

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 025 986**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6809 (2008.01)

C12Q 1/6811 (2008.01)

C12Q 1/6827 (2008.01)

G16B 20/00 (2009.01)

G16B 30/00 (2009.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016** **PCT/CN2016/104753**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017** **WO17076359**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016** **E 16861627 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025** **EP 3372690**

54 Título: **Método de detección de anomalías cromosómicas en embriones usando cultivo de blastocistos**

30 Prioridad:

05.11.2015 CN 201510746098

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

10.06.2025

73 Titular/es:

**XUKANG MEDICAL SCIENCE & TECHNOLOGY (SUZHOU) CO., LTD. (100.00%)
Room 201 No. B7 SIP BioBay 218 Xinghu Road
Suzhou Industrial Park
Suzhou, Jiangsu 215000, CN**

72 Inventor/es:

**LU, SIJIA;
CAI, LIYI y
YAO, BING**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 3 025 986 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de detección de anomalías cromosómicas en embriones usando cultivo de blastocistos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al campo de la biomedicina y la biología celular molecular y, en particular, se refiere a un método para detectar y analizar el estado de un cromosoma embrionario usando una solución de cultivo de blastocistos.

10

Antecedentes

La técnica de FIV es una técnica poderosa contra la infertilidad. El proceso técnico se muestra como sigue: en primer lugar, obtención de múltiples óvulos (habitualmente de 8 a 15) de la madre y, a continuación, fecundación de los óvulos con el semen del padre *in vitro*. Cuando los óvulos fecundados se cultivan en solución de cultivo *in vitro* durante 5 días, el embrión es una estructura quística (es decir, un blastocisto) que consiste en aproximadamente 80 a 100 células. Tras la implantación de 2-3 blastocistos en el útero de la madre, de forma ideal de uno a tres de los blastocistos colocados en el útero pueden desarrollarse con éxito durante el embarazo normal hasta el nacimiento. Sin embargo, debido a diversas razones, la tasa de éxito de la implantación del blastocisto en el útero y del nacimiento del feto no es alta, habitualmente solo de aproximadamente un 40 %. Además de las razones de salud de la propia madre, la calidad del óvulo fecundado es una de las razones importantes que dan lugar al fracaso del desarrollo del blastocisto.

El cromosoma del óvulo fecundado procede del óvulo materno y del espermatozoide de línea paterna, y las anomalías cromosómicas de uno cualquiera darán lugar a anomalías cromosómicas de los óvulos fecundados. Hay 44 autosomas, es decir, 22 pares de autosomas (denominados diploides) y dos cromosomas sexuales (XY para hombres, XX para mujeres) en óvulos fecundados de forma normal, en cada célula embrionaria y en cada célula del feto, desde lactantes hasta adultos. En una situación anómala, puede darse más o menos de un diploide en la totalidad o en parte de cualquier cromosoma, lo que se denomina anomalía de aneuploidia. La anomalía de aneuploidia es la forma más común de anomalía cromosómica que da lugar al fracaso del desarrollo embrionario. En la técnica convencional de FIV, que depende únicamente de las observaciones morfológicas al microscopio, se seleccionan 2-3 embriones relativamente normales de múltiples embriones (habitualmente 8-15) y se implantan en el útero de la madre. La morfología normal al microscopio no puede reflejar si los cromosomas son normales. La selección incorrecta de embriones de morfología normal, pero con anomalías cromosómicas en el útero de la madre ha provocado que muchos bebés probeta no logren concebirse.

En los últimos años, se han establecido varias técnicas, denominadas colectivamente cribado genético preimplantatorio (PGS), para la detección del estado cromosómico de embriones cultivados *in vitro*, implantando de ese modo los embriones cribados con cromosomas normales en el útero de la madre para mejorar la tasa de éxito de la concepción. Los estudios han demostrado que la operación del bebé probeta que se implanta en el útero a través de PGS puede aumentar la tasa de éxito hasta más de un 60 %. Diversos métodos de PGS comprenden inmunofluorescencia (FISH), detección por chip y secuenciación de segunda generación y similares. Las muestras biológicas necesarias para las diversas detecciones mencionadas anteriormente son de una a varias células recogidas de embriones cultivados *in vitro*, y la detección para este pequeño número de células refleja si el cromosoma de todo el embrión es normal.

Específicamente, las células del trofoblasto embrionario (trofoblasto) pueden extraerse cuando los óvulos fecundados que se han cultivado durante 5 días *in vitro* se han desarrollado hasta la fase de blastocisto. El funcionamiento general consiste en usar un tubo capilar de vidrio para lisar células de una a varias células de trofoblasto bajo un microscopio para liberar cantidades vestigiales de ADN. Después de someter las cantidades vestigiales de ADN a una amplificación del genoma completo, puede detectarse el estado cromosómico de la célula usando chips de ácido nucleico o secuenciación de segunda generación (véase la solicitud de patente de CN104711362A, publicada el 17 de junio de 2015). En teoría, el estado cromosómico de varias células que se aspiran es coherente con el de otras células del embrión. Mediante la detección de estas células puede saberse si el estado cromosómico del embrión es normal. En general, se cree que el desarrollo de un embrión no se verá afectado de forma adversa por tomar varias células de trofoblasto en este momento. Por el estado de salud de los bebés nacidos, esta operación no tiene efectos sobre la salud. Sin embargo, el tiempo de existencia de esta tecnología aún es corto (solo unos pocos años). Queda por observar si existe un impacto a largo plazo en la salud de las personas a lo largo de su vida.

Además, se ha desarrollado un método para detectar la calidad embrionaria usando el blastoquilo, es decir, en primer lugar, obteniendo un ADN libre en el blastoquilo, es decir, usando una técnica de micropunción bajo un micromanipulador y usando una aguja estéril para obtener un ADN libre en el blastoquilo (véase la solicitud de patente de invención de CN104450923A, publicada el 25 de marzo de 2015; y los artículos de revista de Luca Gianaroli, M. Cristina Magli, Alessandra Pomante, *et al.* Blastocentesis: a source of DNA for preimplantation genetic testing Results from a pilot study. *Fertility and Sterility*, 2014, 102(6): 1692-1698.). Sin embargo, el blastoquilo es un líquido de la cavidad del blastocisto. Sigue siendo necesario realizar un orificio o punción en el blastocisto para obtener el blastoquilo, y su intervención seguirá provocando daños inevitables en el embrión.

