

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 887**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**C12M 1/36** (2006.01)

**C12N 5/073** (2010.01)

**G06K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2015 PCT/EP2015/072820**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2015 E 15778250 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 3201313**

54 Título: **Evaluación de embriones**

30 Prioridad:

**03.10.2014 GB 201417553**

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

**22.12.2020**

73 Titular/es:

**UNISENSE FERTILITECH A/S (100.0%)**

**Tueager 1**

**8200 Aarhus N, DK**

72 Inventor/es:

**PETERSEN, BJØRN MOLT;**

**FAURSCHOU, MAI y**

**BOEL, MIKKEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 799 887 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Evaluación de embriones

5 Antecedentes de la invención

Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a métodos y aparatos para evaluar el potencial de desarrollo de los embriones y en particular a clasificar/puntuar los embriones según su potencial de desarrollo.

10 La infertilidad afecta a más de 80 millones de personas en todo el mundo. Se estima que el 10 % de todas las parejas experimentan infertilidad primaria o secundaria. La fecundación *in vitro* (FIV) es un tratamiento médico voluntario que puede proporcionar a una pareja que de otra manera no podría concebir la posibilidad de establecer un embarazo y convertirse en padres. Es un proceso en el que se extraen óvulos (ovocitos) de los ovarios de una mujer y después se fertilizan con esperma en el laboratorio. Los embriones creados en este proceso se colocan después en el útero para su posible implantación. Entre la fecundación y la transferencia, los embriones se almacenan normalmente en una cámara de incubación de una incubadora durante 2-6 días, tiempo durante el que pueden supervisarse regularmente, por ejemplo, mediante captura de imágenes, para evaluar su desarrollo. Las condiciones dentro de la incubadora, tales como temperatura y composición atmosférica, están controladas, en general con el fin de emular las condiciones en el oviducto y el útero.

20 En un ciclo habitual de FIV, se fertilizarán varios óvulos de un solo paciente y se incubarán los embriones resultantes. Sin embargo, es habitual que no todos los embriones incubados se transfieran al útero de la paciente. Esto es para reducir el riesgo de múltiples nacimientos potencialmente peligrosos. Los embriones se seleccionarán normalmente para su transferencia en función de una evaluación del potencial de desarrollo de los embriones que se han incubado. Se seleccionarán preferentemente los embriones que se determine que tienen el mayor potencial para progresar hasta nacimientos vivos frente a otros embriones de su cohorte. Por consiguiente, un aspecto importante del tratamiento de FIV es evaluar el potencial de desarrollo de los embriones que comprenden una cohorte, es decir, determinar la calidad del embrión donde la calidad del embrión es una predicción que representa la probabilidad de que un embrión se implante con éxito, se desarrolle en el útero después de la transferencia y conduzca al nacimiento de un bebé sano.

30 Una herramienta potente para evaluar la calidad del embrión que se ha desarrollado en los últimos años es la captura de imágenes de embriones con cámara rápida. La captura de imágenes de embriones con cámara rápida implica obtener imágenes de embriones durante su desarrollo. Esto puede permitir establecer los tiempos de diversos acontecimientos de desarrollo, tales como divisiones celulares y/o la presencia o ausencia de otras características relacionadas con el desarrollo de un embrión, por ejemplo, con respecto a uniformidad celular (homogeneidad) en diferentes etapas, la aparición de pronúcleos (PN) y la presencia de multinucleación (MN).

40 Estos tiempos y características se pueden denominar en ocasiones parámetros morfocinéticos/morfológicos para el embrión. A este respecto, los términos "morfocinético" y "morfológico" se usarán en general en el presente documento de manera intercambiable, aunque en algunos aspectos las características morfocinéticas pueden considerarse estrictamente un subconjunto de características morfológicas, en concreto, esas características morfológicas relacionadas específicamente con los tiempos. Los estudios han mostrado cómo los tiempos y las duraciones de diversos acontecimientos de desarrollo embrionario y la presencia o ausencia de diversas otras características de desarrollo pueden correlacionarse con el potencial de desarrollo de un embrión.

45 Se pueden construir, evaluar y validar modelos para la selección de embriones (es decir, modelos para evaluar el potencial de desarrollo de un embrión) que tengan en cuenta parámetros morfocinéticos utilizando datos de implantación conocidos (DIC), por lo que los embriones con DIC positivos son embriones que se sabe que se han implantado posteriormente y los embriones con DIC negativos son embriones que se sabe que no se han implantado posteriormente.

50 Como ejemplo de un modelo sencillo para evaluar el potencial de desarrollo de un embrión, se ha descubierto que un momento relativamente temprano de división de una célula a dos células es un indicador de un embrión de buena calidad. También se ha descubierto que otros parámetros morfocinéticos, por ejemplo, el grado de sincronía en las dos divisiones cuando se divide de dos células a cuatro células, son sensibles a la calidad del embrión. Más en general, se han propuesto diversos enfoques para evaluar el potencial de desarrollo de un embrión a partir de parámetros relacionados con el desarrollo *in vitro* del embrión. En consecuencia, un objetivo de las imágenes de cámara rápida es establecer valores para diversos parámetros relacionados con los tiempos de diversos acontecimientos de desarrollo embrionario y/u otras características relacionadas con el desarrollo del embrión, por ejemplo, con respecto a uniformidad celular (homogeneidad) en diferentes etapas, la aparición de pronúcleos (PN) y la presencia de multinucleación (MN). El establecimiento de valores y características relacionadas con el desarrollo embrionario a partir de una serie de imágenes de cámara rápida se denomina en ocasiones anotación.

65 Aunque se ha descubierto que diversos tiempos y características asociadas con el desarrollo embrionario ayudan a proporcionar indicadores de calidad para el desarrollo de un embrión, los valores específicos para estos que indican un embrión de buena calidad pueden ser diferentes para diferentes embriones según las condiciones en las que se

incuba el embrión y la forma en que se distribuyen los diversos acontecimientos. Por ejemplo, una clínica podría incubar embriones con una atmósfera de determinado porcentaje de oxígeno y temperatura, mientras que otra clínica podría incubar embriones con una atmósfera de diferente porcentaje de oxígeno y temperatura. Esto puede significar que el momento óptimo para un acontecimiento morfológico dado en el desarrollo de un embrión puede ser diferente para las diferentes clínicas/condiciones de incubación.

La figura 1 es un gráfico que representa este principio (este gráfico es muy esquemático y no se basa en datos reales). Por tanto, la figura 1 muestra un ejemplo de cómo la probabilidad de implantación, Imp %, podría variar en función del momento de un acontecimiento de desarrollo arbitrario X (p. ej., la duración de un ciclo celular en particular o el tiempo de una división en particular). La curva continua representa la variación en la probabilidad de implantación en función del tiempo observado para X para embriones que se han desarrollado según un primer conjunto de condiciones, mientras que la curva discontinua representa la variación para embriones que se han desarrollado según un segundo conjunto de condiciones. Por ejemplo, la curva continua puede representar embriones incubados en una atmósfera de oxígeno relativamente bajo, mientras que la curva discontinua puede representar embriones incubados en una atmósfera de oxígeno relativamente alto. Como otro ejemplo, la curva continua podría representar embriones se han fecundado mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE), mientras que la curva discontinua podría representar embriones se han fecundado mediante fecundación *in vitro* (FIV). Como otro ejemplo más, las dos curvas podrían representar embriones que se han desarrollado en clínicas diferentes. Las dos curvas en la figura 1 se compensan sistemáticamente entre sí porque los embriones incubados en condiciones diferentes generalmente se desarrollarán a velocidades diferentes en al menos algunos aspectos.

Por consiguiente, aunque la figura 1 muestra que el tiempo asociado con el acontecimiento de desarrollo X puede usarse para identificar embriones que tienen probabilidad de implantación relativamente alta para embriones que se han desarrollado en ambos conjuntos de condiciones, los valores reales de X asociados con alta probabilidad de implantación son diferentes para los dos grupos. Por ejemplo, para embriones incubados en el primer conjunto de condiciones (línea continua), podría considerarse que un intervalo óptimo para el tiempo de X es de h1 a h2, mientras que podría considerarse que un intervalo óptimo para embriones incubados en el segundo conjunto de condiciones (línea discontinua) es de h3 a h4. Lo que esto significa en la práctica es que serán necesarios modelos diferentes para evaluar el potencial de desarrollo de los embriones para las diferentes poblaciones.

