa de blastocistos, se desarrollen a un blastocisto de buena calidad, se implanten y/o nazcan vivos. Estos embriones muestran menor potencial de desarrollo y puede tener menor potencial para implantarse en el útero y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, los embriones que muestran uno o más fenotipos P1 anormales (que incluyen, p.ej., plegado de membrana, plegado de oolema con o sin la formación de uno o más pseudo surcos de división antes de completar la primera citocinesis (P1)) es menos probable que sean euploides, alcancen la etapa de blastocistos, se desarrollen a un blastocisto de buena calidad, se implanten en el útero y/o nazcan vivos y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, los embriones que muestran el plegado de membrana u oolema antes de uno o durante la primera citocinesis (P1) y que tienen un P1 o primera citocinesis prolongada (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular)  $\geq 0,5$  h es menos probable que sean euploides, alcancen la etapa de blastocisto, se desarrollen a un blastocisto de buena calidad, se implanten en el útero y/o nazcan vivos y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, el embrión que muestra plegado de membrana u oolema antes de o durante la primera citocinesis (P1) y que forma uno o más pseudo surcos de división antes de completar la primera citocinesis (P1) es menos probable que sea euploide, alcance la etapa de blastocisto, se desarrolle a un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, los embriones que forman uno o más pseudo surcos de división antes de completar la primera citocinesis (P1) y que tienen un P1 o primera citocinesis prolongada (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup>

5 división celular)  $\geq 0,5$  h es menos probable que sean euploides, alcancen la etapa de blastocistos, se desarrollen a un blastocisto de buena calidad y/o se implanten en el útero y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, los embriones que muestran plegado de membrana u oolema antes de o durante la primera citocinesis (P1), que forman uno o más pseudo surcos de división antes de completarse la primera citocinesis (P1) y que tienen una P1 o primera citocinesis prolongada (es decir el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular)  $\geq 0,5$  h es menos probable que sean euploides, que alcancen la etapa de blastocisto, se desarrollen a un blastocisto de buena calidad y/o se implanten en el útero y por lo tanto se deseleccionan.

10 En algunas realizaciones, además de medir la duración de P1 o primera citocinesis (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular) y/o uno o más fenotipos P1 (p.ej., plegado de membrana, plegado de oolema y/o formación de uno o más pseudo surcos de división antes de completar la primera citocinesis (P1)), se miden uno o más parámetros celulares adicionales que incluyen: la duración de un suceso de citocinesis, p.ej., la duración de la citocinesis 1, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; o el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En algunas realizaciones, el uno o más parámetros celulares es: la duración de un suceso mitótico, p.ej., el intervalo de tiempo entre la mitosis 1 y la mitosis 2; y el intervalo de tiempo entre la mitosis 2 y la mitosis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 se utiliza también como un parámetro celular. En cierta realización, el tiempo entre la fecundación y la etapa de 5 células se utiliza también como un parámetro celular. En ciertas realizaciones se mide el periodo de tiempo entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis. En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se emplea comparándolo con una medida de parámetro celular comparable de un embrión de referencia, y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación de la probabilidad de que el embrión sea euploide, alcance la etapa de blastocisto y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano.

25 En una realización, los embriones se monitorizan para determinar su fenotipo durante la singamia. En realizaciones adicionales, los embriones se deseleccionan ya que es menos probable que alcancen la etapa de blastocisto o se desarrollen a blastocistos de buena calidad o se implanten en el útero o nazcan vivos o sean euploides cuando la singamia es anormal (SA). En una realización particular, se determina que un embrión muestra SA cuando hay un movimiento de PN desordenado, dispersión retardada de las membranas nucleares, movimiento del oolema activo antes de la dispersión de las membranas nucleares y/o un corto periodo de tiempo (p.ej., menos de aproximadamente 2,5 horas, menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 1,5 horas, menos de aproximadamente 1 hora, menos de aproximadamente 30 minutos, o menos de aproximadamente 15 minutos) entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis ( $P_{sin}$ ). Por lo tanto, en una realización, se mide el periodo de tiempo entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis ( $P_{sin}$ ). En una realización particular, los embriones con un corto periodo de tiempo entre la singamia y la primera citocinesis ( $P_{sin}$ ) es menos probable que alcancen la etapa de blastocisto o se implanten en el útero o nazcan vivos o es más probable que sean aneuploides y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, los embriones con un periodo de tiempo más corto entre la singamia y la primera citocinesis ( $P_{sin}$ ) es menos probable que alcancen la etapa de blastocisto o se desarrollen a un blastocisto de buena calidad, o se implanten en el útero o nazcan vivos o es más probable que sean aneuploides. Estos embriones muestran menor potencial de desarrollo y pueden tener menor potencial para implantarse en el útero, nacer vivos y/o puede ser más probable que sean aneuploides y por lo tanto se deseleccionan. En algunas realizaciones, los embriones se deseleccionan ya que es menos probable que alcancen la etapa de blastocisto o se implanten en el útero o nazcan vivos y/o más probable que sean aneuploides cuando  $P_{sin}$  es inmensurable.

45 En algunas realizaciones, además de medir  $P_{sin}$ , u observar la singamia inmensurable o SA, se miden uno o más parámetros celulares adicionales que incluyen: la duración de P1 o primera citocinesis (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular) y/o uno o más fenotipos P1 (p.ej., plegado de la membrana, plegado del oolema y/o formación de pseudo surcos de división antes de completarse la primera citocinesis (P1)); y/o la duración de un suceso de citocinesis, p.ej., la duración de la citocinesis 1, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2; o el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3. En algunas realizaciones, el uno o más parámetros celulares es: la duración de un suceso mitótico, p.ej., el intervalo de tiempo entre la mitosis 1 y la mitosis 2; y el intervalo de tiempo entre la mitosis 2 y la mitosis 3. En ciertas realizaciones, la duración del ciclo celular 1 se utiliza también como un parámetro celular. En cierta realización, el tiempo entre la fecundación y la etapa de 5 células se utiliza también como un parámetro celular. En ciertas realizaciones, la presencia o ausencia de división anormal (DA) y/o división caótica se utiliza como un parámetro celular. En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se emplea comparándola con una medida del parámetro celular comparable de un embrión de referencia, y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación de la probabilidad del embrión de alcanzar la etapa de blastocisto y/o convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o nacer vivo y/o ser euploide. En algunas realizaciones, el embrión es un embrión humano.

60 En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para deseleccionar uno o más embriones humanos con pobre potencial de desarrollo y/o que no es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o no es probable que se conviertan en un blastocisto de buena calidad y/o menos probable que se implanten en el útero y/o es más

probable que sean aneuploides cuando el embrión muestra división anormal (DA). En una realización, el embrión se deselecciona cuando muestra DA1 y/o DA2. En una realización, el embrión se deselecciona cuando muestra DA2.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para seleccionar uno o más embriones humanos que es probable que alcance la etapa de blastocisto o se convierta en un blastocisto de buena calidad o se implante con éxito en el útero o nazca vivo o sea euploide cultivando uno o más embriones humanos en condiciones suficientes para el desarrollo embrionario. En ciertas realizaciones, los embriones se congelan antes del cultivo. En otras realizaciones, los embriones no se congelan antes del cultivo. En ciertas realizaciones, el uno o más embriones humanos se producen por fecundación de ovocitos *in vitro*. En realizaciones adicionales, los ovocitos que se fecundan *in vitro* también se maduran *in vitro* y pueden suplementarse con factores de crecimiento. En ciertas realizaciones, el uno o más embriones humanos que se cultiva en condiciones suficientes para el desarrollo embrionario se capta en imágenes adicionalmente mediante captación de imágenes secuenciales durante una duración suficiente para incluir al menos un suceso de citocinesis o ciclo celular. En una realización particular, la captación de imágenes secuenciales consigue imágenes que se almacenan digitalmente. En una realización, la captación de imágenes secuenciales emplea la iluminación del campo oscuro. En otra realización, la captación de imágenes secuenciales emplea la iluminación del campo claro. En aún una realización adicional, la captación de imágenes secuenciales emplea una combinación de iluminación del campo oscuro y el campo claro. En una realización, la captación de imágenes secuenciales emplea la adquisición en un único plano. En otra realización, la captación de imágenes secuenciales emplea la adquisición en múltiples planos. En una realización, uno o más parámetros celulares se miden por microscopía secuencial. En una realización, el uno o más parámetros celulares es la duración de la primera citocinesis, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda mitosis, el intervalo de tiempo entre la segunda y la tercera mitosis, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, la duración del primer ciclo celular y el tiempo entre la fecundación y la etapa de 5 células. En aún una realización adicional, se selecciona un embrión cuando la duración de la primera citocinesis es aproximadamente 0 a aproximadamente 33 minutos o el intervalo de tiempo entre la mitosis 1 y la mitosis 2 es aproximadamente 7,8 a aproximadamente 14,3 horas, o el intervalo de tiempo entre la mitosis 2 y la mitosis 3 es aproximadamente 0 a aproximadamente 5,8 horas o el intervalo de tiempo entre la primera citocinesis y la segunda citocinesis es aproximadamente 7,8 a aproximadamente 14,3 horas, o el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 es aproximadamente 0 a aproximadamente 5,8 horas, o la duración del primer ciclo celular es aproximadamente 24 horas o el tiempo entre la fecundación y la etapa de 5 células es aproximadamente 47 a aproximadamente 57 horas. En aún una realización adicional, un embrión humano seleccionado por ser más probable que alcance la etapa de blastocisto o se implante en el útero o nazca vivo o sea euploide (es decir, más probable que sea aneuploide) se deselecciona cuando el embrión muestra A1<sup>cit</sup>, SA, SI, DA y/o división caótica.

En algunos aspectos de la invención, se proporcionan métodos para seleccionar los mejores embriones que es más probable que sean euploides, alcancen la etapa de blastocisto, y/o se desarrollen a blastocistos de buena calidad, y/o tengan mayor potencial de desarrollo y/o se implanten en el útero y/o nazcan vivos, cultivando embriones humanos *in vitro*, captando imágenes secuenciales de los embriones para medir los parámetros celulares, empleando los parámetros celulares para determinar la probabilidad de que el embrión alcance la etapa de blastocisto, se convierta en un blastocisto de buena calidad, se implante en el útero y/o nazca vivo y además deseleccionando los embriones que tengan ciertos otros parámetros celulares que hagan menos probable que el uno o más embrión humano alcance la etapa de blastocisto, se implante en el útero y/o nazca vivo y/o sea más probable que sea aneuploide.

### Breve descripción de los dibujos

La invención se entiende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee en conjunto con los dibujos que la acompañan. Se enfatiza que, según la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características están ampliadas o reducidas de forma arbitraria por claridad. Se incluyen en los dibujos las siguientes figuras.

La Figura 1 describe e ilustra la definición de cada uno de los cuatro fenotipos atípicos y describe su prevalencia.

La Figura 2 representa imágenes aún individuales a partir de puntos temporales clave que se dan durante el suceso del fenotipo atípico dinámico, incluyendo un ejemplo de un embrión que muestra más de un fenotipo.

### 50 Descripción detallada de la invención

Antes de describirse los presentes métodos y composiciones, se va a entender que esta invención no está limitada a ningún método o composición particular descrita, como tal, por supuesto, puede variar. Se va a entender también que la terminología usada en la presente memoria es con el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo por las reivindicaciones anexas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima de unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente dicte otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese intervalo está también descrito específicamente. Cada intervalo menor entre cualquier valor expresado o valor intermedio en

- un intervalo expresado y cualquier otro valor expresado o intermedio en ese intervalo expresado está incluido en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden estar independientemente incluidos o excluidos en el intervalo, y cada intervalo donde cualquiera, ninguno o ambos límites estén incluidos en los intervalos menores está también incluido en la invención, está sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo expresado. Cuando el intervalo expresado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos están también incluidos en la invención.
- A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entienden normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan en la presente memoria por referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en conexión con los que se citan en las publicaciones. Se entiende que la presente descripción sustituye cualquier descripción de una publicación incorporada en la medida en que haya una contradicción.
- Debe tenerse en cuenta que como se usa en la presente invención y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a “el péptido” incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, p.ej., polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, etcétera.
- Las publicaciones tratadas en la presente memoria se proporcionan solamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria se va a construir como una admisión de que la presente invención no está autorizada a preceder a dicha publicación debido a la anterior invención. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación real que pueden necesitar confirmarse de forma independiente.
- Los métodos, composiciones y kits para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero. Estos métodos, composiciones y kits se usan en la identificación de embriones in vitro que son los más útiles en el tratamiento de la esterilidad en humanos. Estos y otros objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras leer los detalles de los métodos y composiciones objeto como se describen más completamente a continuación.
- Los términos “potencial de desarrollo” y “competencia de desarrollo” se usan en la presente memoria para referirse a la habilidad o capacidad de un embrión sano o para crecer o desarrollarse. Los términos pueden referirse a la habilidad o capacidad de un embrión sano para alcanzar la etapa de blastocisto, o desarrollarse a un blastocisto de buena calidad o implantarse en el útero, o nacer vivo.
- El término “especificidad” cuando se usa en la presente memoria con respecto a métodos de predicción y/o evaluación se usa para referirse a la habilidad para predecir o evaluar a un embrión para determinar la probabilidad de que el embrión no se desarrolle a un blastocisto evaluando, determinando, identificando o seleccionando embriones que no es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se implanten en el útero. Alta especificidad como se usa en la presente memoria se refiere a cuando al menos aproximadamente 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95% o más, o 100% de los embriones humanos no seleccionados no es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se implanten en el útero. En algunas realizaciones, los embriones que no es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se implanten en una etapa en el útero se deseleccionen.
- El término “embrión” se usa en la presente memoria para referirse tanto al cigoto que se forma cuando dos células gaméticas haploides, p.ej., un ovocito secundario no fecundado y una célula de esperma, se unen para formar una célula totipotente diploide, p.ej., un óvulo fecundado, como al embrión que resulta de las divisiones celulares inmediatamente posteriores, es decir, división embrionaria, hasta la mórula, es decir, la etapa de 16 células y la etapa de blastocisto (con trofotodermo y masa celular interna diferenciadas).
- El término “blastocisto” se usa en la presente memoria para describir a todos los embriones que alcanzan la cavitación (es decir, la formación de cavidades).
- Los términos “nacido vivo” o “nacimiento vivo” se usan en la presente memoria para incluir, aunque no limitarse a nacimientos sanos y/o cromosómicamente normales (número normal de cromosomas, estructura cromosómica normal, orientación cromosómica normal, etc.).
- El término “detenido” se usa en la presente memoria para referirse a cualquier embrión que no cumple con la definición de blastocisto.
- El término “ovocito” se usa en la presente memoria para referirse a una célula germinativa femenina no fecundada, o gameto. Los ovocitos de la solicitud pueden ser ovocitos primarios, en cuyo caso están situados para pasar por o que están pasando por la meiosis I, u ovocitos secundarios, en cuyo caso están situados para pasar por o que están pasando por la meiosis II.

Por “meiosis” se entiende los sucesos del ciclo celular que dan por resultado la producción de gametos. En el primer ciclo celular meiótico, o meiosis I, los cromosomas de una célula se duplican y se reparten en dos células hijas. Estas células hijas se dividen después en un segundo ciclo celular meiótico, o meiosis II, que no está acompañado por la síntesis de ADN, dando por resultado gametos con un número haploide de cromosomas.