En resumen, las principales desventajas de la técnica anterior son:

1. Los requisitos técnicos para la manipulación de embriones durante el muestreo celular son relativamente elevados. La manipulación errónea y la manipulación brusca pueden provocar daños graves a los embriones, y un daño excesivo puede provocar la interrupción del desarrollo embrionario.

2. Incluso con una buena manipulación, el muestreo celular provoca inevitablemente la pérdida de células y daños pequeños en el embrión. Aunque no hay evidencias de que la pérdida de células y los daños pequeños puedan tener efectos adversos en el desarrollo embrionario y la salud posnatal, el tiempo de existencia de esta tecnología es corto (solo unos pocos años), y aún queda observar si habrá un efecto a largo plazo en la salud de las personas a lo largo de su vida.

3. En raras ocasiones, se dan casos donde el estado cromosómico de las varias células muestreadas es diferente al de otras células del embrión, lo que da lugar a resultados de detección erróneos.

Por lo tanto, un medio técnico no invasivo que no dañe al propio embrión y pueda comprobar el estado cromosómico del embrión es una necesidad práctica para eliminar los peligros ocultos de la salud y garantizar la seguridad de la detección embrionaria.

El documento WO2015114574 A muestra la evaluación preimplantatoria de embriones a través de la detección de ADN embrionario libre que requiere la extracción y separación del ácido nucleico del líquido de cultivo de blastocistos usado antes de la amplificación del genoma completo.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar anomalías cromosómicas en embriones usando líquido de cultivo de blastocistos, que no provocará ningún daño a los embriones, tiene un funcionamiento sencillo y tiene mayor seguridad y fiabilidad.

Para conseguir el objeto anterior, la presente invención proporciona un método para detectar anomalías cromosómicas de un embrión usando líquido de cultivo de blastocistos, que comprende las siguientes etapas:

(1) Obtención de un líquido de cultivo de blastocistos: los óvulos fecundados se obtienen mediante un método de inyección de un solo espermatozoide, se cultivan hasta la fase de blastómero en el día 3 y luego se transfieren a una microgota de cultivo de blastocistos recién preparada para el cultivo de blastocistos. En este momento, en el tercer día, es necesario cambiar la solución para eliminar la contaminación de las células granulares desprendidas y los espermatozoides que no han fecundado;

Los embriones que forman los blastocistos se toman y se transfieren a una nueva solución de cultivo de blastocistos o a un proceso de criopreservación en vidrio. El líquido de cultivo de blastocistos original restante es de aproximadamente 1 microlitro a 500 microlitros, preferiblemente de 10 microlitros a 200 microlitros, es decir, que es una muestra a recoger para el cribado genético preimplantatorio (PGS);

(2) Recogida del líquido de cultivo de blastocistos: El líquido de cultivo de blastocistos original obtenido en la etapa (1) se transfiere a una solución de lisis y, después de la centrifugación, la muestra se somete a la siguiente etapa de amplificación del genoma completo;

(3) Amplificación del genoma completo de ADN vestigiales en el líquido de cultivo de blastocistos: se añade liasa a una mezcla de líquido de cultivo de blastocistos obtenido en la etapa (2) y una solución de lisis, se mezclan y se incuban, luego se inactiva la liasa. El lisado se retira y se añade a un tubo de reacción de PCR para la reacción PCR; y

(4) Análisis de los productos de ADN obtenidos de la amplificación del genoma completo para determinar si el estado cromosómico del embrión es normal: para el análisis se usa secuenciación de segunda generación, chip de ácido nucleico o detección por inmunofluorescencia.

Los embriones que forman los blastocistos se toman después de 2-3 días de intercambio de solución, y se transfieren a una nueva solución de cultivo de blastocistos o a un proceso de criopreservación en vidrio, y el líquido de cultivo de blastocistos original restante es de aproximadamente 1 microlitro a 500 microlitros, preferiblemente de 10 µl a 200 µl, es decir, que es una muestra a recoger para el cribado genético preimplantatorio (PGS);

en donde, los componentes de la solución de lisis en la etapa (2) son 25-45 mM de Tris-Cl, pH 7,0-8,0, 0,5-3 mM de EDTA, 10-25 mM de KCl y un detergente con una concentración de un 0,05 %-5 %, el detergente es uno o más seleccionados de un grupo que consiste en Triton X-100, Triton X-114, Tween 20, NP40 y SDS. Preferiblemente, los componentes del tampón de lisis son 40 mM de Tris-Cl, pH 7,2, 1 mM de EDTA, 15 mM de KCl y un 3 % de Triton X-100.

En una realización preferida, en la etapa (3), los cebadores usados comprenden cebadores NG, cebadores NT y cebadores de amplificación, en donde los cebadores NG y los cebadores NT comprenden una secuencia universal y una secuencia variable del extremo 5' al extremo 3', en donde la secuencia universal consiste en tres o dos de las cuatro bases de G, A, C y T; siempre que la secuencia universal no comprenda G y C al mismo tiempo;

La secuencia variable de los cebadores NG se selecciona de un grupo que consiste en: (N)nGGG, (N)xGTGG(N)y, o una combinación de las mismas; mientras que la secuencia variable de los cebadores NT se selecciona de un grupo que consiste en: (N)nTTT, (N)mTNTNG, o una combinación de las mismas; en donde N es cualquier nucleótido que puede formar pares de bases con un ácido nucleico natural, cada n es independientemente un número entero positivo seleccionado de 3-17, cada m es independientemente un número entero positivo seleccionado de 3-15 y cada uno de x e y es un número entero positivo seleccionado de 3-13, respectivamente;

Mientras, el cebador de amplificación contiene la secuencia universal en lugar de la secuencia variable.