Sin embargo, sería preferible establecer un modelo único que sea aplicable a embriones que se han desarrollado en diversas condiciones diferentes, es decir, lo que podría denominarse un modelo universalmente aplicable (o al menos un modelo aplicable a embriones que se han desarrollado en una serie de condiciones diferentes). Un modelo universalmente aplicable no solo simplificaría el proceso de selección de un modelo para su uso en diferentes condiciones de desarrollo embrionario, en algunos casos puede no haber suficientes datos DIC disponibles para un conjunto dado de condiciones de desarrollo para permitir que se establezca de manera fiable un modelo para esas condiciones específicas, por ejemplo, en el caso de una clínica "nueva". Una solución sencilla para proporcionar un modelo único para la situación esquemática representada en la figura 1 sería suponer un intervalo óptimo para el tiempo de X entre h1 y h4 para todos los embriones. Sin embargo, esto daría lugar a que los embriones de cada población se clasificaran erróneamente como de alta probabilidad de implantación, lo que, por supuesto, no es una solución satisfactoria.

Por consiguiente, existe el deseo de desarrollar modelos para evaluar el potencial de desarrollo (viabilidad/calidad) de los embriones, tales como una incubación *in vitro* de embriones humanos, que son aplicables para embriones que se han desarrollado en una serie de condiciones diferentes.

El documento US2014220618 desvela métodos, composiciones y equipos para determinar el potencial de desarrollo de uno o más embriones. Se dice que los métodos, las composiciones y los equipos encuentran uso en la identificación de embriones *in vitro* que son más útiles en el tratamiento de la infertilidad en seres humanos.

El documento WO2012163363 desvela un método y un sistema para seleccionar embriones para fecundación *in vitro* basados en el momento y la duración de las divisiones celulares observadas y la morfología celular asociada.

El documento W02013004239 desvela un sistema y un método para determinar los criterios de calidad con el fin de seleccionar los embriones más viables después de fecundación *in vitro*. El enfoque puede aplicarse además para adaptar por iteraciones criterios de calidad de embriones basados en nuevos conocimientos, selección histórica y datos de fecundación y cooperación entre clínicas de fertilidad.

El documento W02014033210 desvela un método implementado por ordenador para detectar automáticamente variaciones y/o anomalías en las condiciones de desarrollo de embriones que se incuban *in vitro*.

Meseguer *et al* en Human Reproduction, publicado para la Sociedad Europea de Reproducción y Embriología Humana por IRL Press, ISSN 0268-1161, 01-10-2011 desvelan enfoques para usar la morfocinética como predictor de la implantación de embriones.

Rubio *et al* en Fertility And Sterility, Elsevier Science Inc, Nueva York, NY, Estados Unidos, ISSN 0015-0282, 01-12-

2012 divulgan un estudio de cámara rápida relacionado con el éxito limitado de implantación de embriones humanos de división directa.

5 Ciray *et al* en Human Reproduction, Oxford Journals, Reino Unido, ISSN 0268-1161, 01-12-2014 proponen pautas sobre la nomenclatura y anotación de la supervisión dinámica de embriones humanos por parte de un grupo de usuarios de cámara rápida.

10 Kaser *et al* en Human Reproduction Update nov-dic 2011, ISSN 1460-2369, 01-09-2014 desvela una revisión de los resultados clínicos después de la selección de embriones previos a la implantación humanos con supervisión de cámara rápida.

Sumario de la invención

15 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para clasificar los embriones de FIV para predecir su potencial de desarrollo después de la transferencia; comprendiendo el método: obtener valores para una pluralidad de características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones durante un periodo de observación; determinar para los embriones respectivos una medida de si el embrión ha experimentado o no un acontecimiento de división directa y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa; y para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa, determinar si una medida de la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión supera o no una duración umbral predefinida y clasificar los embriones para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida con una clasificación que indica un menor potencial de desarrollo que para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida; y para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida, determinar si una medida de una duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está o no fuera de un intervalo predefinido y clasificar los embriones para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones para los que la duración relativa no está fuera del intervalo predefinido.

35 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un aparato para clasificar los embriones de FIV para predecir su potencial de desarrollo después de la transferencia, comprendiendo el aparato: un elemento de aporte de datos configurado para obtener valores para una pluralidad de características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones durante un periodo de observación; y un elemento procesador configurado para: determinar para los embriones respectivos una medida de si el embrión ha experimentado o no un acontecimiento de división directa y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa; y para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa, determinar si una medida de la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión supera o no una duración umbral predefinida y clasificar los embriones para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida con una clasificación que indica un menor potencial de desarrollo que para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida; y para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida, determinar si una medida de una duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está o no fuera de un intervalo predefinido y clasificar los embriones para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones para los que la duración relativa no está fuera del intervalo predefinido.

55 Otros aspectos de la invención incluyen un producto de programa informático no transitorio que contiene instrucciones legibles por máquina para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención y un aparato cargado y operativo para ejecutar instrucciones legibles por máquina para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención.

Se definen aspectos y características adicionales de la invención en las reivindicaciones.

60 Se apreciará que las características y los aspectos de la invención descritos en el presente documento en relación con el primero y otros aspectos de la invención son igualmente aplicables a, y pueden combinarse con, realizaciones de la invención según otros aspectos de la invención según sea adecuado y no solo en las combinaciones específicas descritas anteriormente.

65 Se apreciará que las características y los aspectos de la invención descritos anteriormente en relación con el primero y otros aspectos de la invención son igualmente aplicables a, y pueden combinarse con, realizaciones de la invención según otros aspectos de la invención según sea adecuado y no solo en las combinaciones específicas descritas

anteriormente.

Breve descripción de los dibujos

5 La invención se describe ahora a modo de ejemplo solo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es un diagrama muy esquemático que representa cómo la probabilidad de implantación podría variar en función del tiempo asociado con un acontecimiento de desarrollo arbitrario para dos poblaciones de embriones incubados en dos conjuntos diferentes de condiciones;

10 La figura 2 representa esquemáticamente alguna nomenclatura como se usa en el presente documento para un patrón de división de embriones que muestra los tiempos de división ( $t_2$  a  $t_5$ ), la duración de los ciclos celulares ( $cc_1$  a  $cc_3$ ) y las sincronías ( $s_2$  y  $s_3$ ) en relación con las imágenes obtenidas;

15 La figura 3 representa esquemáticamente un embrión en diferentes acontecimientos de desarrollo embrionario desde la inseminación inicial (en el tiempo  $t = 0$ ) y en los tiempos de división  $t_2$ - $t_8$  con algunos aspectos asociados de la terminología de cronología como se usa en el presente documento;

La figura 4 representa esquemáticamente un aparato para determinar un potencial de desarrollo para un embrión de acuerdo con una realización de la invención;

La figura 5 es un diagrama de flujo que representa esquemáticamente un método para clasificar embriones en función de su potencial de desarrollo de acuerdo con algunas realizaciones de la invención;

20 La figura 6 es un diagrama de árbol de clasificación que representa esquemáticamente la aplicación del modelo de la figura 5 a 3.275 embriones que tienen datos de implantación conocidos (embriones DIC);

La figura 7 es un gráfico de barras que representa la distribución de varios de los 3.275 embriones DIC asociados con el árbol de clasificación de la figura 6 entre diferentes puntuaciones establecidas de acuerdo con el método de la reivindicación 5;

25 Las figuras 8, 10 y 12 son árboles de clasificación que representan esquemáticamente la aplicación de otros modelos a los 3.275 embriones DIC de acuerdo con otras realizaciones de la invención;

Las figuras 9, 11 y 13 son gráficos de barras que representan la distribución de varios de los 3.275 embriones DIC entre las diferentes puntuaciones establecidas de acuerdo con los modelos representados por los árboles de clasificación en las figuras 8, 10 y 12 respectivamente;

30 Las figuras 14 a 17 son árboles de clasificación que representan esquemáticamente la aplicación del mismo modo a diferentes subpoblaciones de los 3.275 embriones DIC de acuerdo con realizaciones de la invención; y

La figura 18 representa para un análisis de 10.316 embriones para los que se sabe si los embriones se desarrollaron o no hasta la etapa de blastocisto 120 horas después de la fecundación, la proporción de embriones que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto 120 horas después de la fecundación para cada una de las diferentes puntuaciones establecidas para cada uno de los embriones de acuerdo con el modelo representado en la figura 6.

Descripción detallada

40 Los aspectos y características de determinados ejemplos y realizaciones de la presente invención se analiza/describen en el presente documento. Algunos aspectos y características de determinados ejemplos y realizaciones pueden implementarse de manera convencional y estos no se analizan/describen en detalle para mayor brevedad. Por tanto, se apreciará que los aspectos y las características de los aparatos y métodos analizados en el presente documento que no se describen en detalle pueden implementarse de acuerdo con cualquier técnica convencional para implementar dichos aspectos y características.

50 A menos que el contexto exija otra cosa, las expresiones usadas en el presente documento deben interpretarse de acuerdo con sus significados, como los entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente divulgación. Algunos términos pueden usarse en el presente documento de acuerdo con las siguientes definiciones (a menos que el contexto exija otro significado).