- 5 Por un “ciclo celular mitótico”, se entiende los sucesos en una célula que dan por resultado la duplicación de los cromosomas de una célula y la división de esos cromosomas y la materia citoplasmática de una célula en dos células hijas. El ciclo celular mitótico se divide en dos fases: interfase y mitosis. En la interfase, la célula crece y replica su ADN. En la mitosis, la célula inicia y completa la división celular, repartiendo primero su material nuclear, y después dividiendo su material citoplasmático y su material nuclear repartido (citocinesis) en dos células separadas.
- 10 Por un “primer ciclo celular mitótico” o “ciclo celular 1” se entiende el intervalo de tiempo desde la fecundación a la terminación del primer suceso de citocinesis o primera mitosis, es decir, la división del ovocito fecundado en dos células hijas. En los ejemplos en que los ovocitos se fecundan in vitro, el intervalo de tiempo entre la inyección de gonadotropina coriónica humana (GCH) (normalmente administrada antes de la recuperación del ovocito) a la terminación del primer suceso de citocinesis puede usarse como un intervalo de tiempo sustituto.
- 15 “P1” o “duración de P1” se usa en la presente memoria para referirse al intervalo de tiempo entre la aparición del primer surco de división a la terminación de la 1ª división celular o primer suceso de citocinesis.

El “fenotipo de la 1ª citocinesis” o “fenotipo de P1” se usa en la presente memoria para referirse a las características celulares, bioquímicas y/o morfológicas de un embrión antes de completarse P1 (es decir, las características celulares, físicas, bioquímicas y/o morfológicas de un embrión antes de completarse la 1ª división celular o primer suceso de citocinesis).

- 20 “Fenotipo P1 anormal” o “A1<sup>ci</sup>” se usa en la presente memoria para referirse a sucesos celulares, bioquímicos y/o morfológicos no característicos de un embrión antes de completarse P1 (es decir, antes de completarse la 1ª división celular o primer suceso de citocinesis) cuando se compara con un embrión de referencia o control que tiene una alta probabilidad de alcanzar el blastocisto, convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero.
- 25 “Fenotipo anormal” o “fenotipo P1 anormal” o “A1<sup>ci</sup>” como se usa en la presente memoria incluye el plegado de oolema, plegado de membrana y/o formación de uno o más pseudo surcos de división antes del inicio y/o terminación de P1 (el intervalo de tiempo entre la aparición del primer surco de división a la terminación de la 1ª división celular o primer suceso de citocinesis). Por “plegado del oolema” se entiende un fenómeno cuando la membrana del oolema se vuelve irregular y no lisa por toda su superficie.

- 30 Por un “segundo ciclo celular mitótico” o “ciclo celular 2” o “P2” se entiende el segundo suceso de ciclo celular observado en un embrión, el intervalo de tiempo entre la producción de células hijas a partir de un ovocito fecundado por mitosis y a la producción de un primer conjunto de células nietas a partir de una de esas células hijas (la “célula hija líder”, o célula hija A) por mitosis. P2 también incluye la duración de tiempo que el embrión es un embrión de 2 células, que es la duración de la etapa de 2 células. El ciclo celular 2 puede medirse usando varios sucesos morfológicos que incluyen el final de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2, o el final de la citocinesis 1 y el final de la citocinesis 2 o el comienzo de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 o el comienzo de la citocinesis 1 y el final de la citocinesis 2 o el final de la mitosis 1 y el comienzo de la mitosis 2 o el final de la mitosis 1 y el final de la mitosis 2. Tras la terminación del ciclo celular 2, el embrión consiste en 3 células. En otras palabras, el ciclo celular 2 puede identificarse visualmente como el tiempo entre el embrión que contiene 2 células y el embrión que contiene 3 células.

- 35 Por un “tercer ciclo celular mitótico” o “ciclo celular 3” o “P3” se entiende el tercer suceso de ciclo celular observado en un embrión, típicamente el intervalo de tiempo desde la producción de un primer conjunto de células nietas procedentes de un ovocito fecundado por mitosis y la producción de un segundo conjunto de células nietas a partir de la segunda célula hija (la “célula hija retrasada” o célula hija B) por mitosis. El ciclo celular 3 puede medirse usando varios sucesos morfológicos que incluyen el final de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3, o el final de la citocinesis 2 y el final de la citocinesis 3 o el comienzo de la citocinesis 2 y el comienzo de la citocinesis 3 o el comienzo de la citocinesis 2 y el final de la citocinesis 3 o el final de la mitosis 3 y el comienzo de la mitosis 3 o el final de la mitosis 2 y el final de la mitosis 3 o el comienzo de la mitosis 2 y el comienzo de la mitosis 3 o el comienzo de la mitosis 2 y el final de la mitosis 3. En otras palabras, el ciclo celular 3 puede identificarse visualmente como el tiempo entre el embrión que contiene 3 células y el embrión que contiene 4 células.

Por “primer suceso de división” o “primera división”, se entiende la primera división, es decir, la división del ovocito en dos células hijas, es decir, ciclo celular 1. Tras la terminación del primer suceso de división, el embrión consiste en 2 células.

- 55 Por “segundo suceso de división” o “segunda división”, se entiende el segundo conjunto de divisiones, es decir, la división de la célula hija líder en dos células nietas y la división de la célula hija retrasada en dos células nietas. En otras palabras, el segundo suceso de división consiste tanto en el ciclo celular 2 como el ciclo celular 3. Tras la terminación de la segunda división, el embrión consiste en 4 células.

Por “tercer suceso de división”, se entiende el tercer conjunto de divisiones, es decir, las divisiones de todas las células nietas. Tras la terminación del tercer suceso de división, el embrión consiste típicamente en 8 células.

Por “citocinesis” o “división celular” se entiende esa fase de mitosis en que una célula experimenta la división celular. En otras palabras, es la etapa de mitosis en que el material nuclear repartido de una célula y su material citoplasmático se dividen para producir dos células hijas. El periodo de citocinesis es identificable como el periodo, o ventana, de tiempo entre cuando se observa primero un estrangulamiento de la membrana celular (un “surco de división”) y la resolución de este suceso de estrangulamiento, es decir, la generación de dos células hijas. El inicio del surco de división puede identificarse visualmente como el punto en que la curvatura de la membrana celular cambia de convexa (redondeada hacia afuera) a cóncava (curvada hacia dentro con una marca o hendidura). Esto se ilustra por ejemplo en el panel superior de la Fig. 4 de la patente de EE. UU. núm. 7.963.906 mediante flechas blancas que apuntan a los surcos de división 2. El comienzo del alargamiento celular puede usarse también para marcar el comienzo de la citocinesis, en cuyo caso el periodo de la citocinesis se define como el periodo de tiempo entre el comienzo del alargamiento celular y la resolución de la división celular.

Por “primera citocinesis” o “citocinesis 1” se entiende el primer suceso de división celular después de la fecundación, es decir, la división de un ovocito fecundado para producir células hijas. La primera citocinesis normalmente se da aproximadamente un día después de la fecundación.

Por “segunda citocinesis” o “citocinesis 2”, se entiende el segundo suceso de división celular observado en un embrión, es decir, la división de una célula hija del ovocito fecundado (la “célula hija líder”, o hija A) en un primer conjunto de nietas.

Por “tercera citocinesis” o “citocinesis 3”, se entiende el tercer suceso de división celular observado en un embrión, es decir, la división de la otra hija del ovocito fecundado (la “célula hija retrasada”, o hija B) en un segundo conjunto de nietas.

El término “marcador fiduciario” o “marcador fiducial”, es un objeto usado en el campo de visión de un sistema de captación de imágenes que aparece en la imagen producida, para usar como un punto de referencia o una medida. Puede ser o bien algo situado en o sobre el sujeto de formación de imagen, o una marca o conjunto de marcas en el retículo de un instrumento óptico.

El término “micro-pocillo” se refiere a un recipiente que se dimensiona a una escala celular, preferiblemente para proporcionar acomodo de células eucariotas o un único ovocito o embrión.

El término “seleccionar” o “selección” se refiere a cualquier método conocido en la técnica para mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células como se describe en la presente memoria desde una posición a otra posición. Esto puede incluir, aunque no está limitado a mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células en un pocillo, plato u otro compartimiento o dispositivo para separar el uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células seleccionadas de la invención del uno o más embriones no o deseleccionados de la invención (tal como por ejemplo mover de un área de un pocillo, placa, compartimiento o dispositivo a otra área de un pocillo, placa, compartimiento o dispositivo). Esto puede incluir además mover uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células de un pocillo, placa, compartimiento o dispositivo a otro pocillo, placa, compartimiento o dispositivo. Cualquier medio conocido en la técnica para separar o distinguir el uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células seleccionadas del uno o más embriones, blastocistos u otra célula o células no- o deseleccionados pueden emplearse con los métodos de la presente invención. En una realización, los embriones seleccionados se seleccionan para transferir a un recipiente para la gestación. En una realización, los embriones seleccionados se seleccionan para congelar para una potencial transferencia futura. En otra realización, los embriones se seleccionan para el cultivo continuado. En otra realización, los embriones se seleccionan para evaluación adicional mediante otros métodos tales como pruebas genéticas preimplantación, genómica, proteómica y/o secretómica.

El término “deseleccionado” o “deselección” como se usa en la presente memoria se refiere a embriones con pobre potencial de desarrollo que no se eligen para transferencia o se eligen para la no transferencia. En algunas realizaciones, los embriones deseleccionados no se transfieren al útero.

El término “euploide” se usa en la presente memoria para referirse a una célula que contiene un múltiplo integral del número haploide, o monoploide. Por ejemplo, una célula autosómica humana que tiene 46 cromosomas es euploide, y un gameto humano que tiene 23 cromosomas es euploide. Por “embrión euploide” se entiende que las células del embrión son euploides. Los términos “euploide” y “cromosómicamente normal” se usan en la presente memoria de forma intercambiable.

El término “aneuploide” se usa en la presente memoria para referirse a una célula que contiene un número anormal de cromosomas. Por ejemplo, una célula que tiene un cromosoma adicional y una célula a la que le falta un cromosoma son ambas aneuploides. Por “embrión aneuploide” se entiende que una o más células de un embrión son aneuploides. Los términos “aneuploide” y “cromosómicamente anormal” se usan en la presente memoria de forma intercambiable.



Después de la fecundación ambos gametos contribuyen con un conjunto de cromosomas (contenido haploide), cada uno contenido en una estructura denominada en la presente memoria como un “pronúcleo” (“PN”). Después de la fecundación normal, cada embrión muestra dos pronúcleos (PN), uno que representa el material genético paterno y uno que representa el material genético materno. “Singamia” como se usa en la presente memoria se refiere a la rotura o desaparición de los pronúcleos (PN) cuando los dos conjuntos de cromosomas se unen, dándose en un par de horas antes de la primera citocinesis.

El parámetro de tiempo “P<sub>sin</sub>” o “S” o “P<sub>M1</sub>”, como se usa de forma intercambiable en la presente memoria, se refiere a un parámetro definido por el tiempo desde la singamia al comienzo de la primera citocinesis (es decir, la aparición del primer surco de división citocinético). A veces no es posible visualizar el PN o medir la singamia, dichos embriones se dice que tienen “singamia inmensurable” o “singamia no medible” o “SI” (todos los términos se usan de forma intercambiable). De forma adicional, es posible que un embrión muestre patrones o tiempo de singamia atípica. Dichos embriones se dice que tienen “singamia atípica” o “singamia anormal” o “SA” (los tres términos se usan de forma intercambiable). Los embriones SA muestran movimiento del PN desordenado en el citoplasma sin dispersión rápida de las membranas nucleares y típicamente tienen un P<sub>sin</sub> más corto promedio, cuando se compara con los embriones con singamia normal o “SN”. Esto puede visualizarse por microscopía secuencial cuando los PN se mueven de manera insegura en el citoplasma o bien juntos o de forma separada antes de su desaparición. Los embriones con SA a menudo muestran también movimiento de oolema activo antes de la dispersión de las membranas nucleares. Los embriones con NS por otro lado, muestran la desaparición temprana de PN con una suave dispersión de las membranas nucleares con mínimo o ningún movimiento pronuclear en el citoplasma y movimiento mínimo o ninguno de oolema antes de la dispersión de las membranas nucleares.

El parámetro “DA” como se usa en la presente memoria se refiere a divisiones anormales en las que más de dos células se originan a partir de una única división. Por ejemplo, cuando un blastómero da lugar a más de dos células hijas, el embrión se denomina como un embrión DA o el embrión se dice que representa DA. Por “DA1” se entiende que el fenotipo DA se da en la primera división. En un embrión DA1 una célula única se divide una vez y da lugar a un embrión de tres o más células (p.ej. 1→3 células) (Figura 1 y Figura 2). Por “DA2” se entiende que el fenotipo DA se da en la segunda división. En un embrión DA2, un único blastómero se divide para dar lugar a tres o más células (p.ej. 1→4 células) (Figura 1 y Figura 2) durante la segunda división. Por “DA3” se entiende que el fenotipo DA ocurre en la tercera división. En un embrión DA3, un único blastómero de un embrión de tres células se divide para dar lugar a tres o más células. La DA puede ocurrir en cualquier división, y/o durante más de un suceso de división. Por ejemplo, un embrión DA1 (p.ej., 1→3 células) puede también presentar DA2 (p.ej., 3→5 células).

El fenotipo atípico en la presente memoria denominado como “división caótica” significa un fenotipo de división distinguido por la aparición de división desordenada o comportamiento de división celular mediante la etapa de 4 células. La división caótica puede visualizarse usando la microscopía secuencial cuando las divisiones de la primera célula son erráticas y dan por resultado frecuentemente en blastómeros y/o fragmentos de tamaño irregular.

La transferencia del embrión único es la práctica preferida en el tratamiento de fecundación in vitro, ya que reduce el riesgo de resultados adversos asociado con el embarazo con gestación múltiple. Sin embargo, para mejorar las tasas de embarazo por SET, los embriólogos necesitan herramientas de evaluación fiables para ayudar en la selección de embriones de manera que los embriones con el mayor potencial de desarrollo pueden seleccionarse, mientras que con menores potenciales de desarrollo no se seleccionan o se deseleccionan. Los métodos de selección de embriones actuales se basan en evaluaciones morfológicas, que usan la observación estática del número de células y formas y son altamente subjetivos. Por lo tanto, la evaluación de la morfología ofrece un valor predictivo limitado de la viabilidad embrionaria.

La división anormal o DA surge cuando más de dos células, por ejemplo, tres células, o cuatro células o cinco o más células, se origina a partir de un único suceso de división. Por ejemplo, DA1 surge cuando un embrión de célula única se divide una vez y da lugar a tres células hijas, formando así un embrión de tres células (Figura 1 y Figura 2). DA2 surge cuando un blastómero se divide una vez durante la segunda división para dar lugar a más de dos células hijas (Figura 1 y Figura 2). Aunque es normal que el fenotipo DA se caracterice por la división de una célula en tres células, los fenotipos DA también incluyen la división de una célula en más de tres células, por ejemplo 4 células o 5 o más células. De forma adicional, es importante mencionar que DA2 puede estar presente en un embrión DA1. En dicho ejemplo, DA2 se va a caracterizar por la división de un embrión de tres células en un embrión de cinco o más células durante la segunda división y mediante un suceso de división. La designación numérica que sigue la “DA” se refiere no al número de células en el embrión que muestra DA, sino más bien al suceso de división en que se da la DA. Es decir, los embriones DA1 muestran DA en el primer suceso de división mientras que los embriones DA2 muestran DA en el segundo suceso de división. La detección de patrones DA durante el desarrollo del embrión pre-implantación son útiles en la desección de embriones con bajo potencial de implantación y baja tasa de formación de blastocistos. De forma inversa, la detección de la falta de patrones DA durante el desarrollo del embrión pre-implantación son útiles de forma similar en la selección de embriones que es más probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implanten de forma exitosa en el útero y/o sean euploides.