La liasa en la etapa (3) es una o más seleccionadas de un grupo que consiste en proteinasa K, proteasa de Qiagen, pepsina, papaína, tripsina y lisozima; la concentración de la liasa es de 1-25 µg/ml, preferiblemente 20 µg/ml; la temperatura de incubación en la etapa (3) es de 30-60 °C, el tiempo de incubación es de 1 min-12 h, la temperatura de inactivación es de 75-95 °C y el tiempo de inactivación es de 1-15 min; preferiblemente la temperatura de incubación es de 40 °C, el tiempo de incubación es de 3 h, la temperatura de inactivación es de 90 °C y el tiempo de inactivación es de 5 min.

cuando la reacción PCR se realiza en la etapa (3), el tubo de reacción de PCR comprende una mezcla de amplificación, un 0,5 %-20 % de un antagonista inhibidor de PCR, 5-20 mM de dNTP, 5-100 µM de cebadores NG y NT, 50-200 µM de cebadores de amplificación, 0,5-10 unidades de ácido nucleico polimerasa y el antagonista inhibidor de PCR es uno o más seleccionados de un grupo que consiste en DMSO, betaína, formamida, glicerol y albúmina, la ácido nucleico polimerasa es una o más seleccionadas de un grupo que consiste en ADN polimerasa Phi29, ADN polimerasa Bst, polimerasa Vent, polimerasa Deep Vent, fragmento Klenow de ADN polimerasa I, retrotranscriptasa de MMLV, retrotranscriptasa de AMV, retrotranscriptasa de VIH, ADN polimerasa de superfidelidad Phusion®, polimerasa Taq, ADN polimerasa de *E. coli*, ADN polimerasa LongAmp Taq y ADN polimerasa OneTaq.

Los componentes de la mezcla de amplificación son 10-25 mM de Tris-HCl, 5-25 mM de (NH₄)₂SO₄, 5-30 mM de KCl, 0,5-5 mM de MgSO₄, un 0,1 %-20 % de DMSO y un 0,05-5 % de Triton X-100. Preferiblemente, los componentes de la mezcla de amplificación son 15 mM de Tris-HCl, 15 mM de (NH₄)₂SO₄, 20 mM de KCl, 1 mM de MgSO₄, un 5 % de DMSO y un 2 % de Triton X-100.

Los cebadores NG y NT comprenden una secuencia universal y una secuencia variable del extremo 5' al extremo 3', en donde la secuencia universal consiste en 3 o 2 de las 4 bases de G, A, C y T, siempre que la secuencia universal no comprenda simultáneamente G y C; el cebador de amplificación comprende la secuencia universal sin la secuencia variable. La secuencia variable se selecciona de un grupo que consiste en: (N)nGGG, (N)nTTT, (N)mTNTNG, (N)xGTGG(N)y, en donde N es cualquier nucleótido que puede formar pares de bases con un ácido nucleico natural, n es un número entero positivo seleccionado de 3-17, m es un número entero positivo seleccionado de 3-15, cada uno de x e y es un número entero positivo seleccionado de 3-13, respectivamente.

Preferiblemente, los cebadores NG y NT comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 1 [GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNNNN], SEQ ID NO: 2 [GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNNGGG], SEQ ID NO: 3 [GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNTTT], SEQ ID NO: 4 [GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNTNTNG] o SEQ ID NO: 5 [GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNGTGGNN], en donde N es cualquier nucleótido que pueda formar pares de bases con un ácido nucleico natural; y el cebador de amplificación tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6 [GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG] de 5' a 3'.

El procedimiento de termociclado de la amplificación del genoma completo en la etapa (3) se muestra como sigue:

(1) reacción a una primera temperatura de desnaturalización entre 90-98 °C durante 5-20 segundos;

(2) reacción a una primera temperatura de hibridación de 5-15 °C durante 5-60 s, reacción a una segunda temperatura de hibridación de 15-25 °C durante 5-60 s, reacción a una tercera temperatura de hibridación de 25-35 °C durante 30-80 s, reacción a una cuarta temperatura de hibridación de 35-45 °C durante 5-60 s y reacción a una quinta temperatura de hibridación de 45-55 °C durante 5-60 s;

(3) reacción a una primera temperatura de extensión de 55-80 °C durante 10-150 min;

(4) reacción a una segunda temperatura de desnaturalización de 90-98 °C durante 5-30 s;

(5) reacción a una sexta temperatura de hibridación de 45-70 °C durante 10-30 s;

(6) reacción a una segunda temperatura de extensión de 60-80 °C durante 1-10 minutos;

(7) repetición de las etapas (4) a (6) durante 5 a 50 ciclos;

(8) continuación de la reacción de extensión a una temperatura de 60-80 °C durante 1-10 min; y

(9) refrigeración y almacenamiento del producto amplificado a 0-5 °C.

Preferiblemente, el procedimiento de termociclado de la amplificación del genoma completo en la etapa (3) se muestra como sigue:

(1) reacción a una primera temperatura de desnaturalización entre 95 °C durante 10 segundos;

(2) reacción a una primera temperatura de hibridación de 10 °C durante 45 s, reacción a una segunda temperatura de hibridación de 20 °C durante 45 s, reacción a una tercera temperatura de hibridación de 30 °C durante 60 s, reacción a una cuarta temperatura de hibridación de 40 °C durante 45 s y reacción a una quinta temperatura de hibridación de 50 °C durante 45 s;

(3) reacción a una primera temperatura de extensión de 62 °C durante 90 min;

(4) reacción a una segunda temperatura de desnaturalización de 95 °C durante 20 s;

(5) reacción a una sexta temperatura de hibridación de 59 °C durante 20 s;

(6) reacción a una segunda temperatura de extensión de 72 °C durante 3 min;

(7) repetición de las etapas (4) a (6) durante 10 a 30 ciclos;

(8) continuación de la reacción de extensión a una temperatura de 72 °C durante 5 min; y

(9) refrigeración y almacenamiento del producto amplificado a 4 °C.