55 El tiempo de división (tiempo de división celular) se define como el primer punto temporal observado en relación con un punto de inicio definido (tiempo cero) cuando los blastómeros recién formados están completamente separados por membranas celulares confluyentes, el tiempo de división es, por lo tanto, el tiempo de finalización de una división de blastómero. Los tiempos de división pueden definirse, por tanto, de la siguiente manera:

- $t_2$ : tiempo de división hasta embrión de 2 blastómeros
- $t_3$ : tiempo de división hasta embrión de 3 blastómeros
- $t_4$ : tiempo de división hasta embrión de 4 blastómeros
- 60 •  $t_5$ : tiempo de división hasta embrión de 5 blastómeros
- $t_6$ : tiempo de división hasta embrión de 6 blastómeros
- $t_7$ : tiempo de división hasta embrión de 7 blastómeros
- $t_8$ : tiempo de división hasta embrión de 8 blastómeros
- 65 •  $t_n$ : tiempo de división hasta embrión de  $n$  blastómeros

Se apreciará que el tiempo de división puede definirse igualmente con respecto a otros puntos temporales asociados

con la división celular. Por ejemplo, en la definición anterior, el tiempo de división está relacionado con un tiempo asociado con la finalización de la división celular (es decir, cuando los blastómeros recién formados están completamente separados), pero en otra implementación, el tiempo de división puede definirse igualmente como un tiempo asociado con el comienzo de la división celular o un tiempo asociado con un punto intermedio para la división celular.

En el presente contexto, los tiempos de división se expresan habitualmente como horas después de un tiempo cero definido. El tiempo cero puede ser el momento de la inseminación (p. ej., el momento de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (IICE), también denominada microinyección) o también podría ser posterior al momento de la mezcla de espermatozoides y ovocitos (en la FIV tradicional) o posterior al momento en que se observa por primera vez la fusión exitosa de gametos para formar un nuevo organismo (el cigoto), es decir, exclusión del segundo cuerpo polar. De manera similar, podría ser posterior al momento de aparición o desvanecimiento/desaparición pronuclear u otro parámetro de desarrollo significativo. Con respecto al desvanecimiento/desaparición pronuclear, los términos "desvanecido" y "desaparecido" en relación con los pronúcleos (PN) pueden usarse indistintamente en el presente documento. El término tPNf se puede usar para indicar un tiempo determinado para el desvanecimiento de los pronúcleos (es decir, un punto temporal determinado como el momento en que los pronúcleos (PN) ya no se distinguen).

La duración del primer ciclo celular cc1 es el periodo entre la fecundación y el tiempo de división t2 que proporciona el primer par de células descendientes (es decir, las primeras células de segunda generación). La duración del segundo ciclo celular cc2 es el periodo entre el tiempo de división t2 que proporciona el primer par de células hijas y el tiempo de división t3 que proporciona el primer par de células terceras descendientes (es decir, las primeras células de tercera generación). La duración del tercer ciclo celular cc3 es el periodo entre el tiempo de división t3 que proporciona el primer par de células terceras descendientes y el tiempo de división t5 que proporciona el primer par de células cuartas descendientes (es decir, las primeras células de cuarta generación). La duración del cuarto ciclo celular cc4 es el periodo entre el tiempo de división t5 que proporciona el primer par de células cuartas descendientes y el tiempo de división t9 que proporciona el primer par de células quintas descendientes (es decir, las primeras células de quinta generación).

Estas duraciones del ciclo celular se basan por tanto en el blastómero que se divide más rápido para cada nueva generación. Sin embargo, existen duraciones adicionales del ciclo celular asociadas con la división de blastómeros más lentos.

Por ejemplo, además de la duración del ciclo celular cc2, existe una duración del ciclo celular cc2b correspondiente al periodo entre el tiempo de división t2 que proporciona el primer par de células descendientes y el tiempo de división t4 que proporciona el segundo par de células terceras descendientes. A este respecto, la duración del ciclo celular cc2 también puede denominarse duración del ciclo celular cc2a por simplicidad en la terminología.

Asimismo, además de la duración del ciclo celular cc3, existe una duración del ciclo celular cc3b correspondiente al periodo entre el tiempo de división t3 que proporciona el primer par de células descendientes y el tiempo de división t6 que proporciona el segundo par de células cuartas descendientes. También hay una duración del ciclo celular cc3c correspondiente al periodo entre el tiempo de división t4 que proporciona el segundo par de células terceras descendientes y el tiempo de división t7 que proporciona el tercer par de células cuartas descendientes. También hay una duración del ciclo celular cc3d correspondiente al periodo entre el tiempo de división t4 que proporciona el segundo par de células terceras descendientes y el tiempo de división t8 que proporciona el cuarto par de células cuartas descendientes. A este respecto, la duración del ciclo celular cc3 también puede denominarse duración del ciclo celular cc3a por coherencia en la terminología.

Por tanto, la duración de los ciclos celulares se define de la siguiente manera:

- cc1 = t2: Primer ciclo celular.
- cc2 (también denominado cc2a) = t3-t2: Segundo ciclo celular, duración del periodo como embrión de 2 blastómeros.
- cc2b = t4-t2: Segundo ciclo celular para ambos blastómeros, duración del periodo como embrión de 2 y 3 blastómeros.
- cc3 (también denominado cc3a) = t5-t3: tercer ciclo celular, duración del periodo como embrión de 3 y 4 blastómeros.
- cc3b, cc3c, cc3d = t6-t3; t7-t4; y t8-t4 respectivamente: Tercer ciclo celular para blastómeros más lentos, duración del periodo como un embrión de 3, 4 y 5 blastómeros; como un embrión de 4, 5 y 6 blastómeros y como un embrión de 4, 5, 6 y 7 blastómeros respectivamente.
- cc2\_3 = t5-t2: Segundo y tercer ciclo celular, duración del periodo como embrión de 2, 3 y 4 blastómeros (es decir, cc2 + cc3).
- cc4 = t9-t5: Cuarto ciclo celular, duración del periodo como embrión de 5, 6, 7 y 8 blastómeros.

Las sincronidades se definen de la siguiente manera:

- s2 = t4-t3: Sincronía en división de embrión de 2 blastómeros a embrión de 4 blastómeros.
- s3 = t8-t5: Sincronía en división de embrión de 4 blastómeros a embrión de 8 blastómeros.
- s3a = t6-t5; s3b = t7-t6; s3c = t8-t7: Duración de las divisiones celulares individuales implicadas en el desarrollo de embrión de 4 blastómeros a embrión de 8 blastómeros.

5 Las figuras 2 y 3 representan esquemáticamente algunos aspectos de la terminología usada en el presente documento con respecto a los tiempos y duraciones de algunos acontecimientos de desarrollo embrionario, tal como se ha analizado anteriormente. La figura 2 muestra varias imágenes de un embrión en diversas etapas de desarrollo e indica diversos tiempos asociados con diversos acontecimientos de desarrollo, tales como t2, t3, t4, t5, cc1, cc2 (que también se puede denominar en el presente documento cc2a), cc3 (que también se puede denominar en el presente documento cc3a), s2 y s3. La figura 3 representa esquemáticamente de izquierda a derecha el desarrollo del embrión a través de las etapas de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete y ocho blastómeros. Los tiempos t2 a t8 en los que se completa la etapa de división celular respectiva se marcan esquemáticamente a lo largo del eje inferior. La figura 3 también indica esquemáticamente las duraciones de los ciclos celulares cc1, cc2a, cc2b, cc3a, cc3b, cc3c y cc3d y sincronizaciones S2 y S3.

El periodo de división se define como el periodo de tiempo desde la primera observación de hendiduras en la membrana celular (lo que indica el inicio de la división citoplasmática) hasta que la división de las células citoplasmáticas se completa de modo que los blastómeros estén completamente separados por membranas celulares confluyentes. También se denomina duración de la citocinesis.

La fecundación y la división pueden considerarse en algunos aspectos los principales acontecimientos morfológicos/morfocinéticos de un embrión, al menos hasta la etapa de 8 blastómeros o hasta el inicio de la compactación. El tiempo de división, ciclo celular, sincronía de división y el periodo de división son ejemplos de parámetros morfológicos embrionarios que se pueden definir a partir de estos acontecimientos morfológicos primarios y cada uno de estos parámetros morfológicos embrionarios se puede definir como la duración de un periodo de tiempo entre dos acontecimientos morfológicos, p. ej., medido en horas.