Como se describe en la presente memoria, los embriones DA1 y DA2 muestran baja tasa de formación de blastocistos y menor potencial de implantación cuando se compara con los embriones sin este fenotipo. Sin

embargo, sorprendentemente, un porcentaje muy alto de embriones DA se considera que tienen buena morfología en el día 3 y por lo tanto pueden seleccionarse para la transferencia o congelación para la transferencia posterior si el fenotipo DA no se identifica por el embriólogo durante el cultivo de embrión pre-implantación. Por lo tanto, de acuerdo con la invención actual, se proporcionan métodos para permitir a los embriólogos que han seleccionado un embrión como que es de alta calidad en el día 3, para deseleccionar embriones con DA y mejorar más las tasas de implantación. Además, se proporcionan métodos para seleccionar un embrión para la implantación en el útero cuando el embrión no presenta DA.

Los fenotipos de división directa se han descrito en la técnica, por ejemplo, por Rubio, et al. (2012) "Limited Implantation Success of Direct-Cleaved Human Zygotes: A Time-Lapse Study", Fertil. Steril., 98:1458-63, y Campbell, et al. (2013) "Modeling a Risk of Classification for Anneuploidy in Human Embryos Using Non-Invasive Morphokinetics", Reprod. Bioemed. Online. Sin embargo, Rubio solo examina la división directa como una función de la duración de tiempo gastado como un embrión de 2 células y ni Rubio ni Campbell enseña o sugiere usar DA como un parámetro de desección de embriones seleccionados de otra forma para tener buen potencial de desarrollo como se describe en la presente memoria.

El foco de patentes y solicitudes anteriores que incluyen las Patentes de EE. UU. núms.: 7.963.906; 8.323.177; 8.337.387 y la Solicitud de PCT núm. WO 2012/163363 cada una se centra principalmente alrededor de los criterios de selección para embriones humanos en la fecundación in vitro. Aunque estas patentes/solicitudes tratan cada una la determinación de si los embriones son buenos o pobres, los parámetros de tiempo descritos en ellas se usan típicamente en la clínica en gran parte para seleccionar embriones con buen potencial de desarrollo. En contraste, los métodos de la actual invención se centran alrededor de los nuevos parámetros, que incluyen, por ejemplo, la duración prolongada de P1 o primera citocinesis (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular)  $P1 \geq 0,5$  h y/o uno o más fenotipos P1 anormales ( $A1^{cit}$ ) (que incluyen, p.ej., plegado de membrana, plegado de oolema y/o formación de uno o más pseudo surcos de división antes de completar la primera citocinesis (P1)) y/o división anormal (DA), que puede usarse para deseleccionar embriones humanos y dirigirlos para la no transferencia en el tratamiento de fecundación in vitro. Estos parámetros pueden usarse solos o en combinación el uno con el otro o parámetros de selección que incluyen parámetros de singamia, y división caótica además de los parámetros de selección descritos en las Patentes de EE. UU. núms.: 7.963.906; 8.323.177; 8.337.387 y Solicitud PCT núm. WO 2012/163363. Por ejemplo, una vez que se determina que un embrión tiene buen potencial de desarrollo mediante los métodos de las Patentes de EE. UU. núms.: 7.963.906; 8.323.177; 8.337.387 y Solicitud PCT núm. WO 2012/163363, ese embrión puede analizarse adicionalmente para los nuevos parámetros P1, DA, SA, SI y/o parámetros de división caótica descritos en la presente memoria para aumentar más la sensibilidad y especificidad de los métodos reivindicados.

Los criterios de desección o fenotipos atípicos de la presente invención incluyen,  $A1^{cit}$  o duración prolongada de P1 o primera citocinesis (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular) donde  $P1 \geq 0,5$  h y/o uno o más fenotipos P1 anormales (que incluyen, p.ej., plegado de membrana, plegado de oolema y/o formación de pseudo surcos de división antes de terminar la primera citocinesis (P1)); SA o singamia anormal, un fenotipo embrionario anormal que implica el comportamiento pronuclear que puede medirse durante el proceso fisiológico denominado singamia, embriones que muestran este tipo de fenotipo se considera que tienen singamia anormal; singamia inmensurable, y el fenotipo del embrión anormal identificado mediante no visualización de los pronúcleos; DA o división anormal que se da cuando un blastómero se divide para dar lugar a más de dos células hija; y división caótica, o comportamiento de división desordenada mediante la etapa de 4 células, a menudo dando por resultado blastómeros y/o fragmentos irregulares. Véase la Figura 1 y la Figura 2. Cualquiera de estos parámetros, DA (p.ej., DA1 y/o DA2),  $A1^{cit}$ , SA, SI y/o división caótica puede usarse solo o en combinación los unos con los otros u otros parámetros celulares que incluyen los parámetros incluidos en la Tabla 1.

Tabla 1: Lista de parámetros

Parámetro	Descripción/referencia que describe el parámetro
P1	Duración de la 1 <sup>a</sup> citocinesis
Fenotipos P1 ( $A1^{cit}$ )	Plegado de membrana, plegado de oolema y/o formación de uno o más pseudo surcos de división antes de completarse la primera citocinesis (P1)
P2	Intervalo entre la 1 <sup>a</sup> y 2 <sup>a</sup> citocinesis (tiempo desde el embrión de 2 células al embrión de 3 células) (fin de la 1 <sup>a</sup> citocinesis al final de la 2 <sup>a</sup> citocinesis) (duración como embrión de 2 células) (t3-t2)
P3	Intervalo entre la 2 <sup>a</sup> y 3 <sup>a</sup> citocinesis (tiempo desde el embrión de 3 células al embrión de 4 células) (final de 2 <sup>a</sup> citocinesis al final de la 3 <sup>a</sup> citocinesis) (duración como embrión de 3 células) (t4-t3) (sincronía entre 3 y 4 células)
$P_{sin}$ o $S$ o $P_{M1}$	Tiempo desde la singamia de la 1 <sup>a</sup> citocinesis (aparición de la primera señal de

Parámetro	Descripción/referencia que describe el parámetro
	división citocinética)
2ce-3C	Final de la 1ª división al principio de la segunda división
3C-4C	Principio de la 2ª división al final de la 3ª división
t5	Tiempo desde ICSI (inseminación) al embrión de 5 células
2Cb	Tiempo desde la inseminación hasta el final de la 1ª división
2Ce	Tiempo desde la inseminación hasta el final de la 1ª división
3C	Tiempo desde la inseminación al principio de la 2ª división
4C	Tiempo desde la inseminación al final de la 3ª división
5C	Tiempo desde la inseminación al principio de la 4ª división
BL	Formación del blastocele
tM	Tiempo desde la fecundación a la mórula
S3	Tiempo desde el embrión de 5 células al embrión de 8 células
t2	Tiempo desde la inseminación al embrión de 2 células
t3	Tiempo desde la inseminación al embrión de 3 células
t4	Tiempo desde la inseminación al embrión de 4 células
cc3	T5-t3: tercer ciclo celular, duración del periodo como embrión de 3 y 4 células
t5-t2	Tiempo de embrión de 5 células menos el tiempo del embrión de 2 células
cc3/cc2	Relación de duración de ciclo celular 3 a la duración del ciclo celular 2
Tiempo hasta la primera división	Duración del 1 <sup>er</sup> ciclo celular
Extrusión 2PB	Tiempo desde la inseminación hasta que se extrude el segundo cuerpo polar
Desvanecimiento de PN	Tiempo desde la inseminación hasta que desaparecen los pronúcleos, tiempo OR entre la aparición de los pronúcleos que aparecen y pronúcleos que desaparecen
tSB	Tiempo desde la inseminación al comienzo de la blastulación
tSC	Tiempo desde la inseminación al comienzo de la compactación
Aparición de PN	Tiempo desde la inseminación hasta la aparición de pronúcleos
t6	Tiempo desde la inseminación al embrión de 6 células
t7	Tiempo desde la inseminación al embrión de 7 células
t8	Tiempo desde la inseminación al embrión de 8 células
cc2b	t4-t2; segundo ciclo celular para ambos blastómeros, duración del periodo como embrión de 2 y 3 células de blastómero
cc2_3	t5-t2; segundo y tercer ciclo celular, duración de periodo como embrión de 2, 3 y 4 blastómeros
cc4	t9-t5; cuarto ciclo celular; duración del periodo como embrión de 5, 6, 7 y 8 blastómeros
s3a	t6-t5; duración de las divisiones celulares individuales implicadas en el desarrollo del embrión de 4 blastómeros al embrión de 8 blastómeros.

Parámetro	Descripción/referencia que describe el parámetro
s3b	t7-t6; duración de las divisiones celulares individuales implicadas en el desarrollo del embrión de 4 blastómeros al embrión de 8 blastómeros.
s3c	t8-t7; duración de las divisiones celulares individuales implicadas en el desarrollo del embrión de 4 blastómeros al embrión de 8 blastómeros
cc2/cc3	Publicación internacional WO 2012/163363
cc2/cc2_3	Publicación internacional WO 2012/163363
cc3/t5	Publicación internacional WO 2012/163363
s2/cc2	Publicación internacional WO 2012/163363
s3/cc3	Publicación internacional WO 2012/163363
DA1	División directamente desde el embrión de 1 célula a un embrión de 3 células o más
DA2	División de una célula hija en más de 2 blastómeros
SA	Singamia anormal  Movimiento de PN desordenado en el citoplasma sin dispersión rápida de las membranas nucleares, corto periodo de tiempo entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis ( $P_{sin}$ ), y/o movimiento del oolema activo antes de la dispersión de las membranas nucleares. Medible por evaluación del movimiento de los pronúcleos y/o actividad pronúcleo a través del citoplasma
MN2	Multinucleación observada en la etapa de 2 blastómeros
MN4	Multinucleación observada en la etapa de 4 blastómeros
EV2	Uniformidad de los blastómeros en el embrión de 2 blastómeros
Mul	Multinucleación
Irregular o UBS	Tamaños irregulares de blastómeros a 2-4 células
Frg	Fragmentación
Nec	Necrosis de blastómero
Vac	Vacuolización

Los informes anteriores han investigado el tiempo desde la inseminación a la desaparición de los pronúcleos, también conocido como rotura de los pronúcleos (RPN) o desvanecimiento pronuclear (DPN), (Basile, et al. (2013) "Type of Culture Media Does Not Affect Embryo Kinetics: A Time-Lapse Analysis of Sibling Oocytes", Human Reprod., 28(3):634-41; Azzarello, et al. (2012) "The Impact of Pronuclei Morphology and Dynamicity on Live Birth Outcome After Time-Lapse Culture", Human Reprod. 27(9):2649-57; Lemmen, et al. (2008) "Kinetic Markers of Human Embryo Quality Using Time-Lapse Recordings of IVF/ICSI-Fertilize Oocytes", Reprod. Biomed. Online, 17(3):385-91). Algunos métodos de la actual invención, en contraste, están relacionados con el tiempo de la desaparición de PN a la primera citocinesis,  $P_{sin}$ . A diferencia de los parámetros descritos previamente,  $P_{sin}$  es una medida más fiable ya que no depende del momento de inseminación. El momento de la inseminación puede ser impreciso, especialmente para huevos inseminados bajo técnicas de fecundación in vitro clásicas.

Los métodos de la actual invención, por lo tanto, proporcionan nuevos parámetros celulares de selección o desección para embriones humanos que pueden medirse mediante microscopía secuencial.

En métodos de la invención, uno o más embriones se evalúa por su probabilidad para alcanzar la etapa de blastocisto y/o convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploides midiendo uno o más parámetros celulares del (de los) embrión(ones) y empleando estas medidas para determinar la probabilidad de que el (los) embrión(ones) alcanzará(n) la etapa de blastocistos o se implantará(n) en el útero. Dichos parámetros, se describen en la presente memoria (SN, SA, SI, DA,  $A1^{oit}$  y división caótica) y se han descrito, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. núms. 7.963.906; 8.323.177 y 8.337.387 y la Solicitud PCT núm.: WO 2012/163363, cuya descripción de cada uno se incorpora en la presente memoria por referencia a su totalidad. La

información así derivada puede usarse para guiar las decisiones clínicas, p.ej., si transferir o no un embrión fecundado in vitro, si trasplantar o no una célula o células cultivadas, si congelar o no un embrión para la implantación posterior, si continuar o no el cultivo del embrión, o si evaluar o no al embrión por otros métodos tales como pruebas genéticas preimplantación, genómica, proteómica y/o secretómica.

- 5 Ejemplos de embriones que pueden evaluarse por los métodos de la invención incluyen embriones de 1 célula (también denominados 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 y que incluyen embriones de 16 células, mórulas, y blastocistos, cualquiera de los cuales puede derivarse por cualquier manera conveniente, p.ej., de un ovocito que ha madurado in vivo o de un ovocito que ha madurado in vitro.
- 10 Los embriones pueden derivarse de cualquier organismo, p.ej., cualquier especie de mamíferos, p.ej., humano, primate, equino, bovino, porcino, canino, felino, etc. preferible, se derivan de un humano. Pueden congelarse previamente, p.ej. embriones crio-conservados en la etapa de 1 célula y después descongelados. De forma alternativa, pueden estar recién preparados, p.ej., los embriones que están recién preparados (no congelados antes del cultivo) a partir de ovocitos por técnicas de fertilización in vitro (ovocitos frescos o previamente congelados);
- 15 ovocitos que están recién cosechados y/o recién madurados a través de las técnicas de maduración in vitro (que incluyen, p.ej., ovocitos que se cosechan de tejido ovárico in vitro). Pueden cultivarse en cualquier condición conveniente (que incluye diferentes tipos de medio de cultivo) conocida en la técnica para promover la supervivencia, crecimiento y/o desarrollo de la muestra a evaluar, p.ej., para los embriones, bajo condiciones tales como las usadas en la técnica de fecundación in vitro; véase, p.ej., Patente de EE.UU. núm. 6.610.543, Patente de EE.UU. núm. 6.130.086, Patente de EE.UU. núm. 5.837.543, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia; para ovocitos, en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover la maduración de ovocito; véase, p.ej., Patente de EE.UU. núm. 5.882.928 y la Patente de EE.UU. núm. 6.281.013,
- 20 cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia; para células madre en condiciones tales como las usadas en la técnica para promover el mantenimiento, diferenciación y proliferación, véase, p.ej., la Patente de EE.UU. núm. 6.777.233, Patente de EE.UU. núm. 7.037.892, Patente de EE.UU. núm. 7.029.913, Patente de EE.UU. núm. 5.843.780 y la Patente de EE.UU. núm. 6.200.806, Solicitud de EE.UU. núm. 2009/0047263; Solicitud de EE.UU. núm. 2009/0068742, cuyas descripciones se incorporan en la presente memoria por referencia. A menudo, los embriones se cultivan en un medio disponible comercialmente tal como KnockOut DMEM, DMEM-F12 o Medio de Dulbecco modificado Iscoves que se ha suplementado con suero o sustituto de suero, aminoácidos, factores de crecimiento y hormonas diseñadas para las necesidades del embrión particular que se evalúa.