El producto de amplificación obtenido en la etapa anterior (9) se somete a etapas tales como construcción rutinaria de bases de datos, secuenciación y análisis de datos para la detección de copias de cada cromosoma y de cromosomas locales en el genoma de la muestra de acuerdo con los requisitos técnicos incluyendo, aunque sin limitación, Illumina Hiseq, Miseq, Life Technology PGM, secuenciador Proton. El número de copias de los cromosomas normales y de los cromosomas locales es 2. Cuando el número de copias es mayor de 2 (tal como $\geq 2,5$) o menor de 2 (tal como $\leq 1,8$), es un número de copias anómalo, es decir, de cromosomas anómalos. Este resultado de detección normal o anómalo representa el cromosoma normal o anómalo del embrión obtenido del líquido de cultivo. Si se implantan embriones con anomalías cromosómicas en la matriz, pueden producirse fallos de implantación embrionaria, abortos y otras consecuencias adversas. Si se implantan en la matriz solo embriones con cromosomas normales, habrá una mayor posibilidad de concepción fructuosa.

En la presente invención, se detecta ADN libre obtenido del embrión a partir de líquido de cultivo *in vitro* embrionario temprano (líquido de blastocisto) en la fase inicial del embrión para determinar el estado cromosómico del embrión (la presencia de aneuploidia cromosómica total o parcial). Como los embriones liberan una cantidad muy pequeña (aproximadamente varias decenas de picogramos) de ADN en el líquido de cultivo de blastocistos durante el desarrollo temprano del cultivo *in vitro* del embrión, para usar dicha cantidad pequeña de ADN para la detección de la aneuploidia cromosómica, el ADN debe amplificarse primero de forma uniforme a gran escala. Sin embargo, el volumen del líquido de cultivo de blastocistos es de aproximadamente 30 microlitros, de modo que el ADN obtenido del embrión en el líquido de cultivo está muy diluido. Al mismo tiempo, los componentes del líquido de cultivo embrionario son complejos y algunos de los componentes inhibirán la amplificación del ADN. La solución técnica de la presente invención supera los problemas técnicos mencionados anteriormente y establece con éxito un método técnico para detectar la aneuploidia cromosómica embrionaria a partir del líquido de cultivo de blastocistos.

Por lo tanto, en comparación con la técnica anterior, la presente invención evita la pérdida de células y los daños al embrión provocados por el método convencional de detección y muestreo de PGS, y simplifica la manipulación de adquisición de muestras de PGS; además, como el líquido de cultivo de blastocistos es originalmente un residuo durante la fase de cultivo embrionario *in vitro* de la manipulación de FIV, este residuo se detecta por la tecnología de la presente invención, por lo que apenas se añaden problemas adicionales a la clínica y se posibilita la evaluación del estado cromosómico del embrión correspondiente.

Descripción de las figuras

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos y a realizaciones específicas.

La figura 1 muestra un análisis de los resultados de la detección cromosómica de la muestra A usando líquido de cultivo de blastocistos y células de blastocisto, respectivamente, en el ejemplo 1 de la presente invención;

La figura 2 muestra un análisis de los resultados de la detección cromosómica de la muestra B usando líquido de cultivo de blastocistos y células de blastocisto, respectivamente, en el ejemplo 1 de la presente invención.

Descripción detallada

Después de investigaciones amplias y profundas, a través de un gran número de cribados y ensayos, los autores de la presente invención han descubierto inesperadamente que los embriones se cultivan en una pequeña cantidad de líquido de cultivo, y se toma una cantidad muy pequeña del líquido de cultivo para la detección, y se encuentra que los resultados de detección de las anomalías cromosómicas obtenidas tienen una exactitud extremadamente alta. En función de esto, los autores de la presente invención completaron la presente invención.

Términos

El líquido de cultivo de blastocistos usado en la técnica de detección de la presente invención es un líquido de cultivo de blastocistos sin células.

Método de detección

La presente invención proporciona un método para la detección génica de un medio empobrecido (es decir, un líquido de cultivo separado del sistema de cultivo), identificando de ese modo si el cromosoma del embrión es anómalo, en donde el medio empobrecido es el medio después de cultivar el blastocisto.

En la presente invención, el método de detección génica para el líquido de cultivo "empobrecido" (es decir, un líquido de cultivo separado del sistema de cultivo), que es el cultivo después de cultivar el blastocisto, no está particularmente limitado, y puede detectarse mediante un método convencional, tal como secuenciación de segunda generación, chip de ácido nucleico, detección por inmunofluorescencia, detección por PCR fluorescente, secuenciación de primera generación, secuenciación de tercera generación, detección por espectrometría de masas o una combinación de los mismos.

En una realización, el método de detección comprende las siguientes etapas:

(1) Obtención de un líquido de cultivo de blastocistos: el óvulo fecundado se obtiene mediante un método de inyección de un solo espermatozoide, y se cultiva hasta la fase de blastómero en el día 3 y luego se transfiere a una microgota de cultivo de blastocistos recién preparada para el cultivo de blastocistos. En este momento, en el tercer día, es necesario cambiar la solución para eliminar la contaminación de las células granulares desprendidas y los espermatozoides que no han fecundado;

Los embriones que forman los blastocistos se toman y se transfieren a una nueva solución de cultivo de blastocistos o a un proceso de criopreservación en vidrio. El líquido de cultivo de blastocistos original restante es de aproximadamente 1 microlitro a 500 microlitros, preferiblemente de 10 microlitros a 200 microlitros, es decir, que es una muestra a recoger para el cribado genético preimplantatorio (PGS);

(2) Recogida de un líquido de cultivo de blastocistos: transferencia del líquido de cultivo de blastocistos original obtenido en la etapa (1) a una solución de lisis y, después de la centrifugación, la muestra se somete a la siguiente etapa de amplificación del genoma completo;

(3) Amplificación del genoma completo de ADN vestigiales en el líquido de cultivo de blastocistos: se añade liasa a una mezcla del líquido de cultivo de blastocistos obtenido en la etapa (2) y una solución de lisis, se mezclan y se incuban, luego se inactiva la liasa y el lisado se retira y se añade a un tubo de reacción de PCR para la reacción PCR;

(4) Análisis de los productos de ADN obtenidos de la amplificación del genoma completo para determinar si el estado cromosómico del embrión es normal: para el análisis se usa secuenciación de segunda generación, chip de ácido nucleico o detección por inmunofluorescencia.