La división directa es cuando una célula se divide más rápidamente que el tiempo que se supone que es necesario para que su ADN se replique apropiadamente antes de la división. Por ejemplo, una célula puede dividirse en dos células descendientes y, después, si una de las células descendientes se divide en dos células terceras descendientes antes del tiempo que normalmente tarda en replicarse su ADN, se puede suponer que la célula inicial ha experimentado un acontecimiento de división directa. Es decir, la celda inicial se ha dividido, dentro de un periodo de tiempo predefinido, de una célula a más de dos células, p. ej., tres células. Se puede producir división directa en diferentes ciclos celulares. Por ejemplo, con referencia a la figura 3, un periodo corto para cualquiera de cc2a, cc2b, cc3a, cc3b, cc3c, cc3d puede interpretarse como indicativo de un acontecimiento de división directa.

Como ya se ha mencionado, se sabe que establece una medida del potencial de desarrollo de un embrión a partir de diversos parámetros asociados con su desarrollo, tales como parámetros correspondientes a (o basados en) los tiempos analizados anteriormente y, para hacer esto, se pueden determinar los valores para los parámetros de interés relevantes a partir de imágenes de cámara rápida del embrión a medida que se desarrolla a través de las etapas relevantes. En algunos enfoques para determinar el potencial de desarrollo de un embrión, pueden ser de interés otras características del desarrollo. Por ejemplo, una evaluación de la calidad de un embrión puede tener en cuenta los valores establecidos para las siguientes características morfológicas:

- NOT2PN: Indicación de si se identifican adecuadamente o no dos pronúcleos para el embrión. Esta característica puede determinarse visualmente a partir de una imagen del embrión en el sitio de desarrollo adecuado con una etapa mental y puede, por ejemplo, tomar un valor binario sencillo para indicar si se identifican adecuadamente o no pronúcleos en el embrión, o podría tomar un valor que indique el número de dianas identificadas para el embrión, por ejemplo, un valor correspondiente a "0", "1", "2", "3" o "4 o más" según el número de pronúcleos identificados para el embrión (un valor de "2" es normal).
- MN2: Indicación de (cualquier) multinucleación observada en la etapa de dos blastómeros (células). Esta característica puede determinarse visualmente a partir de una imagen del embrión en la etapa de desarrollo adecuada y puede tomar valores correspondientes a "0", "1" o "2" correspondientes al número de células que se ha determinado que muestran multinucleación en la etapa de dos blastómeros.
- MN4: Indicación de (cualquier) multinucleación observada en la etapa de cuatro blastómeros. Esta característica puede determinarse visualmente a partir de una imagen del embrión en la etapa de desarrollo adecuada y puede tomar valores correspondientes a "0", "1", "2", "3" o "4" correspondientes al número de células que se ha identificado que muestran multinucleación en la etapa de cuatro blastómeros.
- UNEVEN2: Indicación de (ir)regularidad de los blastómeros en la etapa de dos blastómeros. Esta característica puede determinarse visualmente a partir de una imagen del embrión en la etapa de desarrollo adecuada y puede tomar valores correspondientes a "regulares" (los blastómeros en el embrión de dos blastómeros se clasifican como regulares) o "irregulares" (los blastómeros en el embrión de dos blastómeros se clasifican como irregulares).
- UNEVEN4: Indicación de (ir)regularidad de los blastómeros en la etapa de cuatro blastómeros. Esta característica puede determinarse visualmente a partir de una imagen del embrión en la etapa de desarrollo adecuada y puede tomar valores correspondientes a "regulares" (los blastómeros en el embrión de cuatro blastómeros se clasifican

como regulares) o "irregulares" (los blastómeros en el embrión de cuatro blastómeros se clasifican como irregulares).

5 Se apreciará que el establecimiento de valores para algunos de estos parámetros puede incluir un componente de subjetividad, por ejemplo, con respecto a si las células que comprenden un embrión son regulares o no. También se apreciará la terminología adoptada para los valores específicos (p. ej., "regular", "irregular") no es significativa y los valores también podrían caracterizarse igualmente de otras maneras, p. ej., como "verdadero" o "falso" por valores numéricos asociados con los diferentes estados potenciales, p. ej., "0" para regular, "1" para irregular).

10 Se apreciará además que los tiempos y características identificados anteriormente asociados con el desarrollo embrionario se establecen para proporcionar una comprensión general de los tipos de parámetros y características que pueden ser de interés cuando se intenta proporcionar modelos para evaluar el potencial de desarrollo de los embriones y normalmente solo un subconjunto de estos parámetros y/o características serán de interés para un modelo dado.

15 La calidad del embrión es una medida de la capacidad de un embrión para implantarse y desarrollarse con éxito en el útero después de la transferencia. Los embriones de alta calidad tienen una mayor probabilidad de implantarse con éxito (alta probabilidad de implantación) y desarrollarse en el útero hasta un bebé sano después de la transferencia que los embriones de baja calidad. Sin embargo, incluso un embrión de alta calidad no es una garantía de implantación, ya que la transferencia real y la receptividad de la mujer influyen en el resultado final.

20 La viabilidad y la calidad se pueden usar indistintamente. La medición de la calidad (o viabilidad) del embrión es un parámetro destinado a reflejar la calidad (o viabilidad) de un embrión de tal manera que los embriones con determinados valores del parámetro de calidad (p. ej., valores altos o bajos dependiendo de cómo se defina el parámetro) tienen una alta probabilidad de ser de alta calidad (o viabilidad) y baja probabilidad de ser de baja calidad (o viabilidad). Por otro lado, los embriones con otros valores determinados para el parámetro de calidad (o viabilidad) tienen una baja probabilidad de tener una alta calidad (o viabilidad) y una alta probabilidad de ser de baja calidad (o viabilidad)

30 La expresión "potencial de desarrollo" puede usarse para reflejar una probabilidad estimada de que un embrión se desarrolle hasta la etapa de blastocisto, se implante, dé lugar a embarazo, se desarrolle a una etapa asociada con un latido cardíaco y/o dé lugar a un bebé nacido vivo. En algunas realizaciones, el potencial de desarrollo puede ser una determinación de la calidad del embrión. El potencial de desarrollo puede equipararse con la calidad del embrión. Un embrión que tiene un potencial de desarrollo positivo (es decir, una buena calidad de embrión (alta)) es uno que es más probable que se desarrolle hasta etapa de blastocisto y/o dé lugar a una implantación exitosa y/o se desarrolle en el embrión en el útero después de la transferencia y/o dé lugar a un embarazo y/o dé lugar a un bebé nacido vivo en comparación con un embrión que tiene un potencial de desarrollo negativo (o mala (baja) calidad del embrión).

40 Por tanto, se determina que los embriones que se ha determinado que son de buena (alta) calidad tienen una mayor probabilidad de implantarse con éxito y/o desarrollarse en el útero después de la transferencia en comparación con los embriones de baja calidad. Sin embargo, se apreciará que un embrión de alta calidad no es una garantía de implantación, ya que la transferencia real y la receptividad de la mujer influyen en gran medida en el resultado final.

45 En algunos casos, el término "embrión" puede usarse para describir un ovocito fecundado después de la implantación en el útero hasta 8 semanas después de la fecundación, etapa en la que se convierte en un feto. Según esta definición, el ovocito fecundado se denomina con frecuencia preembrión o cigoto hasta que se produce la implantación. Sin embargo, el término "embrión" como se usa en el presente documento tendrá una definición más amplia, que incluye la fase preembrionaria. El término "embrión" como se usa en el presente documento abarca todas las etapas del desarrollo desde la fecundación del ovocito hasta la mórula, las etapas de blastocisto, eclosión e implantación. Por consiguiente, el término embrión puede indicar en el presente documento cada una de las etapas del ovocito fecundado, cigoto, 2 células, 4 células, 8 células, 16 células, compactación, mórula, blastocisto, blastocisto expandido y blastocisto eclosionado, así como todas las etapas intermedias (p. ej., 3 células o 5 células).

50 Un embrión es aproximadamente esférico y está compuesto por una o más células (blastómeros) rodeadas de una cubierta de tipo gelatina, la matriz acelular conocida como la zona pelúcida. La zona pelúcida realiza diversas funciones hasta que el embrión eclosiona y es un buen punto de referencia para la evaluación del embrión. La zona pelúcida es esférica y translúcida y debería distinguirse claramente de los residuos celulares.

55 Un embrión se forma cuando un ovocito se fecunda por fusión o inyección de una célula espermática (espermatozoide). El término embrión se usa tradicionalmente también después de la eclosión (es decir, la ruptura de la zona pelúcida) y la consiguiente implantación. Para seres humanos, el ovocito fecundado se denomina tradicionalmente cigoto o embrión durante las primeras 8 semanas. Después de eso (es decir, después de ocho semanas y cuando se han formado todos los órganos principales) se denomina feto. Sin embargo, la distinción entre cigoto, embrión y feto no está bien definida en general. Los términos embrión y cigoto pueden usarse en el presente documento indistintamente.