En algunas realizaciones, los embriones se evalúan midiendo los parámetros celulares por captación de imágenes secuenciales. Los embriones pueden cultivarse en placas de cultivo estándar in vitro. De forma alternativa, los embriones pueden cultivarse en placas de cultivo a medida, p.ej. placas de cultivo a medida con micro-pocillos de

35 calidad óptica como se describe en la presente memoria. En dichas placas de cultivo a medida, cada micro-pocillo contiene un único huevo fecundado o embrión, y la superficie inferior de cada micro-pocillo tiene un final de calidad óptica de manera que el grupo entero de embriones en una única placa puede captarse en imágenes de forma simultánea mediante un único microscopio en miniatura con suficiente resolución para seguir los procesos de mitosis celular. El grupo entero de micro-pocillos comparte la misma gota de medio en la placa de cultivo, y puede también

40 incluir una pared externa colocada alrededor de los micro-pocillos para estabilizar la gota de medio, además de marcadores fiduciarios colocados cerca de los micro-pocillos. Las gotas de medio pueden tener diferentes volúmenes. La hidrofobicidad de la superficie puede ajustarse con grabado por plasma u otro tratamiento para evitar burbujas a partir de la formación en los micro-pocillos cuando se llenan con medio. A pesar de si una placa de cultivo estándar o una placa de cultivo a medida se utiliza, durante el cultivo, uno o más embriones en desarrollo pueden cultivarse en el mismo medio de cultivo, p.ej. entre 1 y 30 embriones pueden cultivarse por placa.

Las imágenes se adquieren con el tiempo, y después se analizan para llegar a medidas del uno o más parámetros celulares. La captación de imágenes secuenciales puede realizarse con cualquier microscopio controlado por ordenador que se equipa para el almacenamiento y análisis de imágenes digitales, por ejemplo, microscopios invertidos equipados con etapas calientes y cámaras de incubación, o series de microscopios en miniatura

50 contruidos a medida que ajustan dentro de una incubadora convencional. La serie de microscopios en miniatura permite el cultivo simultáneo de múltiples placas de muestras en la misma incubadora, y es escalable para acomodar múltiples canales sin limitaciones en el mínimo intervalo de tiempo entre la captura de imágenes sucesivas. El uso de microscopios múltiples elimina la necesidad de mover la muestra, que mejora la precisión del sistema y la fiabilidad del sistema total. Los microscopios individuales en la incubadora pueden estar parcial o

55 totalmente aislados, proveyendo a cada placa de cultivo con su propio medio controlado. Esto permite transferir placas a y a partir de las estaciones de captación de imágenes sin alterar el medio de las demás muestras.

El sistema de captación de imágenes para captar imágenes secuenciales puede emplear iluminación en campo brillante, iluminación de campo oscuro, contraste de fase, contraste de modulación Hoffman, contraste de interferencia diferencial, luz polarizada, fluorescencia o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la

60 iluminación de campo oscuro puede usarse para proporcionar contraste mejorado de la imagen para la posterior extracción de características y el análisis de la imagen. Además, pueden usarse fuentes de luz roja o infrarroja

cercana para reducir la fototoxicidad y mejorar la relación de contraste entre las membranas celulares y la parte interna de las células.

Las imágenes que se adquieren pueden almacenarse o bien en una base continua, como en vídeo en vivo, o en una base intermitente, como en la fotografía secuencial, donde un sujeto se capta en imágenes de forma repetida en una imagen instantánea. Preferiblemente, el intervalo de tiempo entre las imágenes estaría entre 1 a 30 minutos, o entre 1 a 20 minutos o entre 1 a 15 minutos, o entre 1 a 10 minutos o entre 1 a 5 minutos, minutos para capturar sucesos morfológicos significativos como se describe a continuación. En una realización alternativa, el intervalo de tiempo entre imágenes podría variarse dependiendo de la cantidad de actividad celular. Por ejemplo, durante los periodos activos las imágenes podrían tomarse tan a menudo como cada pocos segundos o cada minuto, mientras que durante los periodos inactivos las imágenes podrían tomarse cada 10 o 15 minutos o más. El análisis de imágenes a tiempo real en las imágenes capturadas podría usarse para detectar cuando y como variar los intervalos de tiempo. En nuestros métodos, la cantidad total de luz recibida por las muestras se estima que es equivalente a aproximadamente 52 segundos de exposición continua a luz de bajo nivel durante 5 días de captación de imágenes. La intensidad de la luz para unos sistemas de captación de imágenes secuenciales es significativamente menor que la intensidad de luz usada típicamente en un microscopio de reproducción asistida debido a la baja potencia de las LEDs (por ejemplo, usando una LED de 1W en comparación con la bombilla halógena de 100W típica) y alta sensibilidad del sensor de la cámara. Por consiguiente, la cantidad total de energía lumínica recibida por un embrión que usa el sistema de captación de imágenes secuenciales es comparable a o menos que la cantidad de energía recibida durante el manejo rutinario en una clínica de FIV. Además, el tiempo de exposición puede acortarse significativamente para reducir la cantidad total de exposición a la luz al embrión. Durante 2 días de captación de imágenes, con las imágenes capturadas cada 5 minutos a 0,5 segundos de exposición a la luz por imagen, la cantidad total de exposición a la luz a bajo nivel es menos de 21 segundos.

Después de la adquisición de la imagen, las imágenes se extraen y se analizan para diferentes parámetros celulares, por ejemplo, tamaño del cigoto, tamaño de los blastómeros, espesor de la zona pelúcida, uniformidad o plegado de la membrana plasmática, uniformidad o plegado del oolema, formación de uno o más pseudo surcos de división, grado de fragmentación, simetría de las células hijas resultantes de una división celular, intervalos de tiempo entre las primeras pocas mitosis, duración de la citocinesis y tiempo y calidad de la singamia. Los sistemas y métodos, que incluyen las modalidades de clasificación, seguimiento y captación de imágenes descritas en las Solicitudes de Patente núms. CPT/US2011/053537; 61/785.170; 61/785.179; 61/785.199; 61/785.216; 61/770.998 y/o 61/771.000 pueden usarse para observar y/o medir los parámetros celulares de la invención actual. Las descripciones de cada una de estas solicitudes se incorporan específicamente en la presente memoria por referencia en sus totalidades.

Los parámetros celulares que pueden medirse por captación de imágenes secuenciales son normalmente sucesos morfológicos. Por ejemplo, en la evaluación de embriones, la captación de imágenes secuenciales puede usarse para visualizar la duración de P1 o primera citocinesis (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular) y/o uno o más fenotipos P1 (A1<sup>cit</sup>) que incluyen, p.ej., plegado de membrana, plegado de oolema y/o formación de uno o más pseudo surcos de división antes del inicio y/o terminación de la primera citocinesis (P1). Adicionalmente, la captación de imágenes secuenciales puede usarse para visualizar la singamia, particularmente los tiempos de la singamia que incluye el tiempo entre la singamia y el comienzo o resolución de la citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3, citocinesis 4 o citocinesis 5 o el tiempo entre la singamia y el comienzo o resolución de la mitosis 1, mitosis 2, mitosis 3, mitosis 4 o mitosis 5. Adicionalmente, la microscopía secuencial puede usarse para determinar el número de células que surgen de una única división celular, por ejemplo, para determinar si un embrión muestra o no DA (p.ej., DA1 y/o DA2). Adicionalmente, la captación de imágenes secuenciales puede usarse para medir la duración de un suceso de citocinesis, p.ej. citocinesis 1, citocinesis 2, citocinesis 3, citocinesis 4, citocinesis 5 o combinaciones y/o relaciones de estos sucesos donde la duración de un suceso de citocinesis se define como el intervalo de tiempo entre la primera observación de un surco de división (el inicio de la citocinesis) y la resolución del surco de división en dos células hijas (es decir la producción de dos células hijas). Otro parámetro de interés es la duración de un suceso de ciclo celular, p.ej., ciclo celular 1, ciclo celular 2, ciclo celular 3, ciclo celular 4, ciclo celular 5 o combinaciones y/o relaciones de estos sucesos donde la duración de un suceso de ciclo celular se define como el intervalo de tiempo entre la producción de una célula (para el ciclo celular 1, la fecundación de un óvulo; para ciclos celulares posteriores, a la resolución de la citocinesis) y la producción de dos células hijas a partir de esa célula. Los parámetros celulares de interés que pueden medirse por captación de imágenes secuenciales incluyen intervalos de tiempo que están definidos por estos sucesos celulares, p.ej. (a) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2, definible como cualquiera de los intervalos entre el inicio de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2, el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2, el intervalo entre el inicio de la citocinesis 1 y la resolución de la citocinesis 2; o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 1 y el inicio de la citocinesis 2; o (b) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3, definible como cualquiera del intervalo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre el inicio de la citocinesis 2 y la resolución de la citocinesis 3, o el intervalo entre la resolución de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3; (c) el intervalo de tiempo entre la mitosis 1 y la mitosis 2, definible como cualquiera del intervalo entre el inicio de la mitosis 1 y el inicio de la mitosis 2, el intervalo entre la resolución de la mitosis 1 y la resolución de la mitosis 2, el intervalo entre el inicio de la mitosis 1 y la resolución de la

mitosis 2; o el intervalo entre la resolución de la mitosis 1 y el inicio de la mitosis 2; o (b) el intervalo de tiempo entre la mitosis 2 y la mitosis 3, definible como cualquiera del intervalo entre el inicio de la mitosis 2 y el inicio de la mitosis 3, o el intervalo entre la resolución de la mitosis 2 y la resolución de la mitosis 3, o el intervalo entre el inicio de la mitosis 2 y la resolución de la mitosis 3, o el intervalo entre la resolución de la mitosis 2 y el inicio de la mitosis 3.

5 Otros parámetros que pueden medirse por captación de imágenes secuenciales incluyen la presencia o ausencia de fenotipos atípicos. Dichos fenotipos atípicos incluyen, DA (es decir, DA1, DA2, DA3, DA4, etc.), A1<sup>cit</sup>, SA, singamia inmensurable y división caótica.

Para los propósitos de la fecundación in vitro, se considera ventajoso que el embrión se transfiera al útero pronto en el desarrollo, p.ej., para el día 2, es decir hasta la etapa de 8 células, para reducir la pérdida del embrión debido a las desventajas de las condiciones de cultivo respecto al medio in vitro, y para reducir los resultados adversos potenciales asociados con los errores epigenéticos que pueden darse durante el cultivo (Katari et al. (2009) Hum Mol Genet. 18(20):3769-78; Sepúlveda et al. (2009) Fertil Steril. 91(5):1765-70). Por consiguiente, es preferible que la medida de los parámetros celulares tenga lugar dentro de los 2 días tras la fecundación, aunque periodos más largos de análisis, p.ej. aproximadamente 36 horas, aproximadamente 54 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas, aproximadamente 96 horas o más, también se contemplan por los presentes métodos.

Los parámetros pueden medirse manualmente, o pueden medirse automáticamente, p.ej., mediante un programa de análisis de imágenes. Cuando se emplea el programa de análisis de imágenes, pueden usarse algoritmos de análisis de imágenes que emplean una técnica de estimación de modelo probabilístico en base al método Monte Carlo secuencial, p.ej. generando distribuciones de modelos embrionarios hipotéticos, simulando imágenes en base a un modelo óptico sencillo, y comparando estas simulaciones con los datos de la imagen observada. Cuando se emplean dichas estimaciones del modelo probabilístico, las células pueden modelarse como cualquier forma apropiada, p.ej., como colecciones de elipses en un espacio 2D, colecciones de elipsoides en un espacio 3D, y similares. Para tratar con oclusiones y ambigüedades de profundidad, el método puede imponer restricciones geométricas que corresponden con el comportamiento físico esperado. Para mejorar la fortaleza, las imágenes pueden capturarse en uno o más planos focales.

Una vez que se han obtenido las medidas del parámetro celular, las medidas se emplean para determinar la probabilidad de que el embrión se desarrolle a un blastocisto y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide.

En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se usa directamente para determinar la probabilidad de que un embrión alcance la etapa de blastocisto o se convierta en un embrión de buena calidad o sea euploide. En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se usa directamente para determinar la probabilidad de que un embrión se implante con éxito en el útero y/o sea euploide. En otras palabras, el valor absoluto de la medida en sí misma es suficiente para determinar la probabilidad de que un embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o sea euploide. Ejemplos de esto en realizaciones que usan la captación de imágenes secuenciales para medir los parámetros celulares incluyen, sin limitación, los siguientes, que en combinación son indicativos de la probabilidad de que un embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o sea euploide: (a) una duración de la citocinesis que es aproximadamente 0 a aproximadamente 33 horas; (b) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que es aproximadamente 8-15 horas, p.ej. aproximadamente 9-14 horas, aproximadamente 9-13 horas, aproximadamente 9-12 horas, o aproximadamente 9-11,5 horas, o aproximadamente 9,33-11,45 horas; y (c) un intervalo de tiempo, es decir, sincronidad, entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es aproximadamente 0-6 horas, aproximadamente 0-5 horas, p.ej. aproximadamente 0-4 horas, aproximadamente 0-3 horas, aproximadamente 0-2 horas, o aproximadamente 0-1,75 horas, o aproximadamente 0-1,73 horas. En algunas realizaciones, determinar la probabilidad de que el embrión alcance la etapa de blastocisto y/o se implante con éxito en el útero y/o sea euploide puede incluir adicionalmente medir parámetros celulares, que incluyen aunque no están limitados a: un ciclo celular 1 que dura aproximadamente 20-27 horas, p.ej., aproximadamente 25-27 horas, el tiempo desde la fecundación a la etapa de 5 células que es aproximadamente 47 horas a aproximadamente 57 horas, y determinar que el embrión no muestra un fenotipo atípico tal como la ausencia de A1<sup>cit</sup>, DA, SA, singamia inmensurable o división caótica.

Ejemplos de medidas directas, cualquiera de los cuales solas o en combinación son indicativas de la probabilidad de que un embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero, y/o sea aneuploide incluyen sin limitación: (a) una duración de la citocinesis 1 que es más de aproximadamente 33 minutos, p.ej., más de aproximadamente 35, 40, 45, 50 o 60 minutos; (b) un intervalo de tiempo entre la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 que dura más de 15 horas, p.ej., aproximadamente 16, 17, 18, 19 o 20 o más horas, o menos de 8 horas, p.ej., aproximadamente 7, 5, 4 o 3 o menos horas; o (c) un intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3 que es 6, 7, 8, 9 o 10 o más horas. En algunas realizaciones, determinar la probabilidad de que el embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o sea aneuploide, puede incluir adicionalmente medir los parámetros celulares que incluyen aunque no están limitados a: un ciclo celular 1 que dura más de aproximadamente 27 horas, p.ej. 28, 29 o 30 o más horas, un intervalo de tiempo entre la fecundación y la etapa de 5 células que es menos de aproximadamente 47 horas o más de aproximadamente 57 horas y/o la detección de A1<sup>cit</sup>, SA, SI, DA y/o división caótica.

En una realización preferida, los métodos proporcionan la medida directa de la duración de P1 y/o fenotipos P1 que solos o en combinación con los parámetros celulares identificados anteriormente es indicativo de la probabilidad de que un embrión no alcance la etapa de blastocisto, y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea aneuploide. Por ejemplo, los embriones que muestran duración P1 prolongada (es decir, el periodo de tiempo entre la aparición del 1<sup>er</sup> surco de división a la terminación de la 1<sup>a</sup> división celular) de  $\geq 0,5$  h y/o uno o más fenotipos P1 anormales (A1<sup>cit</sup>) (que incluye, p.ej., plegado de membrana, plegado de oolema y/o formación de pseudo surcos de división antes del inicio y/o terminación de la primera citocinesis (P1)) es menos probable que alcancen la etapa de blastocistos o se implanten en el útero y/o sea más probable que sean aneuploides. De forma similar, los embriones que muestran SA como se evidencia por el movimiento de PN desordenado en el citoplasma sin la dispersión rápida de las membranas nucleares, y/o el movimiento del oolema activo antes de la dispersión de las membranas nucleares y/o un corto periodo de tiempo entre la singamia y el comienzo de la primera citocinesis (P<sub>sin</sub>), en el que corto es menos que aproximadamente 1 hora, o menos que aproximadamente 55 minutos, o menos que aproximadamente 50 minutos, o menos de aproximadamente 45 minutos o menos que aproximadamente 40 minutos o menos que aproximadamente 35 minutos, o menos que aproximadamente 30 minutos o menos que aproximadamente 25 minutos o menos que aproximadamente 20 minutos o menos que aproximadamente 15 minutos o menos que aproximadamente 10 minutos o menos que aproximadamente 5 minutos es menos probable que alcancen la etapa de blastocisto o que se implanten en el útero y/o es más probable que sean aneuploides. De forma similar, los embriones que muestran singamia inmensurable, división anormal (DA) y/o división caótica también es menos probable que alcancen la etapa de blastocistos y/o se conviertan en blastocistos de buena calidad y/o se implanten en el útero y/o sea menos probable que sean aneuploides.