En una realización preferida, los embriones que forman los blastocistos se retiran después de 2-3 días de intercambio de solución, y se transfieren a una nueva solución de cultivo de blastocistos o a un proceso de criopreservación en vidrio, y el líquido de cultivo de blastocistos original restante es de aproximadamente 1 microlitro a 500 microlitros, preferiblemente de 10 µl a 200 µl, que es la muestra que tiene que recogerse para el cribado genético preimplantatorio (PGS).

Las principales ventajas de la presente invención incluyen:

(1) En la presente invención, los embriones se cultivan en una cantidad muy pequeña de la solución de cultivo, y se detecta una cantidad extremadamente pequeña del líquido de cultivo, y el resultado de detección de anomalías cromosómicas tiene una exactitud inesperada y extremadamente alta.

(2) En la presente invención se usa un sistema de cultivo de un solo embrión, es decir, se cultiva solo un embrión en una gota del líquido de cultivo, y el resultado de detección de anomalías cromosómicas obtenido mediante este sistema es más exacto.

La invención se ilustra además por los siguientes ejemplos. Estos ejemplos solo pretenden ilustrar la invención, pero no limitar el alcance de la invención. Para los métodos experimentales de los siguientes ejemplos, cuyas condiciones específicas no se indican específicamente, se realizan en condiciones de rutina, por ejemplo, las descritas por Sambrook *et al.*, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, o según las instrucciones de los fabricantes. Salvo que se indique lo contrario, los porcentajes y las partes son porcentajes en peso y partes en peso.

Salvo que se especifique lo contrario, los materiales y reactivos usados en los ejemplos de la presente invención son todos productos disponibles en el mercado.

Ejemplo 1

Se seleccionaron dos muestras de embriones fecundados *in vitro* A y B, y se evaluó el estado cromosómico de los mismos por los métodos de detección de células de blastocisto y detección de líquido de cultivo de blastocistos, respectivamente, cuyas etapas específicas se muestran como sigue:

1. Obtención de un líquido de cultivo de blastocistos

1) Un óvulo fecundado obtenido por el método de inyección de un solo espermatozoide se cultivó hasta la fase de blastómero en el día 3, y el embrión se transfirió a una microgota de cultivo de blastocistos recién preparada para el cultivo de blastocistos.

2) Los embriones que forman los blastocistos se retiraron y se transfirieron a una nueva solución de cultivo de blastocistos o a un proceso de crioconservación en vidrio. El líquido de cultivo de blastocistos original restante (aproximadamente 30 μ l) era las muestras A y B que tienen que recogerse para PGS. Preferiblemente, después de 2-3 días de intercambio de líquido, se retiraron los embriones que forman blastocistos.

2. Recogida del líquido de cultivo de blastocistos

1) El tubo de recogida que contenía 10 μ l de solución de lisis (40 mM de Tris-Cl, pH 7,2, 1 mM de EDTA, 15 mM de KCl y un 3 % de Triton X-100) se puso durante 2 min a temperatura ambiente. Después de descongelar la solución de lisis, el tubo de recogida de muestras se colocó en una minicentrífugadora y se centrifugó durante 30 segundos para garantizar que toda la solución de lisis estaba en el fondo del tubo.

2) Todo el líquido de cultivo de blastocistos original de 2) de la etapa 1 se transfirió a la solución de lisis usando una pipeta de boca.

3) Se marcó el nombre de la muestra en el tubo de recogida con un rotulador, se centrifugó durante 30 s usando la microcentrifugadora, y la muestra puede someterse inmediatamente a la siguiente etapa de amplificación del genoma completo o almacenarse congelada a -20 °C o -80 °C.

3. Amplificación del genoma completo de ADN vestigiales en el líquido de cultivo de blastocistos

1) Se descongeló a temperatura ambiente una mezcla del líquido de cultivo de blastocistos y la solución de lisis.

2) Se añadió proteasa al tubo y se mezcló arriba y abajo.

3) El tubo se incubó durante 3 h a 40 °C.

4) Se inactivó la liasa poniendo el tubo a 90 °C durante 5 min.

5) Se extrajo el lisado del tubo y se añadió a un tubo de reacción de PCR.

6) Una mezcla de amplificación (15 mM de Tris-HCl, 15 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM de KCl, 1 mM de MgSO_4 , un 5 % de DMSO y un 2 % de Triton X-100), un 5 % de DMSO, 10 mM de dNTP, 50 μ M de cebadores NG (5'-GT GAG TGA TGG TTG AGG TAG TGT GGA G-3') y NT (5'-GT GAG TGA TGG TTG AGG TAG TGT GGA G-3'), 100 μ M de cebadores de amplificación (5'-GT GAG TGA TGG TTG AGG TAG TGT GGA G-3'), 1

unidad de ADN polimerasa Bst, 1 unidad de Deep VentR se añadieron al tubo de reacción de PCR.

7) El tubo de reacción de PCR se puso en el instrumento de PCR para la amplificación del genoma completo. El programa de termociclado fue como sigue:

5

95 °C - 10 segundos	
10 °C - 45 segundos	
20 °C - 45 segundos	
30 °C - 60 segundos	
40 °C - 45 segundos	
50 °C - 45 segundos	
62 °C - 90 minutos	
95 °C - 20 segundos	} 10-30 ciclos
59 °C - 20 segundos	
72 °C - 3 minutos	
72 °C - 5 minutos	
4 °C - ∞	

4. El producto de ADN amplificado se sometió a secuenciación de segunda generación de acuerdo con métodos convencionales para identificar si el estado cromosómico del embrión es normal.

10 Los resultados de los datos de secuenciación de segunda generación mostraron que, en la muestra A, pueden detectarse anomalías en múltiples cromosomas tanto por el método de detección de líquido de cultivo de blastocistos (figura A1) como por el método de detección de células de blastocisto (figura A2); sin embargo, en la muestra B, los cromosomas se consideraron normales por el método de detección de líquido de cultivo de blastocistos (figura B1) y por el método de detección de células de blastocisto (figura B2). Los resultados anteriores mostraron que se obtuvieron

15 resultados idénticos para la identificación del estado cromosómico embrionario usando los métodos de detección de líquido de cultivo de blastocistos y de células de blastocisto, confirmando de ese modo además que el método de detección no invasivo era exacto y fiable.