60 Un embrión que se evalúa de acuerdo con realizaciones de la invención tal como se describe en el presente documento

puede estar previamente congelado, p. ej., embriones crioconservados inmediatamente después de la fecundación (p. ej., en la etapa de 1 célula) y después descongelados. Como alternativa, pueden estar recién preparados, p. ej., embriones recién preparados a partir de ovocitos mediante técnicas de FIV o IICE, por ejemplo. Se apreciará que, en la medida en que el desarrollo de un embrión se ha detenido por congelación, los tiempos de los eventos de desarrollo después de la fecundación pueden definirse ignorando el tiempo entre la congelación y la descongelación. Como alternativa, un tiempo de inicio puede definirse como uno de los primeros acontecimientos de desarrollo, tales como la exclusión del segundo cuerpo polar o la aparición/desaparición de pronúcleos, después de la descongelación.

Se puede considerar que la fecundación es el momento en que el ovocito reconoce y acepta el espermatozoide. El espermatozoide desencadena la activación del óvulo después de que el ciclo meiótico del ovocito se haya suspendido en la metafase de la segunda división meiótica. Esto da lugar a la producción y extrusión del segundo cuerpo polar. Algunas horas después de la fusión del espermatozoide y el óvulo, comienza la síntesis de ADN. Aparecen pronúcleos (PN) masculinos y femeninos. Los PN se mueven al centro del óvulo y las membranas se descomponen y los PN desaparecen (se desvanecen). Esta combinación de los dos genomas se denomina singamia. A continuación, comienzan las divisiones celulares.

El momento en que desaparecen los pronúcleos puede denominarse tPNf. Los términos "desvanecer" o "desvanecido" y "desaparecer" o "desaparecido" en relación con los pronúcleos (PN) pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Durante el desarrollo embrionario, los números de blastómeros aumentan en progresión geométrica (1-2-4-8-16-etc.). La división celular sincrónica se mantiene en general en la etapa de 8 células o posterior, hasta la compactación en embriones humanos. Tras ello, la división celular se vuelve asíncrona y finalmente las células individuales poseen su propio ciclo celular. Los embriones humanos producidos durante el tratamiento de infertilidad pueden transferirse al receptor antes de la etapa de 8 blastómeros. En algunos casos, los embriones humanos también se cultivan hasta la etapa de blastocisto antes de la transferencia. Esto se realiza preferentemente cuando hay muchos embriones de buena calidad disponibles o es necesaria incubación prolongada para esperar el resultado de un diagnóstico genético previo a la implantación (DGP). Sin embargo, existe una tendencia a la incubación prolongada a medida que mejora la tecnología de incubación.

Algunas implementaciones ilustrativas de realizaciones de la invención pueden usarse para establecer parámetros relacionados con blastocistos.

Un criterio de calidad/medida de blastocistos es un ejemplo de un criterio de calidad/medida de embrión. Los criterios de calidad de los blastocistos pueden, por ejemplo, estar relacionados con el desarrollo del embrión a partir de la compactación, es decir, compactación inicial, al blastocisto eclosionado. La compactación es un proceso en donde una intensificación de los contactos entre los blastómeros con unión estrecha y desmosomas da lugar a reducción del espacio intercelular y un difuminado de los contornos celulares. Antes de la compactación, los blastómeros del embrión pueden seguirse individualmente y antes de la compactación, el desarrollo embrionario sigue una ruta de divisiones celulares definidas y en su mayoría sincrónicas que se pueden observar y anotar fácilmente. Después de la compactación, el desarrollo embrionario se caracteriza por un desarrollo más o menos continuo desde la mórula hasta el blastocisto, donde los blastómeros individuales se vuelven difíciles de rastrear, pero varias etapas pueden caracterizarse no obstante estableciendo valores para parámetros asociados con estas etapas mediante inspección visual de las imágenes obtenidas para las etapas de desarrollo relevantes.

El inicio de compactación (IC) describe la primera vez que se observa una compactación entre dos o más blastómeros. Por tanto, el IC marca el inicio del proceso de compactación.

La mórula (M) se asocia con la primera vez que no son visibles membranas plasmáticas entre los blastómeros. Cuando se completa el proceso de compactación, no son visibles membranas plasmáticas entre ninguno de los blastómeros que forman la compactación y el embrión se puede definir como una mórula. Con mayor frecuencia, la mórula se ve después del tercer periodo de sincronía S3 (es decir, después de t8) cerca, o justo al principio, del cuarto periodo de sincronía S4 (es decir, en t9), pero puede ser anterior. Con poca frecuencia, los embriones se dividen en 16 células o más antes de que se inicie la compactación en embriones humanos.

La diferenciación inicial de trofotodermo (IDT) se define como la primera vez que se reconocen células definidas de trofotodermo. El inicio de la blastulación (IB) se define como la primera vez que se puede observar una cavidad llena de líquido, el blastocele. También se denomina "inicio de la cavitación". Describe el inicio del periodo de transición entre la etapa de mórula y la etapa de blastocisto del embrión. Los embriones permanecen con frecuencia en esta etapa de transición durante un periodo de tiempo antes de entrar en la etapa de blastocisto real. El inicio de la cavitación aparece habitualmente inmediatamente después de la diferenciación de las células del trofotodermo. La capa externa de la mórula con contacto con el ambiente exterior comienza a bombear activamente sal y agua al espacio intercelular, como resultado de lo cual comienza a formarse una cavidad (el blastocele).

La diferenciación inicial de la masa celular interna (DIMCI) definida como la primera vez que se puede reconocer la masa celular interna. DIMCI describe el inicio del desarrollo de la masa celular interna. Un grupo de células colocado

en posición excéntrica conectado mediante uniones comunicantes donde los límites entre las células no parecen estar bien definidos.

5 El blastocisto (B) puede definirse como la última imagen antes de que el blastocisto comience a expandirse. Cuando esto suceda, la zona pelúcida comienza habitualmente a cambiar y existe una clara distinción entre trofotodermo y células de masa celular interna.

10 El inicio de la expansión del blastocisto (EB) puede definirse como la primera vez que el embrión ha llenado el espacio perivitelino y comienza a mover/expandir la zona pelúcida. La EB puede describir el inicio de la expansión del embrión. A medida que el blastocisto se expande, la zona pelúcida se vuelve visiblemente más delgada.

La eclosión del blastocisto (EcB) puede definirse como la primera vez que una célula de trofotodermo ha escapado/penetrado en la zona pelúcida o una fracción determinada ha eclosionado.

15 El blastocisto completamente eclosionado (CE) se define como cuando la eclosión se completa con desprendimiento de la zona pelúcida.

Se pueden definir diversos tiempos asociados con el desarrollo de blastocistos de la siguiente manera:

20 tM = Tiempo desde la inseminación hasta la formación de la mórula (horas)  
 tSB = Tiempo desde la inseminación hasta el inicio de la blastulación (horas)  
 tB = Tiempo desde la inseminación hasta la formación de blastocisto (horas)  
 tEB = Tiempo desde la inseminación hasta la formación de blastocisto expandido (horas)  
 tHB = Tiempo desde la inseminación hasta la eclosión del blastocisto (horas)

25 La figura 4 representa esquemáticamente un aparato 2 para determinar un potencial de desarrollo para un embrión 8 de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención. El aparato 2 comprende un ordenador 4 de uso general acoplado a un sistema 6 de captura de imágenes de embriones. El sistema 6 de captura de imágenes de embriones puede ser en general convencional y está configurado para obtener imágenes del embrión 8 en diversas etapas del desarrollo de acuerdo con técnicas establecidas. Se apreciará que, en general, el sistema de captura de imágenes de embriones 6 se configurará normalmente para obtener imágenes de una pluralidad de embriones, en lugar de un solo embrión, durante un periodo de supervisión. Por ejemplo, un estudio habitual puede implicar el análisis de varios embriones, por ejemplo, 72 embriones. El sistema de captura de imágenes de embriones se puede configurar para grabar imágenes de cada embrión (potencialmente con imágenes que se toman en múltiples planos focales) de una en una antes de pasar a la imagen del siguiente embrión. Una vez que se han capturado imágenes de todos los embriones, lo que podría tardar, por ejemplo, 5 minutos, el ciclo de obtención de imágenes de los embriones individuales puede repetirse para proporcionar imágenes respectivas para los embriones respectivos para el siguiente punto temporal.

40 El ordenador de uso general 4 está adaptado (programado) para ejecutar un método para determinar/evaluar un potencial de desarrollo de un embrión a partir de un análisis de imágenes obtenidas del sistema de captura de imágenes de embriones 6 como se describe adicionalmente más adelante.