En algunas realizaciones, la medida del parámetro celular se emplea comparándolo con una medida del parámetro celular de un embrión de referencia, o control, y usando el resultado de esta comparación para proporcionar una determinación de la probabilidad de que el embrión alcance o no alcance la etapa de blastocisto, y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide. Los términos “referencia” y “control” como se usan en la presente memoria significan un embrión o célula estandarizada para usarse para interpretar las medidas del parámetro celular de un embrión dado y asignar una determinación de la probabilidad del embrión para alcanzar o no alcanzar la etapa de blastocisto y/o convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploide o aneuploide. La referencia o control puede ser un embrión que se sabe que tiene un fenotipo deseado, p.ej., probable que alcance la etapa de blastocisto, y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide y por lo tanto pueda ser un embrión de referencia o control positivo. De forma alternativa, el embrión de referencia/control puede ser un embrión conocido por no tener el fenotipo deseado, y por lo tanto ser un embrión de referencia/control negativo.

En ciertas realizaciones, los parámetros celulares se emplean primero para determinar si un embrión es probable que alcance la etapa de blastocisto, y/o se convierta en un blastocisto de buena calidad y/o se implante en un útero y/o sea euploide. En dichas realizaciones, los embriones que caen dentro de uno o más de los marcos temporales del parámetro celular referenciado anteriormente (p.ej. un tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2 de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 14,3 horas y/o un tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3 de aproximadamente 0 a aproximadamente 5,8 horas) se selecciona para tener buen potencial de desarrollo y/o ser euploide. Estos embriones se analizan entonces para determinar si tienen una duración P1 normal y/o fenotipos P1, y/o fenotipo de singamia normal y/o fenotipos de división normal (es decir, ausencia de DA y/o división caótica). Los embriones seleccionados anteriormente por tener buen potencial de desarrollo/ser euploides se deseleccionan cuando se determina que tienen duración P1 prolongada y/o uno o más fenotipos P1 anormales (A1<sup>cit</sup>) y/o muestran SA, singamia inmensurable, DA (p.ej. DA1 y/o DA2) y/o división caótica, seleccionando por consiguiente para la implantación o congelación para una implantación futura potencial, solo aquellos embriones que caen dentro de los criterios de selección y fuera de los criterios de desección.

En ciertas realizaciones, la(s) medida(s) del parámetro celular obtenida(s) se compara(n) a una(s) medida(s) del parámetro celular comparable(s) de un único embrión de referencia/control para obtener la información con respecto al fenotipo del embrión/célula a ensayar. En aún otras realizaciones, la(s) medida(s) del parámetro celular obtenida(s) se compara(n) con la(s) medida(s) del parámetro celular comparable(s) de dos o más embriones de referencia/control diferentes para obtener información más detallada respecto al fenotipo del embrión/célula probada. Por ejemplo, las medidas del parámetro celular obtenidas del (de los) embrión(ones) que se evalúa(n) pueden compararse tanto con un embrión positivo como negativo para obtener información confirmada respecto a si el embrión/célula tiene el fenotipo de interés.

Como un ejemplo, la resolución de la citocinesis 1 y el comienzo de la citocinesis 2 en embriones humanos normales es aproximadamente 8-15 horas, más a menudo aproximadamente 9-13 horas, con un valor promedio de aproximadamente 11 +/- 2,1 horas; es decir 6, 7 u 8 horas, más normalmente aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14 o hasta aproximadamente 15 horas. Un ciclo celular 2 más largo o más corto en el embrión que se evalúa en comparación con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o sea aneuploide. Como un segundo ejemplo, el intervalo de tiempo entre el inicio de la citocinesis 2 y el inicio de la citocinesis 3, es decir, la sincronidad de la segunda y tercera mitosis, en embriones humanos normales es normalmente aproximadamente



0-5 horas, más normalmente aproximadamente 0, 1, 2 o 3 horas, con un tiempo promedio de aproximadamente 1 +/- 1,6 horas; un intervalo más largo entre la terminación de la citocinesis 2 y la citocinesis 3 en el embrión que se evalúa en comparación con la observada en un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o sea aneuploide. Como un tercer ejemplo, el ciclo celular 1 en un embrión normal, es decir, desde el momento de la fecundación a la terminación de la citocinesis 1, se completa típicamente en aproximadamente 20-27 horas, más normalmente en aproximadamente 25-27 horas, es decir, aproximadamente 15, 16, 17, 18 o 19 horas, más normalmente aproximadamente 20, 21, 22, 23 o 24 horas, y más normalmente aproximadamente 25, 26 o 27 horas. Un ciclo celular 1 que es más largo en el embrión que se evalúa en comparación con el observado para un embrión de referencia normal es indicativo de la probabilidad de que el embrión no alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero y/o sea aneuploide. Como un cuarto ejemplo, los embriones que muestran A1<sup>cit</sup>, SA, singamia inmensurable, DA y/o división caótica es menos probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se desarrollen a blastocistos de buena calidad y/o es más probable que sean aneuploides. Los ejemplos pueden derivarse de datos empíricos, p.ej., observando uno o más embriones de referencia junto al embrión a evaluar. Cualquier embrión de referencia puede emplearse, p.ej., una referencia normal que es probable que alcance la etapa de blastocisto, y/o se desarrolle a un blastocisto de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide, o una muestra de referencia anormal que no es probable que alcance la etapa de blastocisto y/o es probable que sea aneuploide. En algunos casos, puede emplearse más de una muestra de referencia, p.ej., puede usarse tanto una muestra de referencia normal y una muestra de referencia anormal.

Como se trata anteriormente, puede medirse uno o más parámetros y emplearse para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto para un embrión. En algunas realizaciones, una medida de dos parámetros puede ser suficiente para llevar a una determinación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o convertirse en un blastocisto de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploide. En algunas realizaciones, puede ser deseable emplear medidas de más de dos parámetros, por ejemplo, 3 parámetros celulares o 4 o más parámetros celulares. En algunas realizaciones, puede ser deseable medir uno o más parámetros para seleccionar un embrión con buen potencial de desarrollo y/o probabilidad de ser euploide y uno o más parámetros para deseleccionar embriones con pobre potencial de desarrollo y/o con una probabilidad de ser aneuploide. En ciertas realizaciones, se mide 1 parámetro de selección y 1 parámetro de desección. En otra realización, se mide 1 parámetro de selección y 2 parámetros de desección. En otra realización, se mide 1 parámetro de selección y 3 parámetros de desección. En otra realización, se miden 2 parámetros de selección y 1 parámetro de desección. En otra realización, se miden 3 parámetros de selección y 1 parámetro de desección. En otra realización, se miden más de 3 parámetros de selección y 1 parámetro de desección. En otra realización, se miden 2 parámetros de selección y 2 parámetros de desección. En otra realización, se miden 2 parámetros de selección y 3 parámetros de desección. En otra realización, se miden 3 parámetros de selección y 2 parámetros de desección. En otra realización, se miden más de 3 parámetros de selección y 2 parámetros de desección. En otra realización, se miden más de 3 parámetros de selección y 3 parámetros de desección.

En ciertas realizaciones, probar múltiples parámetros puede ser deseable ya que probar múltiples parámetros puede proporcionar mayor sensibilidad y especificidad. Por sensibilidad se entiende la proporción de positivos reales que se identifican correctamente como que lo son. Esto puede representarse matemáticamente como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{(\text{Número de positivos reales})}{(\text{Número de positivos reales} + \text{Número de falsos negativos})}$$

Por consiguiente, en un método en que "positivos" son los embriones que tienen buen potencial de desarrollo, es decir que se desarrollarán a blastocistos, y/o se convertirán en un blastocisto de buena calidad y/o se implantarán en el útero y/o serán euploide, y "negativos" son los embriones que tienen pobre potencial de desarrollo, es decir, que no desarrollarán a blastocistos ni se desarrollarán a blastocistos de buena calidad o se implantarán en el útero y/o serán aneuploides, una sensibilidad de 100% significa que la prueba reconoce a todos los embriones que se desarrollarán a blastocistos, o se convertirán en blastocistos de buena calidad o se implantarán en el útero como tal. En algunas realizaciones, la sensibilidad de la prueba puede ser aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o más, p.ej. 100%. Por especificidad se entiende la proporción de "negativos" que se identifican correctamente como tal. Como se trata anteriormente, el término "especificidad" cuando se usa en la presente memoria con respecto a los métodos de predicción y/o evaluación se usa para referirse a la capacidad de predecir o evaluar un embrión para determinar la probabilidad de que el embrión no se desarrolle a un blastocisto, no se convierta en un blastocisto de buena calidad o se implante en el útero evaluando, determinando, identificando o seleccionando embriones que no es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se conviertan en un blastocisto de buena calidad y/o se implanten en el útero y/o sean euploides. Esto puede representarse matemáticamente como:

$$\text{Especificidad} = \frac{(\text{Número de negativos reales})}{(\text{Número de negativos reales} + \text{Número de falsos positivos})}$$

Por consiguiente, en un método en que los positivos son los embriones que es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se conviertan en blastocistos de buena calidad y/o se implanten en el útero y/o sean euploides (es decir, que es probable que se desarrollen a blastocistos), y negativos son los embriones que es probable que no

alcanzen la etapa de blastocisto (es decir, que no es probable que se desarrollen a blastocistos) una especificidad de 100% significa que la prueba reconoce a todos los embriones que no se desarrollarán a blastocistos, es decir se pararán antes de la etapa de blastocisto y/o serán aneuploides. En algunas realizaciones, la especificidad puede ser una "alta especificidad" de 70%, 72%, 75%, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 92%, 95%, 98% o más, p.ej. 100%. El uso de dos parámetros proporciona sensibilidad de 40%, 57%, 68%, 62%, 68% y especificidad de 86%, 88%, 83%, 83%, 77%, respectivamente. En otras palabras, en una realización ejemplar, los métodos de la invención son capaces de identificar correctamente el número de embriones que se van a desarrollar a blastocistos y/o ser euploides al menos aproximadamente 40%-68% del tiempo (sensibilidad), y el número de embriones que se van a detener antes de la etapa de blastocisto al menos aproximadamente 77%-88% del tiempo (especificidad), independientemente del modelo de algoritmo empleado, y como tal la presente invención proporciona un método de alta especificidad para identificar los embriones que se detendrán antes de la etapa de blastocisto o no se desarrollarán a blastocistos de buena calidad. Además, los valores medios especificados y/o puntos de corte pueden modificarse dependiendo del conjunto de datos usados para calcular estos valores además de la solicitud específica.

En algunas realizaciones, la evaluación de un embrión o incluye generar un informe escrito que incluye la evaluación del artesano del embrión, p.ej. "evaluación/selección/determinación de embriones que es probable y/o no probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se desarrollen a blastocistos de buena calidad y/o se implanten en el útero", una "evaluación de anomalías cromosómicas", etc. Por consiguiente, un método puede incluir además una etapa de generación o producción de un informe que proporciona los resultados de dicha evaluación, cuyo informe puede proporcionarse en forma de un medio electrónico (p.ej., una presentación electrónica en un monitor de ordenador), o en forma de un medio tangible (p.ej., un informe impreso en papel u otro medio tangible).

Un "informe", como se describe en la presente memoria, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de informe que proporcionan información de interés relacionada con una evaluación lograda por métodos de la invención. Un informe puede generarse completa o parcialmente de forma electrónica. Un informe incluye al menos una evaluación de la probabilidad del embrión o de alcanzar la etapa de blastocisto y/o de implantarse en el útero, una evaluación de la probabilidad de la existencia de anomalías cromosómicas, etc. Un informe puede además incluir uno o más de: 1) información con relación al laboratorio de análisis; 2) información del proveedor del servicio; 3) datos del sujeto; 4) datos de la muestra; 5) una sección del informe de evaluación detallada, que proporciona información con relación a como se llegó a la evaluación, p.ej. a) medidas de parámetro celular tomadas, b) valores de referencia empleados, si los hay; y 6) otras características.

El informe puede incluir información sobre el laboratorio de análisis, cuya información es relevante para el hospital, clínica o laboratorio en que se realizó la recogida de la muestra y/o generación de datos. La recogida de muestras puede incluir como se generó la muestra, p.ej., como se recogió de un sujeto, y/o como se cultivó, etc. La generación de datos puede incluir como se adquirieron las imágenes o se analizaron los perfiles de expresión génica. Esta información puede incluir uno o más detalles en relación con, por ejemplo, el nombre y situación del laboratorio de análisis, la identidad del técnico de laboratorio que realizó el ensayo y/o que introdujo los datos cargados, la fecha y el momento en que se realizó y/o se analizó el ensayo, la situación donde se almacena la muestra y/o los datos de resultado, el número de lote de los reactivos o medio de cultivo (p.ej., kit, etc.) usado en el ensayo, y similares. Los campos del informe con esta información pueden rellenarse generalmente usando información proporcionada por el usuario.

El informe puede incluir información sobre el proveedor de servicio, que puede estar situado fuera del centro médico en que está situado el usuario, o en el centro médico. Ejemplos de dicha información pueden incluir el nombre y situación del proveedor del servicio, el nombre del revisor, y donde sea necesario o deseado el nombre del individuo que realizó la preparación de la muestra y/o generación de datos. Los campos del informe con esta información pueden rellenarse generalmente usando datos introducidos por el usuario, que pueden seleccionarse de entre selecciones pre-redactadas (p.ej., usando un menú desplegable). Otra información del proveedor de servicio en el informe puede incluir la información de contacto para la información técnica sobre el resultado y/o aproximadamente el informe interpretativo.

El informe puede incluir una sección de datos del sujeto, que incluyen historia médica de los sujetos desde los que los ovocitos o se cosecharon, edad de la paciente, características del ciclo de fecundación in vitro (p.ej., tasa de fecundación, nivel de hormona estimulante del folículo (FSH) el día 3), y cuando los ovocitos se cosechan, parámetros de la cohorte de cigoto/embrión (p.ej. número total de embriones). Estos datos del sujeto pueden integrarse para mejorar la evaluación del embrión y/o ayudar a determinar el número óptimo de embriones a transferir. El informe puede incluir también los datos administrativos (es decir, los datos que no son esenciales para la evaluación de la probabilidad de que se alcance la etapa de blastocisto) tal como información para identificar el sujeto (p.ej., nombre, fecha de nacimiento del sujeto (FDN), género, dirección del correo electrónico y/o residencia, número de historia médica (NHM), número de habitación y/o cama en un centro médico), información del seguro, y similares), el nombre del médico del sujeto u otro profesional de la salud que ordenó la evaluación del potencial de desarrollo y, si es diferente del médico solicitante, el nombre del personal médico que es responsable del cuidado del sujeto (p.ej. médico de atención primaria).

El informe puede incluir una sección de datos de la muestra, que puede proporcionar información sobre la muestra biológica analizada en la evaluación, tal como cómo se manejó la muestra (p.ej. temperatura de almacenamiento,

protocolos preparatorios) y la fecha y momento de recogida. Los campos del informe con esta información pueden rellenarse generalmente usando datos introducidos por el usuario, algunos de los cuales pueden proporcionarse como selecciones pre-redactadas (p.ej., usando un menú desplegable).