Ejemplo 2

20 Se seleccionaron al azar cuarenta y dos embriones cultivados *in vitro* y se compararon entre los métodos de detección del líquido de cultivo de blastocistos y de detección de células de blastocisto de acuerdo con el ejemplo 1, respectivamente. Lógicamente, las correspondencias entre los resultados de detección pueden presentarse en cuatro combinaciones;

25 en el primer tipo, tanto los resultados de detección de células como los de detección del líquido de cultivo mostraron anomalías.

En el segundo tipo, tanto la detección de células como los resultados de detección del líquido de cultivo mostraron normalidad.

30 En el tercer tipo, la detección de células mostró normalidad y los resultados de detección del líquido de cultivo mostró anomalías.

35 En el cuarto tipo, la detección de células mostró anomalías y los resultados de detección del líquido de cultivo mostraron normalidad.

En 42 resultados de comparación, la distribución del número de casos de estas cuatro correspondencias se muestra en la tabla 1:

40 Tabla 1

correspondencia de resultados	número de casos	porcentaje
el primer tipo	15	35,7 %
el segundo tipo	21	50,0 %
el tercer tipo	4	9,5 %
el cuarto tipo	2	4,8 %
en total	42	100 %

Los resultados mostraron que, cuando se usó el ensayo de células como método de referencia, la sensibilidad de la detección del líquido de cultivo se calculó como un 88,2 %, la especificidad fue de un 84,0 %, el valor predictivo positivo fue de un 78,9 y el valor predictivo negativo fue de un 91,3 %. Aunque ninguno de los indicadores es del 100 %, el

45 método no invasivo proporciona resultados de detección suficientemente cercanos al método de referencia, lo que es suficiente para confirmar el valor beneficioso de la presente invención.

Ejemplo 3

Los embriones de 8 pacientes que padecían dificultades de fertilidad debido a diferentes motivos se sometieron a detección del líquido de cultivo embrionario de acuerdo con el método del ejemplo 1 de la presente invención, y se seleccionaron los embriones con cromosomas normales y se implantaron en el útero de la madre en función de los resultados de la detección.

Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

N.º	Indicaciones	Número de transferencias de embriones	Número de embriones trasplantados	implantación	embarazo clínico	embarazo mantenido	nacimiento con vida
1	translocación equilibrada del cromosoma masculino, t(14;15)	1	1	1	Sí	Sí	Sí
2	azoospermia masculina, 46,XY, 15p+	1	1	1	Sí	Sí	Sí
3	translocación equilibrada del cromosoma masculino, t(20;22)	0	0	0	No	No	No
4	inversión cromosómica masculina, inv(p12q13)	1	1	1	Sí	Sí	Sí
5	translocación equilibrada del cromosoma femenino, t(1;18)	2	2	0	No	No	No
6	aborto recurrente (tres abortos espontáneos)	1	1	1	Sí	Sí	Sí
7	47 masculino, XYY	2	2	1	Sí	Sí	Sí
8	46 masculino, XY, ins(6;7)	0	0	0	No	No	No

En general, un 80 % de los gametos (es decir, espermatozoides u óvulos) de pacientes con translocaciones equilibradas tienen aneuploidia cromosómica, y la tasa de éxito de la concepción natural es baja. El método convencional de FIV tampoco identifica los embriones con aneuploidia cromosómica y la tasa de éxito es muy baja.

Los resultados de la presente invención mostraron que las pacientes de los n.º 3 y 8 no se sometieron a transferencia de embriones porque no se detectaron óvulos fecundados de alta calidad y los cromosomas de los embriones eran anómalos. Además, los resultados de las 6 pacientes restantes demostraron plenamente que una paciente puede concebir con éxito después de que un embrión con cromosomas normales seleccionado por el método de la presente invención se implantara en la paciente una sola vez y la tasa de éxito de la transferencia de embriones y la supervivencia fue de 5/6 (es decir, un 83,3 %), es decir, solo una paciente no tuvo éxito.

Por lo tanto, los resultados mostraron que puede obtenerse una tasa de concepción y una tasa de supervivencia embrionaria muy elevadas a través del método de la presente invención.

La descripción anterior de las realizaciones divulgadas de la presente invención posibilita que los expertos en la materia implemente o usen la presente invención. Al mismo tiempo, las anteriores son simplemente realizaciones preferidas de la presente invención y no pretenden limitar las realizaciones de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar las anomalías cromosómicas en un embrión usando líquido de cultivo de blastocistos, que comprende las etapas de:

(1) obtención de un líquido de cultivo de blastocistos: se cultiva un óvulo fecundado hasta la fase de blastómero en el día 3, y luego se transfiere a una microgota de cultivo de blastocistos recién preparada para el cultivo de blastocistos, se retira el embrión que forma el blastocisto y se transfiere a una nueva solución de cultivo de blastocistos o a un proceso de crioconservación en vidrio, y el líquido de cultivo de blastocistos original restante es una muestra a recoger para la detección;

(2) recogida de un líquido de cultivo de blastocistos: transferencia del líquido de cultivo de blastocistos original obtenido en la etapa (1) a una solución de lisis y, después de la centrifugación, la muestra se somete a la siguiente etapa de amplificación del genoma completo;

(3) amplificación del genoma completo de ADN vestigiales en el líquido de cultivo de blastocistos: se añade liasa a una mezcla del líquido de cultivo de blastocistos obtenido en la etapa (2) y una solución de lisis, se mezclan y se incuban, luego se inactiva la liasa y el lisado se retira y se añade a un tubo de reacción de PCR para la reacción amplificación del genoma; y

(4) análisis de los productos de ADN obtenidos de la amplificación del genoma completo para determinar si el estado cromosómico del embrión es normal: para el análisis se usa secuenciación de segunda generación, chip de ácido nucleico o detección por inmunofluorescencia.

2. El método de la reivindicación 1, en donde los componentes de la solución de lisis en la etapa (2) son 25-45 mM de Tris-Cl con un pH de 7,0-8,0, 0,5-3 mM de EDTA, 10-25 mM de KCl y un detergente con una concentración de un 0,05 %-5 %, y el detergente es uno o más seleccionados de un grupo que consiste en Triton X-100, Triton X-114, Tween 20, NP40 y SDS.