45 Por tanto, el sistema informático 4 está configurado para realizar procesamiento de datos de imágenes de embriones de acuerdo con una realización de la invención. El ordenador 4 incluye una unidad central de procesamiento (CPU) 24, una memoria de solo lectura (ROM) 26, una memoria de acceso aleatorio (RAM) 28, una unidad de disco duro 30, una interfaz de hardware 46, un controlador de pantalla 32 y una pantalla 34 y un circuito de entrada/salida (IO) de usuario 36 con un teclado 38 y un ratón 40. Estos dispositivos están conectados a través de un bus común 42. El ordenador 4 también incluye una tarjeta gráfica 44 conectada a través del bus común 42. La tarjeta gráfica incluye un procesador gráfico (GPU) y memoria de acceso aleatorio estrechamente acoplada a la GPU (memoria GPU). El sistema 6 de captura de imágenes de embriones está acoplado de manera comunicativa al ordenador 4 a través de la interfaz 46 de hardware de acuerdo con técnicas convencionales.

55 La CPU 24 puede ejecutar instrucciones de programa almacenadas dentro de la ROM 26, la RAM 28 o la unidad de disco duro 30 para llevar a cabo procesamiento de datos de imágenes de embriones que pueden almacenarse dentro de la RAM 28 o la unidad de disco duro 30. La RAM 28 y la unidad de disco duro 30 se denominan colectivamente memoria del sistema. En algunas implementaciones, el procesamiento de acuerdo con realizaciones de la invención puede basarse en imágenes de embriones obtenidas por el ordenador 4 directamente del sistema 6 de captura de imágenes. En otras implementaciones, el procesamiento de acuerdo con realizaciones de la invención puede basarse en imágenes de embriones obtenidas previamente y almacenadas en una memoria del ordenador 4, p. ej., en la RAM 28 del HDD 30 (es decir, el sistema 6 de captura de imágenes de embriones en sí mismo no es un elemento necesario de realizaciones de la invención). Los aspectos del ordenador 4 pueden ser en gran medida convencionales, excepto que la CPU está configurada para ejecutar un programa, que, por ejemplo, puede almacenarse en la RAM 28, ROM 26 o HDD 30, para realizar el procesamiento de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención como se describe en el presente documento.

65

El embrión 8 de acuerdo con determinadas implementaciones ilustrativas se supervisa regularmente usando el sistema 6 de captura de imágenes de embriones para obtener la información relevante (es decir, los tiempos asociados con acontecimientos particulares del desarrollo embrionario, aparición (o no) de características particulares del desarrollo embrionario). El embrión se controla preferentemente al menos una vez por hora, tal como al menos dos veces por hora, tal como al menos tres veces por hora, tal como al menos cuatro veces por hora, tal como al menos seis veces por hora, tal como al menos 12 veces por hora. La supervisión se realiza preferentemente mientras que el embrión está situado en una incubadora usada para cultivar el embrión. Esto se lleva a cabo preferentemente a través de la adquisición de imágenes del embrión, tal como se analiza en el presente documento en relación con los métodos de cámara rápida.

La figura 5 es un diagrama de flujo que representa esquemáticamente un método para clasificar embriones según su potencial de desarrollo de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención. El método puede aplicarse, por ejemplo, para clasificar una pluralidad de embriones asociados con un solo paciente para ayudar a identificar cuáles de los embriones tienen más probabilidades de implantarse con éxito/conduce a un nacimiento vivo. El número de embriones, por supuesto, variará entre pacientes y ciclos de tratamiento, pero en un caso habitual, la pluralidad de embriones de un solo paciente en un solo ciclo de tratamiento podría estar entre 6 y 12 embriones, por ejemplo. El método puede ser un método implementado por ordenador que puede implementarse usando el ordenador 4 de la figura 4 con la CPU 24 implementando el método de acuerdo con un programa cargado.

En la etapa S1 se obtienen una pluralidad de valores para las características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones durante un periodo de observación. En un enfoque para clasificar los embriones en el contexto de la evaluación de los embriones para determinar su potencial de desarrollo relevante para una transferencia del día tres, este periodo de observación puede, por ejemplo, extenderse hasta aproximadamente 72 horas, o más, después del tiempo de referencia relevante (tiempo cero). Las características morfológicas de interés dependerán de la aplicación específica en cuestión, ya que diferentes realizaciones pueden depender de diferentes características morfológicas, como se analiza adicionalmente más adelante. En este ejemplo, se supone que las características obtenidas para cada embrión son:

- (i) una indicación de si el embrión presenta o no adecuadamente dos pronúcleos (p. ej., un valor para NOT2PN como se ha definido anteriormente).
- (ii) valores para  $t_3$  y  $t_{PNf}$  (considerándose que una diferencia relativamente pequeña entre estos valores es un indicador de la aparición de división directa)
- (iii) la duración de una etapa de desarrollo predefinida que se usa aquí para identificar si el desarrollo del embrión es inapropiadamente lento (en este ejemplo, la etapa de desarrollo es desde tiempo cero (p. ej., tiempo de microinyección IICE) hasta  $t_3$ )
- (iv) las duraciones de dos etapas de desarrollo predefinidas que se usan aquí para identificar si la duración relativa de una de estas etapas de desarrollo a la otra está dentro de un intervalo deseado (en este ejemplo, las dos etapas de desarrollo son la duración de  $cc3a$  (es decir,  $t_5 - t_3$ ) y la duración combinada de  $cc2a$  y  $cc3a$  (es decir,  $t_5 - t_2$ )).
- (v) una indicación de si el número de células en el embrión no logró alcanzar un número dado dentro de un tiempo dado (que, en este ejemplo particular, es de ocho células en 66 horas).

Por tanto, para resumir, se pueden buscar valores para las siguientes características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones para cada embrión de acuerdo con una implementación ilustrativa del método de la figura 5: NOT2PN;  $t_{PNf}$ ;  $t_2$ ;  $t_3$ ;  $t_5$  y  $t_8$ . Se apreciará que puede no ser posible obtener valores para todas estas características para todos los embriones. Por ejemplo, puede ser que un embrión no alcance la etapa de 8 células dentro del periodo de observación, en cuyo caso no sería posible obtener un valor para  $t_8$  (correspondiente a una determinación de que el embrión no alcanzó 8 células dentro del periodo de observación/supervisión).

Pueden obtenerse valores para estos parámetros de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo, usando captura de imágenes de cámara rápida convencional de embriones en una incubadora para obtener una serie de imágenes de los embriones en desarrollo y usando procedimientos de anotación convencionales para identificar los tiempos y las apariciones de los diversos eventos morfológicos relevantes de la serie de imágenes. Por ejemplo, los valores para estos parámetros pueden obtenerse utilizando un dispositivo EmbryoScope (RTM) para supervisión de embriones con cámara rápida durante la incubación y su software EmbryoViewer (RTM) asociado para anotar los acontecimientos de interés. El dispositivo EmbryoScope (RTM) y el software EmbryoViewer (RTM) han sido desarrollados por, y están disponibles en, Unisense FertiliTech A/S (Aarhus, Dinamarca). Se apreciará que de acuerdo con técnicas previamente establecidas, la anotación se puede realizar de manera manual (p. ej., basada en el aporte del usuario) y/o automática (p. ej., basada en el análisis/procesamiento numérico de la imagen) y/o semiautomática (p. ej., basada en una mezcla de procesamiento de imágenes numéricas y aporte del usuario).

En la etapa S2, se selecciona uno de los embriones para su consideración. En general, el enfoque de la figura 5 es establecer secuencialmente una puntuación para cada embrión y la puntuación se puede utilizar después como base para clasificar los embriones según su potencial de desarrollo. El orden en que se consideran los embriones no es significativo y, a este respecto, el embrión que se selecciona en la etapa S2 puede elegirse arbitrariamente de los embriones que quedan por puntuar. El embrión seleccionado para una iteración dada puede denominarse embrión actual para esa iteración.

En la etapa S3, se realiza una determinación de si el embrión actual debe clasificarse. En este ejemplo, esto se basa en el valor de NOT2PN. En algunos aspectos, esto puede verse como una etapa de cribado inicial en la que se identifican embriones que tienen una o más características que se sabe que están fuertemente asociadas con bajo potencial de desarrollo.

Si se determina en la etapa S3 que el embrión actual no presenta adecuadamente dos pronúcleos, se determina que el embrión no debe clasificarse adicionalmente y el procesamiento sigue la rama marcada con N hasta la etapa S4 en la que se asigna al embrión actual una puntuación de 0 y el procesamiento continúa a la etapa S16. En la etapa S16 se determina si se ha considerado toda la pluralidad de embriones o si hay más embriones por considerar. Si hay más embriones por considerar, el procesamiento sigue la rama marcada con S de vuelta a la etapa S2 cuando se selecciona el siguiente embrión para su consideración.