5 El informe puede incluir una sección de informe de evaluación, que puede incluir información con relación a como se alcanzaron las evaluaciones/determinaciones como se describe en la presente memoria. El informe interpretativo puede incluir, por ejemplo, imágenes secuenciales del embrión que se evalúa, y/o resultados de la expresión génica. La parte de evaluación del informe pueden incluir además opcionalmente una sección de recomendación(ones). Por ejemplo, donde los resultados indican que el embrión es probable que alcance la etapa de blastocisto y/o se implante en el útero, la recomendación puede incluir una recomendación de que un número limitado de embriones puede trasplantarse al útero durante el tratamiento de fertilidad como se recomienda en la técnica.

10 Se apreciará también fácilmente que los informes pueden incluir elementos adicionales o elementos modificados. Por ejemplo, donde sea electrónico, el informe puede contener hipervínculos que apuntan a bases de datos internas o externas que proporcionan información más detallada sobre los elementos seleccionados del informe. Por ejemplo, el elemento de datos de la paciente del informe puede incluir un hipervínculo a una historia electrónica de la paciente, o un sitio para acceder a dicha historia de la paciente, cuya historia de la paciente se mantiene en una base de datos confidencial. Esta última realización puede ser de interés en un sistema interno hospitalario o entorno clínico interno. Cuando está en un formato electrónico, el informe se graba en un medio físico adecuado, tal como un medio legible por ordenador, p.ej., en una memoria de ordenador, dispositivos de compresión, CD, DVD, etc.

15 Se apreciará fácilmente que el informe puede incluir todos o algunos de los elementos anteriores, con la condición de que el informe incluye generalmente al menos los elementos suficientes para proporcionar el análisis solicitado por el usuario (p.ej., una evaluación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, y/o desarrollarse en blastocistos de buena calidad y/o implantarse en el útero).

20 Como se trata anteriormente, los métodos de la invención pueden usarse para evaluar embriones o células para determinar la probabilidad de que los embriones alcancen la etapa de blastocisto, y/o se desarrollen a blastocistos de buena calidad y/o se implanten en el útero y/o sean euploides. Esta determinación de la probabilidad de que los embriones o alcancen la etapa de blastocisto y/o se implanten en el útero y/o sean euploides puede usarse para guiar las decisiones y/o acciones clínicas. Por ejemplo, para aumentar las tasas de embarazo, los médicos a menudo transfieren embriones múltiples en las pacientes, dando por resultado potencialmente embarazos múltiples que plantean riesgos para la salud tanto de la madre como de los fetos. Usando los resultados obtenidos a partir de los métodos de la invención, la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, y/o desarrollarse en blastocistos de buena calidad y/o implantarse en el útero y/o ser euploides, puede determinarse para los embriones que se transfieren. Como los embriones que es probable que alcancen la etapa de blastocisto y/o se desarrollen a blastocistos de buena calidad y/o se implanten en el útero y/o sean euploides es más probable que se desarrollen a fetos, la determinación de la probabilidad de que el embrión alcance la etapa de blastocisto, y/o se desarrolle a blastocistos de buena calidad y/o se implante en el útero y/o sea euploide antes del trasplante permite al médico decidir cuántos embriones transferir para así maximizar la posibilidad de éxito de un embarazo a término mientras se minimiza el riesgo.

25 Las evaluaciones hechas por los siguientes métodos de la invención pueden encontrar también uso en la clasificación de embriones o en un grupo de embriones o para su probabilidad de que los embriones o alcancen la etapa de blastocisto además de para la calidad del blastocisto que se conseguirá (p.ej., en algunas realizaciones esto incluiría la probabilidad de implantación en el útero). Por ejemplo, en algunos ejemplos, múltiples embriones pueden ser capaces de desarrollarse a blastocistos, es decir, es probable que múltiples embriones alcancen la etapa de blastocisto. Sin embargo, será más probable que algunos embriones alcancen la etapa de blastocisto, es decir, tendrán mejor probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto, o mejor probabilidad de desarrollarse en blastocistos de buena calidad, o mejor probabilidad de implantarse en el útero que otros embriones. En dichos casos, los métodos de la invención pueden usarse para clasificar los embriones en el grupo. En dichos métodos, uno o más parámetros celulares para cada embrión se miden para alcanzar una medida de parámetro celular para cada embrión. La una o más medidas del parámetro celular de cada uno de los embriones se emplean entonces para determinar la probabilidad de que los embriones respecto a los otros alcancen la etapa de blastocisto y/o se implanten en el útero. En algunas realizaciones, las medidas del parámetro celular de cada uno de los embriones o se emplean comparándolos directamente con los otros para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero. En algunas realizaciones, las medidas del parámetro celular de cada uno de los embriones se emplean comparando las medidas del parámetro celular con una medida del parámetro celular de un embrión de referencia para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero para cada embrión, y después comparando la determinación de la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero para cada embrión para determinar la probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero de los embriones o respecto a otro.

30 De esta forma, un médico que evalúa, por ejemplo, múltiples cigotos/embriones, puede elegir solo los embriones de mejor calidad, es decir, aquellos con la mejor probabilidad de alcanzar la etapa de blastocisto y/o implantarse en el útero, para transferir para maximizar la posibilidad de éxito de un embarazo a término mientras se minimiza el riesgo.

También se proporcionan reactivos, dispositivos y kits de los mismos para llevar a la práctica uno o más de los métodos descritos anteriormente. Los reactivos, dispositivos y kits de los mismos pueden por lo tanto variar en gran medida. Los reactivos y dispositivos de interés incluyen los mencionados anteriormente con respecto a los métodos de medida de cualquiera de los parámetros celulares mencionados anteriormente, donde dichos reactivos pueden incluir placas de cultivo, medio de cultivo, microscopios, programas de captación de imágenes, programas de análisis de imágenes, cebadores de ácido nucleico, matrices de sondas de ácido nucleico, anticuerpos, reactivos del sistema que produce la señal, etc., dependiendo del protocolo de medida particular a realizar.

Además de los componentes anteriores, los kits incluirán además instrucciones para llevar a la práctica los métodos. Estas instrucciones pueden estar presentes en los kits en una variedad de formas, una o más de las cuales puede estar presente en el kit. Una forma en que estas instrucciones pueden estar presentes es una información impresa en un medio o sustrato adecuado, p.ej. un trozo o trozos de papel en que está impresa la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Aún otros medios serían un medio legible por ordenador, p.ej., disquete, CD, etc., en que se ha grabado la información. Aún otro medio que puede estar presente es una dirección de una página web que puede usarse por medio de internet para acceder a la información en un sitio quitado. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

Algunos de los métodos descritos anteriormente necesitan la capacidad de observar el desarrollo del embrión por medio de la captación de imágenes secuenciales. Esto puede conseguirse usando un sistema comprendido por una serie de microscopios multi-canal en miniatura que pueden ajustarse dentro de una incubadora estándar. Esto permite que pueda captarse imágenes de múltiples muestras rápida y simultáneamente sin tener que mover físicamente las placas. Un prototipo ilustrativo, mostrado en la Fig. 22 de la Patente de EE. UU. núm. 7.963.906 (Véase también el documento PCT/2011/053537), consiste en una serie de microscopios de 3 canales con iluminación de campo oscuro, aunque podrían usarse otros tipos de iluminación. Por "tres canales", se entiende que hay tres microscopios independientes que captan imágenes de tres placas de cultivo distintas de forma simultánea. Se usa un motor de pasos para ajustar la posición focal para enfocar u obtener pilas de imágenes 3D. Se usan LEDs de luz blanca para la iluminación, aunque se ha observado que, para los embriones humanos, el uso de LEDs rojas o del infrarrojo (IR) cercano puede mejorar la relación de contraste entre las membranas celulares y las partes internas de las células. Esta relación de contraste mejorada puede ayudar con el análisis de la imagen tanto manual como automatizado. Además, el movimiento a la región infrarroja puede reducir la fototoxicidad a las muestras. Las imágenes se capturan mediante cámaras web de alta resolución, de bajo coste, aunque pueden usarse otros tipos de cámaras.

Como se muestra en la Fig. 22 de la Patente de EE. UU. núm. 7.963.906 (Véase también el documento PCT/2011/053537), cada microscopio del sistema prototipo descrito anteriormente se usa para captar imágenes de una placa de cultivo que puede contener cualquiera de 1-30 embriones. El microscopio recoge luz desde una LED de luz blanca conectada a un disipador de calor para ayudar a disipar cualquier calor generado por la LED, que es muy pequeño para tiempos de exposición breves. La luz pasa a través de un parche de campo oscuro convencional para parar la luz directa, a través de una lente de condensador y en una muestra marcada "placa de petri", que es una placa de cultivo que contiene los embriones que se cultivan y se estudian. La placa de cultivo puede tener pocillos que ayudan a mantener el orden de los embriones y no permitir que se muevan mientras la placa se lleva a y desde la incubadora. Los pocillos pueden estar lo suficientemente cerca para que los embriones puedan compartir la misma gota de medio. La luz dispersa se pasa entonces a través del objetivo de un microscopio, después a través de un doblete acromático y a un sensor CMOS. El sensor CMOS actúa como una cámara digital y está conectado a un ordenador para el análisis y seguimiento de las imágenes como se describe anteriormente.

Este diseño es fácilmente escalable para proporcionar significativamente más canales y diferentes técnicas de iluminación, y puede modificarse para acomodar dispositivos fluidos para alimentar las muestras. Además, el diseño puede integrarse con un sistema de control de retroalimentación, donde las condiciones de cultivo tales como temperatura, CO<sub>2</sub> (para controlar el pH), y el medio se optimizan a tiempo real en base a la retroalimentación y a partir de los datos de captación de imágenes. Este sistema se usó para conseguir vídeos secuenciales del desarrollo del embrión humano, que tiene utilidad en la determinación de la viabilidad del embrión para procedimientos de fecundación in vitro (FIV). Otras aplicaciones incluyen terapia con células madre, cribado de fármacos y manipulación de tejidos.

En una realización del dispositivo, la iluminación se proporciona por un diodo emisor de luz (LED) blanca Luxeon montado en un disipador de calor de aluminio y alimentado por un conductor regulado de corriente BuckPuck. La luz del LED se pasa a través de una lente de colimación. La luz colimada pasa después a través de un disco especial producido por láser a medida, como se muestra en la Fig. 22 de la Patente de EE. UU. núm. 7.963.906, y se enfoca en un cono hueco de luz usando una lente de condensador esférico. La luz que se transmite directamente a través de la muestra es rechazada por el objetivo, mientras que la luz que se dispersa por la muestra se recoge. En una realización, se usan objetivos Olympus con amplificación 20X, aunque pueden usarse menores ampliaciones para aumentar el campo de visión, o mayores ampliaciones pueden usarse para aumentar la resolución. La luz recogida se pasa después a través de una lente de doblete acromático (es decir lente de tubo) para reducir los efectos de la aberración cromática y esférica. De forma alternativa, la luz recogida desde el objetivo de captación de imágenes puede pasarse a través de otro objetivo, apuntado en la dirección contraria, que actúa como una sustitución a la

lente de tubo. En una configuración, el objetivo de captación de imágenes puede ser un objetivo 10X, mientras que el objetivo de lente de tubo puede ser un objetivo 4X. La imagen resultante se captura por un sensor CMOS con una resolución de 2 megapíxeles (1600 x 1200 píxeles). Diferentes tipos de sensores y resoluciones pueden usarse también.

5 Por ejemplo, la Fig. 23A de la Patente de EE. UU. núm. 7.963.906 (Véase también el documento PCT/2011/053537) muestra un esquema de la serie de microscopios multi-canal que tiene 3 microscopios idénticos. Todos los componentes ópticos se montan en tubos de lente. En la operación del sistema, las placas de Petri se cargan en plataformas acrílicas que se montan en platinas inclinadas de 2 ejes manuales, que permiten el ajuste del plano de la imagen respecto al eje óptico. Estas pletinas están fijas a la base del microscopio y no se mueven después de la alineación inicial. Los módulos de iluminación, que consisten en LED, lentes del colimador, discos especiales y lentes del condensador, se montan en platinas xyz manuales para posicionar y enfocar la luz de iluminación. Los módulos de captación de imágenes, que consisten en los objetivos, lentes acromáticas y sensores CMOS, se montan también en platinas xyz manuales para colocar el campo de visión y enfocar los objetivos. Los 3 módulos de captación de imágenes se unen a rampas lineales y se soportan por un único brazo en palanca, que se acciona usando un motor de pasos. Esto permite el enfoque controlado por el ordenador y la captura automática de pilas de imágenes. Pueden usarse otros métodos de enfoque automático además de la activación.

La serie de microscopios se puso dentro de la incubadora estándar, como se muestra en, por ejemplo, la Fig. 23B de la Patente de EE. UU. núm. 7.963.906 (véase además la memoria PCT/2011/053537). Los sensores de imagen CMOS se conectan por medio de conexión USB a un conector único situado dentro de la incubadora, que se dirige a un PC externo junto con otras comunicaciones y líneas de energía. Todos los cables eléctricos salen de la incubadora a través del centro de un tapón de caucho sellado con silicona.

La serie de microscopios descrita anteriormente, o una similar, puede usarse para grabar imágenes secuenciales del desarrollo temprano del embrión humano y el crecimiento documentado del cigoto a través de etapas de blastocisto. En algunas realizaciones, las imágenes pueden capturarse cada 5 minutos con apenas 1 segundo de exposición a luz baja por imagen. La cantidad total de luz recibida por las muestras puede ser equivalente a 52 segundos de exposición continua, similar al nivel total experimentado en una clínica de FIV durante el manejo. La duración de 1 segundo de exposición a la luz por imagen puede reducirse en algunas realizaciones. Antes de trabajar con los embriones humanos, se realizaron extensos experimentos de control con embriones de pre-implantación de ratones para asegurar que tanto los patrones de tasa de formación de blastocisto como de expresión génica no estuvieron afectados por el proceso de captación de imágenes.

Los embriones individuales pueden seguirse en el tiempo, aunque sus posiciones en el campo fotográfico se desplazaron mientras los embriones experimentaban un cambio de medio, en algunos casos el medio se cambió el día 3. El uso de medio secuencial puede ser necesario para cumplir los requisitos específicos de la etapa de los embriones en desarrollo. Durante el cambio de medio, los embriones se quitaron de la estación de captación de imágenes durante unos pocos minutos y se transfirieron a nuevas placas de Petri. El problema del seguimiento de la identidad del embrión puede mitigarse usando pocillos para ayudar en la disposición de los embriones en un orden particular.