3. El método de la reivindicación 2, en donde los componentes de la solución de lisis son preferiblemente 40 mM de Tris-Cl, pH 7,2, 1 mM de EDTA, 15 mM de KCl y un 3 % de Triton X-100.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la liasa en la etapa (3) es una o más seleccionadas de un grupo que consiste en proteinasa K, proteasa de Qiagen, pepsina, papaína, tripsina y lisozima, y la concentración de la liasa es de 1-25 µg/ml.

5. El método de la reivindicación 4, en donde la concentración de la liasa es preferiblemente de 20 µg/ml.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la temperatura de incubación en la etapa (3) es de 30-60 °C, el tiempo de incubación es de 1 min a 12 h, la temperatura de inactivación es de 75-95 °C y el tiempo de inactivación es de 1-15 min.

7. El método de la reivindicación 6, en donde, preferiblemente, en la etapa (3), la temperatura de incubación es de 40 °C, el tiempo de incubación es de 3 h, la temperatura de inactivación es de 90 °C y el tiempo de inactivación es de 5 min.

8. El método de la reivindicación 1, en donde, cuando la reacción PCR se realiza en la etapa (3), el tubo de reacción de PCR comprende una mezcla de amplificación, un 0,5 %-20 % de un antagonista inhibidor de PCR, 5-20 mM de dNTP, 5-100 µM de cebadores NG y NT, 50-200 µM de cebadores de amplificación, 0,5-10 unidades de ácido nucleico polimerasa y el antagonista inhibidor de PCR es uno o más seleccionados de un grupo que consiste en DMSO, betaína, formamida, glicerol y albúmina, la ácido nucleico polimerasa es una o más seleccionadas de un grupo que consiste en ADN polimerasa Phi29, ADN polimerasa Bst, polimerasa Vent, polimerasa Deep Vent, fragmento Klenow de ADN polimerasa I, retrotranscriptasa de MMLV, retrotranscriptasa de AMV, retrotranscriptasa de VIH, ADN polimerasa de superfidelidad Phusion®, polimerasa Taq, ADN polimerasa de *E. coli*, ADN polimerasa LongAmp Taq y ADN polimerasa OneTaq.

9. El método de la reivindicación 8, en donde los componentes de la mezcla de amplificación son 10-25 mM de Tris-HCl, 5-25 mM de (NH₄)₂SO₄, 5-30 mM de KCl, 0,5-5 mM de MgSO₄, un 0,1 %-20 % de DMSO y un 0,05-5 % de Triton X-100.

10. El método de la reivindicación 9, en donde los componentes de la mezcla de amplificación son preferiblemente 15 mM de Tris-HCl, 15 mM de (NH₄)₂SO₄, 20 mM de KCl, 1 mM de MgSO₄, un 5 % de DMSO y un 2 % de Triton X-100.

11. El método de la reivindicación 8, en donde los cebadores NG y NT comprenden una secuencia universal y una secuencia variable del extremo 5' al extremo 3', y en donde la secuencia universal comprende 3 o 2 de las 4 bases de G, A, C y T, siempre que la secuencia universal no comprenda simultáneamente G y C; y el cebador de amplificación

comprende la secuencia universal mientras que no comprende la secuencia variable.

12. El método de la reivindicación 11, en donde la secuencia variable se selecciona de un grupo que consiste en: (N)_nGGG, (N)_nTTT, (N)_mTNTNG, (N)_xGTGG(N)_y, en donde N es cualquier nucleótido que puede formar pares de bases con un ácido nucleico natural, n es un número entero positivo seleccionado de 3-17, m es un número entero positivo seleccionado de 3-15, y cada uno de x e y es un número entero positivo seleccionado de 3-13, respectivamente.

13. El método de la reivindicación 12, en donde los cebadores NG y NT comprenden la secuencia de SEQ ID NO: 1
[GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNNNN], SEQ ID NO: 2
[GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNGGG], SEQ ID NO: 3
[GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNNNTTT], SEQ ID NO: 4
[GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNTNTNG] o SEQ ID NO: 5
[GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAGNNNGTGGNN], en donde N es cualquier nucleótido que pueda formar pares de bases con un ácido nucleico natural; y el cebador de amplificación tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6 [GTGAGTGATGGTTGAGGTAGTGTGGAG] de 5' a 3'.

14. El método de la reivindicación 1, en donde el procedimiento de termociclado de la amplificación del genoma completo en la etapa (3) se muestra como sigue:

- (1) reacción a una primera temperatura de desnaturalización entre 90-98 °C durante 5-20 segundos;
- (2) reacción a una primera temperatura de hibridación de 5-15 °C durante 5-60 s, reacción a una segunda temperatura de hibridación de 15-25 °C durante 5-60 s, reacción a una tercera temperatura de hibridación de 25-35 °C durante 30-80 s, reacción a una cuarta temperatura de hibridación de 35-45 °C durante 5-60 s y reacción a una quinta temperatura de hibridación de 45-55 °C durante 5-60 s;
- (3) reacción a una primera temperatura de extensión de 55-80 °C durante 10-150 min;
- (4) reacción a una segunda temperatura de desnaturalización de 90-98 °C durante 5-30 s;
- (5) reacción a una sexta temperatura de hibridación de 45-70 °C durante 10-30 s;
- (6) reacción a una segunda temperatura de extensión de 60-80 °C durante 1-10 minutos;
- (7) repetición de las etapas (4) a (6) durante 5 a 50 ciclos;
- (8) continuación de la reacción de extensión a una temperatura de 60-80 °C durante 1-10 min; y
- (9) refrigeración y almacenamiento del producto amplificado a 0-5 °C.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el procedimiento de termociclado de la amplificación del genoma completo en la etapa (3) se muestra como sigue:

- (1) reacción a una primera temperatura de desnaturalización entre 95 °C durante 10 segundos;
- (2) reacción a una primera temperatura de hibridación de 10 °C durante 45 s, reacción a una segunda temperatura de hibridación de 20 °C durante 45 s, reacción a una tercera temperatura de hibridación de 30 °C durante 60 s, reacción a una cuarta temperatura de hibridación de 40 °C durante 45 s y reacción a una quinta temperatura de hibridación de 50 °C durante 45 s;
- (3) reacción a una primera temperatura de extensión de 62 °C durante 90 min;
- (4) reacción a una segunda temperatura de desnaturalización de 95 °C durante 20 s;
- (5) reacción a una sexta temperatura de hibridación de 59 °C durante 20 s;
- (6) reacción a una segunda temperatura de extensión de 72 °C durante 3 min;
- (7) repetición de las etapas (4) a (6) durante 10 a 30 ciclos;
- (8) continuación de la reacción de extensión a una temperatura de 72 °C durante 5 min; y
- (9) refrigeración y almacenamiento del producto amplificado a 4 °C.