Si, por otro lado, se determina en la etapa S3 que el embrión sí presenta adecuadamente dos pronúcleos, el procesamiento sigue la rama marcada con S hasta la etapa S5.

En la etapa S5 se realiza una evaluación para determinar si el embrión se sometió a división directa durante el periodo de observación (se ha descubierto que la división directa está asociada con potencial de desarrollo relativamente bajo). En este ejemplo, esto se basa en determinar si un periodo de tiempo asociado con el desarrollo del embrión es menor que una duración umbral y, si es así, determinar que el embrión ha experimentado un acontecimiento de división directa. En esta implementación ilustrativa, se considera que se ha producido un acontecimiento de división directa si una medida del tiempo entre tPNF y t3 (t3-tPNf) es menor de aproximadamente 11,5 horas (p. ej., menor de 11,48 horas). Se podrían usar otros valores umbral, por ejemplo, el valor umbral puede seleccionarse del grupo que comprende: 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas y 14 horas.

En algunas otras implementaciones ilustrativas, se pueden usar diferentes periodos de tiempo para identificar si ha habido un acontecimiento de división directa. Por ejemplo, se puede considerar que se ha producido un acontecimiento de división directa si una medida del periodo (t3-t2) es menor que una cantidad umbral, por ejemplo, una cantidad seleccionada del grupo que comprende: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas y 11 horas. En otro ejemplo más, se puede considerar que se ha producido un acontecimiento de división directa si una medida del periodo (t5-t4) es menor que una cantidad umbral, por ejemplo, una cantidad seleccionada del grupo que comprende: 0,1 horas, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas y 11 horas. En otro ejemplo más, se puede considerar que se ha producido un acontecimiento de división directa si se mide la proporción de un tiempo de división a 3 células, t3, con respecto a un momento de división a 4 células, t4 es menor que una cantidad umbral seleccionada del grupo que comprende: 0,9, 0,8, 0,7 y 0,6. En algunas implementaciones, la etapa S5 puede implicar determinar si alguno de estos periodos de tiempo es menor que su umbral correspondiente para identificar si ha habido algún acontecimiento de división directa.

Si se determina en la etapa S5 que el embrión actual ha experimentado división directa, el procesamiento sigue la rama marcada con S hasta la etapa S6 en la que se asigna al embrión actual una puntuación de 1 y el procesamiento continúa después a la etapa S16. De otro modo, el procesamiento sigue la rama marcada con N hasta la etapa S7.

En la etapa S7, se realiza una evaluación para determinar si la duración de una etapa de desarrollo predefinida es mayor que una duración umbral predefinida. Más en general, en la etapa S7, se realiza una evaluación para determinar si un aspecto del desarrollo del embrión indica un desarrollo relativamente lento (que se ha descubierto que está asociado con potencial de desarrollo relativamente bajo). En esta implementación ilustrativa, la duración de la etapa de desarrollo predefinida es el tiempo que se tarda en alcanzar 3 células, t3, y la duración umbral predefinida es de aproximadamente 43 horas (p. ej., 42,91 horas). Sin embargo, podrían usarse otros valores umbral con respecto a t2, por ejemplo, el valor umbral puede seleccionarse del grupo que comprende: 38 horas, 39 horas, 40 horas, 41 horas, 42 horas, 43 horas, 44 horas, 45 horas, 46 horas, 47 horas y 48 horas.

En algunas otras implementaciones ilustrativas, se pueden usar diferentes periodos de tiempo para identificar si ha habido desarrollo lento. Por ejemplo, puede considerarse que se ha producido desarrollo lento si una medida de t2 es menor que una cantidad umbral, por ejemplo, una cantidad seleccionada del grupo que comprende: 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas y 35 horas. En otro ejemplo más, puede considerarse que se ha producido desarrollo lento si una medida de t4 es menor que una cantidad umbral, por ejemplo, una cantidad seleccionada del grupo que comprende: 41 horas, 42 horas, 43 horas, 44 horas, 45 horas, 46 horas, 47 horas, 47 horas, 48 horas, 49 horas y 50 horas. En otro ejemplo más, puede considerarse que se ha producido desarrollo lento si una medida de t5 es menor que una cantidad umbral, por ejemplo, una cantidad seleccionada del grupo que comprende: 55 horas, 56 horas, 57 horas, 58 horas, 59 horas, 60 horas, 61 horas, 62 horas y 63 horas. En algunas implementaciones, la etapa S7 puede implicar determinar si alguno de varios de estos tiempos es mayor que los valores umbral correspondientes para identificar si ha habido desarrollo lento con respecto a cualquiera de los periodos de tiempo.

Si se determina en la etapa S7 que el embrión actual ha experimentado desarrollo lento, el procesamiento sigue la rama marcada con S hasta la etapa S8 en la que se asigna al embrión actual una puntuación de 2 y el procesamiento

continúa después a la etapa S16. De otro modo, el procesamiento sigue la rama marcada con N hasta la etapa S9.

Las etapas S9 y S11 en efecto operan juntas para determinar si la duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está dentro o fuera de un intervalo predefinido. Más en general, estas etapas se combinan para evaluar si aspectos del desarrollo embrionario indican desarrollo irregular con respecto a las duraciones relativas de dos etapas de desarrollo en comparación con embriones asociados con buen potencial de desarrollo. En este ejemplo, la implementación de la evaluación se realiza en dos etapas, en concreto, determinando si la duración relativa de la primera etapa a la segunda etapa está por debajo de un límite inferior para el intervalo en la etapa S9 y determinando si la duración relativa de la primera etapa a la segunda etapa está por encima de un límite superior para el intervalo en la etapa S11.

Por tanto, en la etapa S9 se realiza una evaluación para determinar si la duración relativa de una primera etapa del desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa del desarrollo predefinida para el embrión está por debajo de un límite predefinido. En esta implementación ilustrativa, la primera etapa del desarrollo predefinida es desde la división a 3 células, t3, hasta la división a cinco células, t5, (es decir, cc3a) y la segunda etapa del desarrollo predefinida es la etapa desde la división a 2 células, t2, hasta la división a cinco células, t5, (es decir, cc2a más cc3a). Por tanto, una medida de la duración relativa usada en este ejemplo es  $(t5-t3)/(t5-t2)$  (equivalente a  $cc3a/(cc2a + cc3a)$ ). Un límite inferior para esta duración relativa en esta implementación específica es de aproximadamente 0,34 horas. Sin embargo, se podrían usar otros valores límite inferiores para este parámetro, por ejemplo, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 o 0,5. En algunas otras implementaciones ilustrativas, se pueden usar diferentes duraciones relativas para identificar si ha habido desarrollo irregular y se analizan algunos ejemplos de esto más adelante.

Si se determina en la etapa S9 que el embrión actual ha experimentado desarrollo irregular porque la duración relativa determinada está por debajo del límite inferior, el procesamiento sigue la rama marcada con S hasta la etapa S10 en la que se asigna al embrión actual una puntuación de 3 y el procesamiento continúa después a la etapa S16. De otro modo, el procesamiento sigue la rama marcada con N hasta la etapa S11.

En la etapa S11 se realiza una evaluación para determinar si la duración relativa de una primera etapa del desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa del desarrollo predefinida para el embrión está por encima de un límite predefinido. En esta implementación ilustrativa, la primera y segunda etapas del desarrollo son las mismas que las usadas en la etapa S9 y el límite superior para esta duración relativa en esta implementación específica es de aproximadamente 0,58 horas. Sin embargo, se podrían usar otros valores límite superiores para este parámetro, por ejemplo, 0,6, 0,7, 0,8 o 0,9. Como ya se ha observado anteriormente, en algunas otras implementaciones ilustrativas, se pueden usar otras duraciones relativas para identificar si ha habido desarrollo irregular y se analizan algunos ejemplos de esto más adelante.

Si se determina en la etapa S11 que el embrión actual ha experimentado desarrollo irregular porque la duración relativa determinada para las etapas de desarrollo relevantes está por encima del límite superior, el procesamiento sigue la rama marcada con S hasta la etapa S12 en la que se asigna al embrión actual una puntuación de 4 y el procesamiento continúa después a la etapa S16. De otro modo, el procesamiento sigue la rama marcada con N hasta la etapa S13.