Cuando se transfieren las placas petri entre diferentes estaciones, los embriones pueden a veces moverse, haciendo así difícil controlar la identidad del embrión. Esto plantea un desafío cuando la captación de imágenes secuenciales se realiza en una estación, y los embriones se mueven posteriormente a una segunda estación para la selección y transferencia del embrión. Un método es cultivar embriones en placas de petri individuales. Sin embargo, esto necesita que cada embrión tenga su propia gota de medio. En un procedimiento de FIV típico, normalmente es deseable cultivar todos los embriones de una paciente en la misma placa de petri y en la misma gota de medio. Para abordar este problema, se ha diseñado una placa de petri a medida con micro-pocillos. Esto evita que los embriones se muevan y mantiene su disposición en la placa de petri cuando se transfiere a y de la incubadora o estaciones de captación de imágenes. Además, los pocillos son suficientemente pequeños y están cerca entre ellos de manera que pueden compartir la misma gota de medio y verse todos de forma simultánea por el mismo microscopio. La superficie del fondo de cada micro-pocillo tiene un acabado de calidad óptica. Por ejemplo, la Fig. 27A en la Patente de EE. UU. núm. 7.963.906 (Véase también el documento PCT/2011/053537) muestra un dibujo con dimensiones para una realización ejemplar. En esta versión, hay 25 micro-pocillos que están cerca entre ellos en un campo de visión de 1,7 x 1,7 mm. La Fig. 27B de la Patente de EE. UU. núm. 7.963.906 (véase además el documento PCT/2011/053537) muestra una vista 3D de los micro-pocillos, que están retrasados aproximadamente 100 micras en la superficie de la placa. Los marcadores fiduciaros, que incluyen letras, números, y otros marcadores, están incluidos en la placa para ayudar con la identificación. Todas las referencias citadas en la presente memoria, incluyendo patentes, solicitudes de patentes, manuscritos y similares se incorporan específica y completamente por referencia en sus totalidades.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proponen para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción de cómo hacer y usar la presente invención, y no se pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención ni pretenden presentar que los experimentos posteriores son todos o los únicos experimentos

realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (p.ej., cantidades, temperatura, etc.) aunque algunos errores experimentales y desviaciones deberían tenerse en cuenta. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es peso molecular promedio en peso, la temperatura está en grados centígrados, y la presión es atmosférica o casi atmosférica.

## 5 Ejemplo 1

Un estudio de cohorte retrospectivo multisitio se comenzó usando datos de imágenes recogidos de 651 embriones de 67 pacientes de cinco clínicas en un periodo de 16 meses. Los embriones de las pacientes se captaron por imágenes usando una prueba Eeva™ (Auxogyn, Inc.), un sistema de captación de imágenes secuenciales desarrollado para la predicción de blastocistos que realiza análisis secuencial de los tiempos de división celular claves.

Todos los embriones captados por imagen se identificaron como que tenían 2 pronúcleos (PN) antes de ponerse en una placa Eeva multi-pocillo que permite que los embriones se sigan de forma individual mientras comparten una única gota de medio de cultivo. Se realizó una comprobación de fecundación según el protocolo estándar de cada clínica. Todos los embriones 2PN se transfirieron a la placa Eeva inmediatamente después de que se evaluara el estado de fecundación, y la placa se puso en el área de acción de Eeva en la incubadora. Para mantener un proceso de captación de imágenes continuo e ininterrumpido desde el Día 1 al Día 3, no se permitieron cambios de medio o extracción de la placa de la incubadora. En el día 3, la captación de imágenes se paró justo antes de que se realizara la clasificación de embriones rutinaria. Todos los embriones se siguieron de forma individual para mantener sus identidades. La clasificación, selección y transferencia de embriones (en los Días 3 o 5), se realizaron según los procedimientos de operación estándar de cada clínica individual.

El resultado del desarrollo embrionario se midió mediante la clasificación de la morfología total y la tasa de formación de blastocistos. La clasificación total de los embriones se determinó usando la etapa de división y la clasificación morfológica en la etapa de blastocisto como se define por la Sociedad para la Tecnología Reproductiva Asistida (SART) (Racowsky, C., et al., Fertil Steril, 2010, 94(3): pág. 1152-3; Vernon, M., et al., Fertil Steril, 2011, 95(8): pág. 2761-3). Se incluyó en el análisis una discriminación adicional entre los embriones del Día 3 con 6-10 células para enfocarse en los embriones de máxima calidad con  $\leq 10\%$  de fragmentación. La implantación se confirmó por ultrasonido mostrando evidencia de movimiento cardiaco fetal intrauterino a aproximadamente 6-8 semanas de edad gestacional. La implantación conocida incluyó datos en los que el estado de implantación embrionaria se confirmó, p.ej., el número de sacos gestacionales era igual al número de embriones transferidos.

Los valores medios se compararon usando una prueba t usando SAS. Las asociaciones entre la presencia o ausencia de fenotipos atípicos y calidad embrionaria y potencial de desarrollo se examinaron usando una prueba de chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher para evaluar la significancia estadística, donde  $p < 0,05$  se consideró que era estadísticamente significativo.

Los vídeos de embriones se revisaron para el fenotipo y la duración de la 1ª citocinesis (P1). “Fenotipo anormal” o “A1<sup>cit</sup>” se definió como plegado de oolema y/o formación de pseudo surcos de división. La duración de P1 se definió como el tiempo desde la formación del surco propiamente dicho al punto temporal cuando las nuevas células hijas están completamente separadas por membranas celulares confluentes. Se crearon entonces dos subgrupos adicionales: embriones que muestran A1<sup>cit</sup> con P1 prolongado ( $P1 \geq 0,5$  horas) o P1 más corto ( $P1 < 0,5$  horas). El grupo de control estaba compuesto por embriones que no mostraban o A1<sup>cit</sup> o P1 prolongado.

La prevalencia total de A1<sup>cit</sup> fue 30,7% entre todos los embriones revisados y el 88,0% de las pacientes tuvo embriones A1<sup>cit</sup> (59/67). En comparación con los embriones de control (sin A1<sup>cit</sup>), los embriones que mostraban A1<sup>cit</sup> tenían menor tasa de embriones de buena morfología en el Día 3 (6-10 células y  $\leq 10\%$  de fragmentación, 40,7% frente a 62,9%,  $p < 0,0001$ ), mayor tasa de embriones con alta fragmentación ( $> 25\%$  de fragmentación, 16,1% (19/118) frente a 6,7% (23/345),  $p < 0,001$ ), menos embriones con división con clasificación total buena o razonable, (79,7% frente a 90,7%,  $p = 0,001$ ), y menor tasa de formación de blastocistos (21,7% frente a 44,6%,  $p < 0,0001$ ) (Tabla 2). Sin embargo, ambos grupos formaron tasas similares de blastocistos de calidad buena o razonable (69,2% frente a 52,3%,  $p = 0,1$ ) y mostraron diferencias distintas, aunque estadísticamente significativas en la tasa de implantación (6,2% frente a 16,5%,  $p = 0,1$ ).

Tabla 2. Primera citocinesis anormal (A1<sup>cit</sup>): calidad del embrión y potencial de desarrollo para embriones del Día 3 y del Día 5.

Primera citocinesis anormal (A1 <sup>cit</sup> )	Día 3. 6-10 células con ≤10% de frag.	Día 3. Clasificación total buena/razonable	Tasa de formación de blastocistos	Clasificación total de blastocistos buena/razonable	Embriones transferidos o congelados	Datos de implantación conocidos
Control: sin A1 <sup>cit</sup> (n=443)	62,9% (217/345)	90,7% (313/345)	44,6% (131/294)	52,3% (69/131)	48,5% (215/443)	16,5% (15/91)
Con A1 <sup>cit</sup> (n=196)	40,7% (48/119)	79,7% (94/119)	21,67% (26/120)	69,2% (18/26)	34,2% (67/196)	6,2% (2/32)
Valor p	<0,0001	<0,001	<0,0001	0,1	0,0005	0,1

Un subconjunto de 53,1% de embriones que mostraban A1<sup>cit</sup> también mostraron tiempos de P1 prolongados (0,5±0,8 frente a 1,8±3,3 horas, p<0,0001). En comparación con los embriones de control, el subgrupo de embriones con P1≥0,5 horas tenía una tasa de formación de blastocistos incluso menor (9,2% frente a 44,6%, p<0,0001), y ninguno de los embriones con A1<sup>cit</sup> y P1≥0,5 horas se implantaron. Para evaluar este subgrupo más, los embriones con A1<sup>cit</sup> se compararon en base a P1 (Tabla 3). En comparación con los embriones A1<sup>cit</sup> con P1 más corta, los embriones A1<sup>cit</sup> con P1 prolongada tenía una morfología más pobre en el Día 3 (6-10 células y ≤10% de fragmentación, 18,5% frente a 58,5%, p<0,0001), mayor tasa de embriones con alta fragmentación (>25% de fragmentación, 26,4% frente a 7,7%, p<0,0001), y menor tasa de formación de blastocistos (9,2% frente a 36,4%, p<0,0003). La diferencia en la tasa de implantación fue notable pero no estadísticamente significativa (0,0% frente a 11,8%, p=0,3). Cuando se considera el número de embriones transferidos o congelados, el grupo de fenotipo A1<sup>cit</sup> tenía 34,2%, mientras que el grupo de control tenía 48,5% (p=0,0005). La mayoría de los embriones transferidos o congelados con A1<sup>cit</sup> tenían tiempos de P1 más cortos (65,7%, 44/67).

Tabla 3. Primera citocinesis anormal (A1<sup>cit</sup>) y P1: calidad embrionaria y potencial de desarrollo para embriones el día 3 y el día 5.

Primera citocinesis anormal (A1 <sup>cit</sup> )	Día 3. 6-10 células con ≤10% de frag.	Día 3. Clasificación total buena/razonable	Tasa de formación de blastocistos	Clasificación total de blastocistos buena/razonable	Embriones transferidos o congelados	Datos de implantación conocidos
Con A1 <sup>cit</sup> y P1≥0,5 (n=104)	18,5% (10/54)	64,8% (35/54)	9,2% (6/65)	66,7% (4/6)	22,1% (23/104)	0,0% (0/14)
Con A1 <sup>cit</sup> y P1<0,5 (n=92)	58,5% (38/65)	90,8% (59/65)	36,4% (20/55)	70,0% (14/20)	47,8% (44/92)	11,8% (2/17)
Valor p	<0,0001	<0,001	0,0003	0,9	0,0002	0,3

Los embriones que muestran fenotipos A1<sup>cit</sup> representan el 31% de la población de embriones y tienen un potencial de desarrollo significativamente menor. Adicionalmente, aproximadamente la mitad de los embriones que muestran A1<sup>cit</sup> también muestran unos tiempos de primera citocinesis prolongados (P1≥0,5 horas), que se asoció con menores tasas de formación de blastocistos en comparación con los embriones A1<sup>cit</sup> con tiempos más cortos de primera citocinesis (P1<0,5 horas).

La combinación del fenotipo A1<sup>cit</sup> y los tiempos de la primera citocinesis puede usarse para discriminar con precisión aquellos embriones con baja competencia de desarrollo. Los embriones A1<sup>cit</sup> con P1≥0,5 horas tenían la formación de blastocistos más baja de todos los subgrupos evaluados. De forma importante, muchos embriones A1<sup>cit</sup> en ambos grupos de tiempo tienen buena morfología en el día 3, y los embriones A1<sup>cit</sup> que son capaces de desarrollarse el día 5 son en su mayoría blastocistos de buena calidad que tienen el potencial de seleccionarse para la transferencia. Menos números de embriones con A1<sup>cit</sup> se seleccionaron para la transferencia, y se observó una tasa de implantación muy baja. Ya que muchos de estos embriones tienen buena morfología en la etapa de división, el uso de intervalos para detectar los fenotipos de 1ª citocinesis anormal y prolongada puede mejorar el éxito de la selección embrionaria.

El fenotipo DA se definió como embriones que producen más de 2 células durante un único suceso de división celular. Dos tipos independientes de fenotipos DA se evaluaron. Los fenotipos DA1 se grabaron cuando los embriones mostraron una primera división que dio más de dos blastómeros, y los fenotipos DA2 se grabaron cuando

los embriones mostraron una división de célula hija que dio más de dos blastómeros. El grupo de control estaba compuesto por embriones que tenían una primera división apropiada que dio dos blastómeros y divisiones de células hijas apropiadas, es decir, cada una dio dos blastómeros.

5 La prevalencia total de embriones DA fue de 18,0% entre todos los embriones revisados (DA1: 35/639 8,3%; DA2: 39/639 9,2%; tanto DA1 como DA2: 1/639 0,5%) y el 73,1% de las pacientes tenía embriones DA (49/67). Ambos grupos, control (sin DA) y DA, tuvieron tasas similares de embriones con división con una clasificación total de buena a razonable (86,3% frente a 88%,  $p=0,4$ ), además de tasas similares de embriones con alta fragmentación (>25% de fragmentación, 9,9% (8/81) frente a 8,9% (34/383),  $p=0,6$ ) (Tabla 4). Sin embargo, el grupo DA tenía significativamente menos embriones de buena calidad en el día 3 (6-10 células y  $\leq 10\%$  de fragmentación, 46,9% frente a 59,3% para el control,  $p=0,4$ ). Entre las transferencias embrionarias del día 3, la incidencia de embriones DA fue 28,6%, y la mayoría de los embriones mostraron DA2, 19,0% (20/105), seguido por 8,6% de embriones con DA1 (9/105) y 1,0% de DA1 y DA2 (1/105). De forma importante, en comparación con el grupo de control, los embriones DA tuvieron menor tasa de formación de blastocistos (11,7% frente a 43,1%,  $p<0,0001$ ) y mostraron una tendencia hacia una menor tasa de implantación (3,7% frente a 18,0%,  $p=0,05$ ), aunque no mostraron diferencia en referencia al porcentaje de blastocistos buenos o razonables (62,5% frente a 55%,  $p=0,7$ ). En referencia al número de embriones transferidos o congelados, el grupo de control tuvo 44,8% mientras que el grupo DA tuvo 37,4% ( $p=0,1$ ).

Tabla 4. División anormal (DA): Calidad del embrión y potencial de desarrollo para embriones el día 3 y día 5.

División anormal (DA)	Día 3. 6-10 células con $\leq 10\%$ de frag.	Día 3. Clasificación total buena/razonable	Tasa de formación de blastocistos	Clasificación total de blastocistos buena/razonable	Embriones transferidos o congelados	Datos de implantación conocidos
Control: sin DA (n=524)	59,3% (227/383)	88% (337/383)	43,1% (149-346)	55,0% (82/149)	44,8% (239/524)	18,0% (19/105)
Con DA (n=115)	46,9% (38/81)	86,4% (70/81)	11,7% (8/68)	62,5% (5/8)	37,4% (43/115)	3,7% (1/27)
Valor p	0,04	0,4	<0,0001	0,7	0,1	0,05

20 El presente estudio caracterizó los fenotipos tanto DA1 como DA2 en la población embrionaria total, en embriones de buena morfología y en embriones que se seleccionan para la transferencia. Entre los 142 embriones transferidos en el día 3 o el día 5, hasta el 21,1% mostró al menos una DA. Más específicamente, el 6,3% de embriones transferidos mostró DA1 (9/142) y el 14,0% mostró DA2 (20/142). La incidencia de embriones DA se enriqueció a 28,6% entre los embriones transferidos el día 3 (DA1: 9/105 8,6%; DA2: 20/105 19,0%; tanto DA1 como DA2: 1/105 1,0%), y la evaluación adicional reveló que esta alta tasa de DA puede explicarse por la presencia de embriones DA de alta calidad (simetría casi perfecta, baja fragmentación) en el día 3. De forma notable, el único embrión DA transferido el día 5 fue un embrión DA2 que en última instancia se implantó con éxito, mientras que no se implantaron embriones DA1. Los embriones DA2 pareció además que tenían una tasa de blastocistos significativamente mayor que los embriones DA1, sugiriendo que los sucesos de división anormal posteriores después de la primera división celular pueden representar un fenotipo anormal más suave donde el embrión podría tener potencialmente menos células cromosómicamente anormales o podría expresar mosaicismo compatible con el potencial de desarrollo embrionario y la implantación. Una evaluación adicional indicó que la prevalencia de DA en cohortes de pacientes (0% frente a 1-25% frente a  $\geq 25\%$ ) se correlacionó de forma inversa con el embarazo clínico (50% frente a 31,3% frente a 11,1%); las pacientes con una mayor frecuencia de DA en su cohorte tenían tasas de embarazo clínico estadísticamente menor ( $p<0,05$ ). Tomados juntos, estos datos muestran claramente que los embriones DA alcanzan la etapa de blastocisto en una tasa mucho menor y presentan una tasa de implantación/embarazo mucho menor que los embriones que no presentan DA. Estos nuevos parámetros de división proporcionan un indicador temprano de embriones con bajo potencial de desarrollo. Por consiguiente, estos parámetros pueden usarse solos, o en combinación con parámetros descritos anteriormente, tales como los descritos en las Patentes de EE. UU. núms. 7.963.906; 8.323.177 y 8.337.387 y la Solicitud PCT núm.: WO 2012/163363 para seleccionar embriones que lo más probable es que alcancen el blastocisto y/o se implanten en el útero y deseleccionar embriones que es probable que no alcancen el blastocisto y/o se implanten en el útero.