16. El método de la reivindicación 1, en donde, en la etapa (3), los cebadores utilizados en la reacción PCR

comprenden cebador NG, cebador NT y cebador de amplificación,

en donde el cebador NG y el cebador NT comprenden una secuencia universal y una secuencia variable del extremo 5' al extremo 3', en donde la secuencia universal consiste en tres o dos de las cuatro bases de G, A, C y T, siempre que la secuencia universal no comprenda G y C al mismo tiempo;

la secuencia variable del cebador NG se selecciona de un grupo que consiste en: (N) n GGG, (N) x GTGG(N) y , o una combinación de las mismas; y la secuencia variable del cebador NT se selecciona de un grupo que consiste en: (N) n TTT, (N) m TNTNG, o una combinación de las mismas; en donde N es cualquier nucleótido que puede formar pares de bases con un ácido nucleico natural, cada n es independientemente un número entero positivo seleccionado de 3-17, cada m es independientemente un número entero positivo seleccionado de 3-15 y cada uno de x e y es un número entero positivo seleccionado de 3-13, respectivamente;

mientras, el cebador de amplificación contiene la secuencia universal sin comprender la secuencia variable.

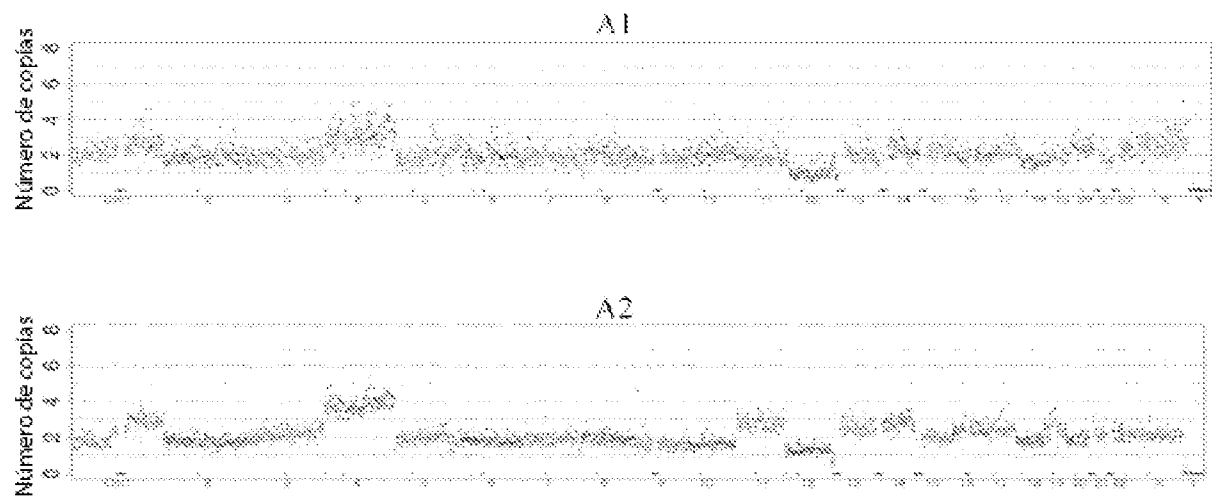


Figura 1

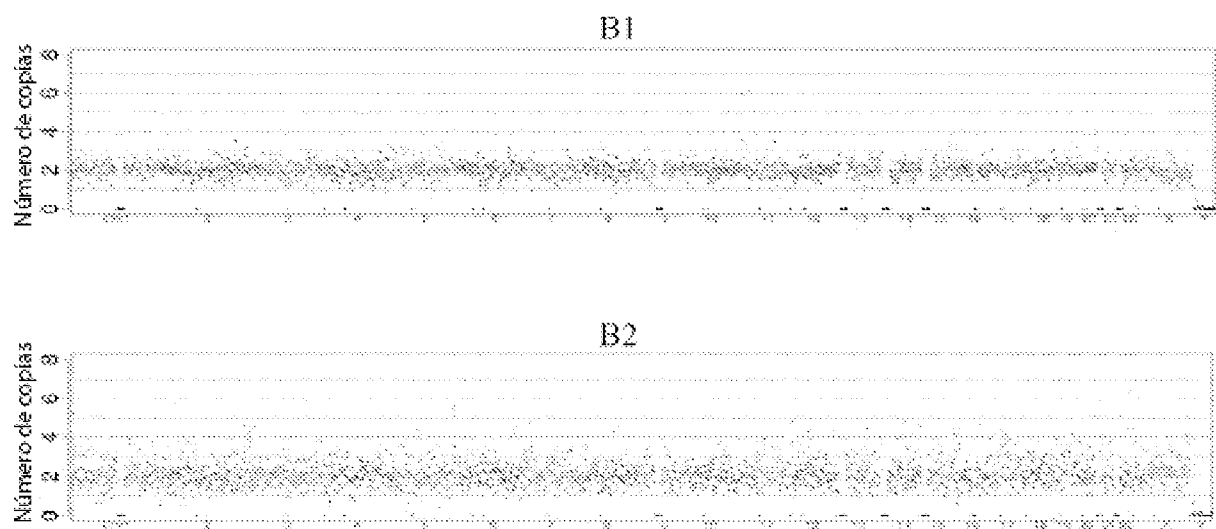


Figura 2