35 Por consiguiente, estos parámetros (es decir los fenotipos A1<sup>cit</sup> y/o la duración P1 prolongada ( $P1 \geq 0,5$  h y/o DA)) pueden usarse solos, o en combinación con los parámetros descritos anteriormente, tal como los descritos en las Patentes de EE. UU. núms. 7.963.906; 8.323.177 y 8.337.387 y la Solicitud PCT núm.: WO 2012/163363 para seleccionar embriones que lo más probable es que alcancen el blastocisto y/o se implanten en el útero y deseleccionar embriones que es probable que no alcancen el blastocisto y/o se implanten en el útero.

Ejemplo 2



Un análisis adicional del estudio de cohorte retrospectivo descrito en el ejemplo anterior se realizó para evaluar la división caótica.

5 El fenotipo de división caótica se definió por la aparición de comportamiento de división desordenada en la etapa de 4 células. La división caótica se visualiza usando la microscopía secuencial cuando las primeras divisiones celulares son erráticas y frecuentemente dan por resultado blastómeros de tamaño irregular y/o fragmentos. El grupo de control para este fenotipo estaba compuesto por embriones que mostraban comportamiento de división ordenada con divisiones celulares claras.

10 La prevalencia total de la división caótica fue de 15% entre todos los embriones revisados y el 58,2% de las pacientes tuvieron al menos un embrión con división caótica (39/67). En comparación con el grupo de control (sin división caótica), los embriones con división caótica tuvieron una morfología más pobre en el día 3 (6-10 células y  $\leq 10\%$  de fragmentación, 3,7% frente a 64,1%  $p < 0,0001$ ), una mayor tasa de embriones altamente fragmentados ( $> 25\%$  de fragmentación, 61,5% (59/96) frente a 9,6% (52/543),  $P > 0,0001$ ), menos embriones en etapa de división con una clasificación total de buena o razonable (35,2% frente a 94,6%  $p < 0,0001$ ) y una menor tasa de formación de blastocistos (14,1% frente a 42,3%,  $p < 0,001$ ). (Tabla 5) Ambos grupos presentaron porcentajes similares de blastocistos buenos o razonables (55,6% frente a 55,4%,  $P = 0,9$ ). Cuando se consideró el número de embriones transferidos o congelados, el grupo de división caótica tuvo el 13,5% mientras que el grupo de control tuvo el 49,5% ( $p < 0,001$ ). Respecto a la implantación, ninguno de los embriones que mostraron división caótica se implantó con éxito, mientras que se implantó el 18,2% de los embriones de control.

20 Tabla 5: División caótica. Comparación de diferentes resultados entre el grupo de control (sin división caótica) y embriones con división caótica

División caótica	Día 3, 6-10 células (n=464)		Tasa de formación de blastocistos (n=414)	Clasificación total buena/razonable de blastocistos (n=157)	Embriones transferidos o congelados (n=639)	Datos de implantación conocidos (n=139)
	Clasificación total buena/razonable	$\leq 10\%$ de frag.				
Control (sin división caótica)	94,6% (388/410)	64,1% (263/410)	43,3% (148/350)	55,4% (82/148)	49,5% (269/543)	18,2% (24/132)
Con división caótica	35,2% (19/54)	3,7% (2/54)	14,0% (9/64)	55,6% (5/9)	13,5% (13/96)	0,0% (0/7)
Valor P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,99	<0,001	0,3

25 Tomados juntos, en la revisión de fenotipos embrionarios atípicos, se observó constantemente un único patrón en que los embriones mostraron patrones de división errática, movimiento constante de las membranas del blastómero y frecuente fragmentación. Este fenotipo dinámico normalmente dio por resultado blastómeros asimétricos y/o fragmentos que a menudo hacen difícil distinguir las divisiones celulares reales y el conteo celular resultante. Hasta ahora, el fenotipo de división caótica no se ha descrito para embriones humanos.

30 La mayoría de los embriones con división caótica (86,5%) no se consideraron candidatos para transferencia o congelación cuando estaban disponibles mejores embriones, presumiblemente porque los embriones altamente fragmentados son normalmente la última elección durante la selección embrionaria. Sin embargo, un pequeño porcentaje de embriones que muestran división caótica (35,2%) muestran bajos patrones de fragmentación y se les asignó una clasificación de morfología total buena o razonable en el día 3. Además, aunque solo 9 de 64 (14,1%) embriones con división caótica se desarrollaron a blastocistos, la mayoría de estos blastocistos se clasificaron como que tenían morfología buena o razonable. Sin embargo, de los siete embriones con división caótica que de hecho se transfirieron, ninguno de ellos se implantó. Por lo tanto, en base a una menor calidad el día 3 y menor formación de blastocistos y calidad, este fenotipo puede usarse como un criterio de desección para mejorar la evaluación exitosa. El fenotipo con división caótica puede ser también importante para evaluar ya que la gran mayoría de parámetros secuenciales asociados con resultados clínicos que se usan e investigan actualmente son dependientes del reconocimiento de los tiempos exactos de la(s) división(ones) celular(es).

### Ejemplo 3

40 El análisis adicional del estudio de cohorte retrospectivo descrito en el ejemplo anterior se realizó para evaluar los parámetros A1<sup>cit</sup>, y o DA y/o división caótica, en combinación con otros parámetros de fenotipo atípico. Usando los

datos de las 67 pacientes y 639 películas de embriones, se analizaron unos embriones con uno o más fenotipos atípicos.

5 Los fenotipos atípicos examinados fueron división anormal (DA), singamia anormal (SA), primera citocinesis anormal (A1<sup>cit</sup>) y división caótica. Los fenotipos A1<sup>cit</sup> y DA se definieron como se describe en el Ejemplo 1. El fenotipo de división caótica se definió en el Ejemplo 2. El fenotipo SA se definió como embriones que mostraban movimiento desordenado en el citoplasma sin dispersión rápida de las membranas nucleares.

10 La prevalencia total de embriones que mostraban uno o más fenotipos atípicos fue 54,2% entre todos los embriones revisados y prevalente en 98,5% (66/67) entre todos los casos de pacientes. En comparación con el grupo de control (sin ningún fenotipo atípico), los embriones con al menos un fenotipo atípico tendieron a tener menos embriones de buena calidad en el día 3 (6-10 células y  $\leq 10\%$  de fragmentación, 46,2% frente a 68,4%,  $p < 0,0001$ ), mayor tasa de embriones altamente fragmentados ( $> 25\%$  de fragmentación, 28,4% (100/352) frente a 5,74% (17/297)  $p < 0,0001$ ) y menos embriones con división con clasificación total buena o razonable (80,3% frente a 94,7%,  $p < 0,0001$ ) (Tabla 4). Ambos grupos presentaron una tasa de formación de blastocistos similar (52,1% frente a 56,9%,  $p = 0,6$ ) y porcentajes similares de blastocistos de calidad buena o razonable (52,1% frente a 56,9%,  $p = 0,6$ ), aunque tenían diferencias estadísticamente significativas en el número de embriones transferidos o congelados (34,7% frente a 53,9%,  $p < 0,0001$ ). Los embriones con al menos un fenotipo también tenían una menor tasa de implantación estadísticamente significativa (8,6% frente a 21,9%,  $p = 0,02$ ).

Tabla 6. Embriones que muestran uno o más fenotipos atípicos: calidad del embrión y potencial de desarrollo para embriones el día 3 y el día 5.

Uno o más fenotipos atípicos	Día 3. 6-10 células con $\leq 10\%$ de frag.	Día 3. Clasificación total buena/razonable	Tasa de formación de blastocistos	Clasificación total de blastocistos buena/razonable	Embriones transferidos o congelados	Datos de implantación conocidos
Control: sin ningún fenotipo atípico (n=297)	67,8% (166/245)	94,7% (232/245)	53,7% (109/203)	56,9% (62/109)	53,9% (160/297)	21,9% (16/64)
Sin uno o más fenotipos atípicos (n=352)	45,4% (99/218)	80,3% (175/218)	22,4% (48/214)	52,1% (25/48)	34,7% (122/352)	8,6% (5/58)
Valor p	$< 0,0001$	$< 0,0001$	$< 0,0001$	0,6	$< 0,0001$	0,02

20 El grupo de embriones que muestran uno o más fenotipos atípicos fue estadísticamente significativamente diferente del grupo de control para la mayoría de los resultados. 5 de cada 10 embriones mostraron al menos un fenotipo atípico: el 18,8% de los embriones mostraron al menos 2 fenotipos (122/649), el 6,5% mostraron 3 fenotipos (42/649) y el 1,1% mostraron 4 fenotipos (7/649). Esta prevalencia extraordinariamente alta en las cohortes de embriones sugiere que se necesitan urgentemente herramientas para deseleccionar estos fenómenos dinámicos para aumentar las oportunidades de seleccionar un embrión competente, particularmente ya que este estudio ha demostrado que muchos embriones que muestran fenotipos normales tienen buena morfología convencional en el día 3 y el día 5.

25

## REIVINDICACIONES

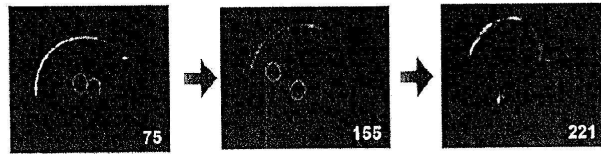
1. Un método para deseleccionar uno o más embriones humanos con pobre potencial de desarrollo que comprende:
- (A) cultivar in vitro uno o más embriones bajo condiciones suficientes para el desarrollo embrionario;
- 5 (B) captar imágenes secuenciales de dichos uno o más embriones durante un periodo de tiempo suficiente para medir al menos una división celular; y
- (C) deseleccionar un embrión con pobre potencial de desarrollo cuando el embrión muestra un fenotipo anormal en la segunda división (DA2)
- Deseleccionando por consiguiente un embrión con pobre potencial de desarrollo, en el que el embrión con pobre potencial de desarrollo no es probable que alcance la etapa de blastocisto o se implante con éxito en el útero.
- 10 2. El método según la reivindicación 1 que comprende deseleccionar un embrión cuando el embrión muestra un fenotipo anormal en la segunda división (DA2) y la primera división (DA1).
3. El método según la reivindicación 1 en el que la desección comprende elegir no implantar el embrión determinado por tener pobre potencial de desarrollo en el útero.
- 15 4. El método según la reivindicación 1 que comprende además medir uno o más parámetros celulares seleccionados del grupo que consiste en:
- (a) la duración de la primera citocinesis;
- (b) el tiempo entre la primera y segunda mitosis;
- (c) el tiempo entre la segunda y tercera mitosis;
- (d) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 1 y la citocinesis 2;
- 20 (e) el intervalo de tiempo entre la citocinesis 2 y la citocinesis 3;
- (f) el intervalo de tiempo entre la fecundación y la etapa de 5 células;
- (g) la duración del primer ciclo celular; y
- (h) el intervalo de tiempo entre la singamia y la primera citocinesis.
- 25 5. El método según la reivindicación 1 en el que dicho uno o más embriones se producen por fecundación de ovocitos in vitro y opcionalmente en el que dichos ovocitos se maduran in vitro y opcionalmente en el que dichos ovocitos maduros in vitro se suplementan con factores de crecimiento.
6. El método según la reivindicación 1 en el que dicho uno o más embriones no se han congelado antes del cultivo.
7. El método según la reivindicación 1 en el que dicho uno o más embriones se han congelado antes del cultivo.
- 30 8. El método según la reivindicación 1 en el que la desección de un embrión con pobre potencial de desarrollo está automatizado.
9. El método según la reivindicación 1 en el que dicha captación de imágenes secuenciales consigue imágenes que se almacenan digitalmente.
10. El método según la reivindicación 1 en el que dicha captación de imágenes secuenciales emplea iluminación de campo oscuro.
- 35 11. El método según la reivindicación 1 en el que dicho uno o más embriones humanos se ponen en una placa de cultivo antes del cultivo bajo condiciones suficientes para el desarrollo embrionario.
12. El método según la reivindicación 11 en el que dicha placa de cultivo comprende una pluralidad de micropocillos y opcionalmente en el que dicha placa de cultivo comprende de 1 a aproximadamente 30 micropocillos.
- 40 13. El método según la reivindicación 12 en el que uno o más embriones humanos se pone en un micropocillo antes del cultivo en condiciones suficientes para el desarrollo embrionario.
14. El método según la reivindicación 1 en el que la medida se realiza en una estación de captación de imágenes.

Figura 1

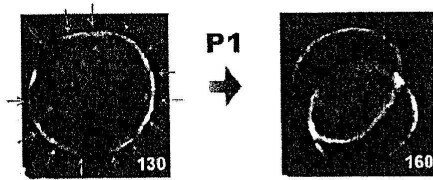
FENOTIPO DEL EMBRIÓN	DEFINICIÓN	ESQUEMA	PREVALENCIA
Singamia anormal (SA)	Embriones con movimiento PN desordenado en el citoplasma, acompañado por dispersión retrasada de las membranas nucleares		<p>Singamia anormal (SA) N=649</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sin SA N=443 68,3%</li> <li>Con SA N=163 25,1%</li> <li>Immensurable N=43 6,6%</li> </ul>
Primera citocinesis anormal (A1 <sup>ca</sup> )	Los embriones muestran doblado de coeloma; y posible pseudo surcos, antes de la primera citocinesis		<p>Primera citocinesis anormal (A1<sup>ca</sup>) N=637</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sin A1<sup>ca</sup> N=443 69,3%</li> <li>Con A1<sup>ca</sup> N=196 30,7%</li> </ul>
División anormal (DA)	Más de 2 células producidas durante un único suceso de división celular	<p><b>DA1</b> Primera división que da &gt;2 blastómeros</p> <p><b>DA2</b> División de célula hija que da &gt;2 blastómeros</p>	<p>División anormal (DA) N=639</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sin DA N=524 82,0%</li> <li>Con DA N=115 18,0% <ul style="list-style-type: none"> <li>DA1 N=53 8,3%</li> <li>DA2 N=59 9,2%</li> <li>DA1 y DA2 N=3 0,5%</li> </ul> </li> </ul>
División caótica	Comportamiento de división desordenada en la etapa de 4 células		<p>División caótica N=633</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Sin división caótica N=543 85,0%</li> <li>Con división caótica N=96 15,0%</li> </ul>

Figura 2

Singamia  
anormal (SA)

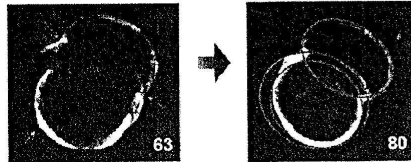


Primera citocinesis  
anormal  
(A1<sup>cit</sup>)

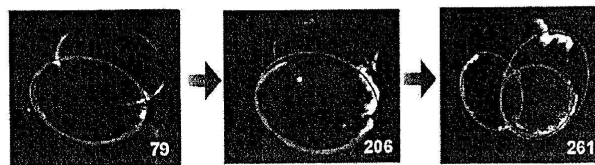


División  
anormal  
(DA)

DA1 primera división que da >2 blastómeros



DA2 división de célula hija que da >2 blastómeros



División  
caótica