Por tanto, y como ya se ha analizado anteriormente, se apreciará que la combinación de las etapas S9 y S11 en efecto proporciona una determinación de si la duración relativa de una primera etapa del desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa del desarrollo predefinida para el embrión está dentro de un intervalo predefinido (en cuyo caso el procesamiento de la figura 5 para el embrión relevante alcanzará la etapa S13) o fuera del intervalo, en cuyo caso se le asignará al embrión una puntuación de 3 o 4, dependiendo de si está por debajo o por encima del intervalo. En esta implementación ilustrativa en particular, la duración relativa corresponde a  $(t5-t3)/(t5-t2)$  y el intervalo predefinido es de aproximadamente 0,34 a 0,58. Sin embargo, se pueden usar otros intervalos, por ejemplo, el intervalo puede seleccionarse del grupo que comprende: 0,1 a 0,9, 0,2 a 0,8, 0,3 a 0,7, 0,4 a 0,6 y 0,5 a 0,6. En otros ejemplos más, se pueden usar diferentes primeras y segunda etapas de desarrollo predefinidas para establecer si un embrión presenta un desarrollo irregular en etapas correspondientes a las etapas S9 y S13. Por ejemplo, otros parámetros e intervalos que podrían usarse incluyen:

- $(t3-t2)/(t5-t2)$  - con un intervalo de: 0,1 a 0,9, 0,1 a 0,8, 0,2 a 0,7, 0,3 a 0,6 o 0,4 a 0,5
- $(t3-t2)/(t5-t3)$  - con un intervalo de: 0,05 a 10, 0,1 a 9, 0,15 a 8, 0,2 a 7, 0,25 a 6, 0,3 a 7, 0,35 a 6, 0,4 a 5, 0,45 a 4, 0,5 a 3, 0,6 a 2 o 0,75 a 1
- $(t5-t3)/t5$  - con un intervalo de: más de 0,1, más de 0,2 y más de 0,3
- $(t4-t3)/(t3-t2)$  - con un intervalo de más de 0,1, menos de 0,2, menos de 0,3, menos de 0,4 o menos de 0,5
- $(t8-t5)/(t5-t3)$  - con un intervalo de: menos de 0,1, menos de 0,15 o menos de 0,2
- $((t3-t2)+(t5-t4))/(t8-t4)$  - con un intervalo de: más de 0,3, más de 0,4, más de 0,5, más de 0,6, más de 0,7 o más de 0,8
- $(t8-t5)/(t8-t4)$  - con un intervalo de: más de 0,3, más de 0,4, más de 0,5, más de 0,6, más de 0,7, más de 0,8, más de 0,9 o más de 0,97
- $(t3-tPNf)/(t4-tPNf)$  (o  $t3/t4$ ) - con un intervalo de: más de 0,35, más de 0,45, más de 0,55, más de 0,65, más de 0,75, más de 0,85, más de 0,95
- $(t4-t3)/(t4-t2)$  - con un intervalo de: menos de 0,3, menos de 0,4, menos de 0,5, menos de 0,6 o menos de 0,7

- $(t8-t5)/(t8-t2)$  - con un intervalo de: menos de 0,2, menos de 0,3, menos de 0,4, menos de 0,5 y menos de 0,6.

Se observará que algunos de los intervalos enumerados anteriormente están unidos solo en un extremo (es decir, algunos intervalos se especifican como un valor mayor que X). En este caso, el procesamiento de la figura 5 puede modificarse para evitar una u otra de la etapa S9 o S11 dependiendo de si el intervalo es mayor que un límite dado o menor que un límite dado. Como alternativa, se podría establecer un valor extremo arbitrario para el límite relevante, tal como 0 horas o 999 horas.

Se apreciará que para todas las proporciones diferentes de duraciones para diversos acontecimientos de desarrollo (que individualmente pueden comprender la suma de 27 enmiendas, tal como para el parámetro  $((t3-t2)+(t5-t4))/(t8-t4)$ ), lo que es significativo es una indicación de la proporción relevante. Aunque esta puede calcularse como se ha establecido anteriormente, no obstante, se podría determinar igualmente como una "inversa" de estas proporciones. A este respecto, se apreciará que una indicación de un valor para A/B es también una indicación de un valor para B/A.

En la etapa S13 se realiza una evaluación para determinar si el embrión actual se desarrolló o no a un número predefinido de células dentro de un tiempo predefinido. En esta implementación ilustrativa en particular, la etapa S13 se basa en la determinación de si el embrión actual consiguió o no alcanzar 8 células en un periodo de 66 horas. Sin embargo, se pueden usar parámetros diferentes para este aspecto del procesamiento de la figura 5 de acuerdo con otras limitaciones ilustrativas. Por ejemplo, en lugar de 66 horas, la evaluación puede basarse en un periodo de tiempo diferente, por ejemplo, un periodo de tiempo seleccionado del grupo que comprende: 64 horas, 65 horas, 66 horas, 67 horas, 68 horas, 69 horas, 70 horas, 71 horas y 72 horas.

Si se determina en la etapa S13 que el embrión actual no consiguió alcanzar el número requerido de células dentro del tiempo relevante, el procesamiento sigue la rama marcada con N hasta la etapa S14 en la que se asigna al embrión actual una puntuación de 4 y el procesamiento continúa después a la etapa S16. De otro modo, el procesamiento sigue la rama marcada con S hasta la etapa S15.

En la etapa S15, al embrión actual se le asigna una puntuación de 5 y el procesamiento continúa a la etapa S16.

Como se ha observado anteriormente, en la etapa S16 se determina si hay algún embrión más por considerar de la pluralidad de embriones que se clasifican y, si es así, el procesamiento sigue la rama marcada con S de vuelta a la etapa S2, donde el procesamiento descrito anteriormente se repite para el siguiente embrión que se va a seleccionar. Si, por otro lado, no hay más embriones por considerar (es decir, se ha asignado una puntuación a toda la pluralidad de embriones que se van a clasificar), el procesamiento sigue la rama marcada con N hasta la etapa S17.

En la etapa S17, la pluralidad de embriones se clasifica entre sí según sus puntuaciones respectivas. Básicamente, se considera que una puntuación más alta es indicativa de un mayor potencial de desarrollo. Se pueden seleccionar después uno o más embriones de la pluralidad de embriones que se han clasificado para su implantación/transferencia a un paciente en función de su clasificación. Por ejemplo, los embriones de mayor clasificación pueden seleccionarse para su implantación/transferencia a un paciente preferentemente sobre los embriones con una clasificación menor (puntuación menor). A este respecto, se apreciará que las puntuaciones numéricas específicas asignadas a cada embrión (es decir, 0, 1, 2,...5) no son significativas. Podrían usarse igualmente otros valores. Asimismo, la puntuación podría basarse en una puntuación baja que indica buen potencial de desarrollo, en cuyo caso la etapa S4 del procesamiento de la figura 5 estaría asociado con una puntuación mayor que la etapa S6, que a su vez se asociará con una puntuación mayor que la etapa S8, y así sucesivamente. De hecho, no es necesario que las puntuaciones sean numéricas. Por ejemplo, los embriones pueden estar asociados con una puntuación A en la etapa S4, una puntuación B en la etapa S6 y así sucesivamente hasta una puntuación E en la etapa D15, y la clasificación puede basarse en la identificación de embriones asociados con la primera letra del alfabeto como de potencial de desarrollo relativamente bajo.

Por tanto, el procesamiento de la figura 5 representa un método para clasificar una pluralidad de embriones según su potencial de desarrollo de acuerdo con una realización de la invención. Esto implica establecer si diversas etapas del desarrollo cumplen o no diversos criterios como se ha analizado anteriormente. En particular, los embriones se evalúan para determinar la división directa (etapa S5), desarrollo lento (etapa S7) e irregularidad (etapas S9 y S13 combinadas). Los inventores han descubierto que estas características particulares, y su importancia relativa para establecer una clasificación general de acuerdo con el proceso descrito anteriormente, proporcionan un modelo para clasificar los embriones de una cohorte para identificar los que tienen más probabilidades de implantarse con éxito y, posteriormente, conducir a un nacimiento vivo. Asimismo, los inventores han descubierto que el enfoque es relativamente insensible a las características asociadas con las condiciones de desarrollo del embrión, tales como la naturaleza de los métodos de fecundación utilizados (IICE o FIV clásica) y la naturaleza de la atmósfera de incubación (p. ej., oxígeno bajo u oxígeno ambiental).

Para demostrar la capacidad del procesamiento de la figura 5 para clasificar con éxito los embriones según su potencial de desarrollo, el modelo se puede aplicar a datos históricos de embriones para los que existen datos de implantación conocidos (es decir, embriones DIC) para establecer cuán bien el modelo predice los resultados conocidos para embriones DIC. Los inventores han hecho esto para aproximadamente 3.275 embriones DIC. Este conjunto de 3.275

embriones se tomó de una base de datos de información relacionada con aproximadamente 17.000 embriones DIC. Los embriones de la base de datos de 17.000 embriones DIC que no se incluyeron en el conjunto reducido de 3.275 embriones utilizados para probar el modelo fueron aquellos para los que la calidad de las anotaciones para los acontecimientos de desarrollo relevantes se consideró poco fiable, aquellos para los que el paciente tenía más de 40 años de edad, los que no estaban relacionados con transferencias del día tres (ya que estos parámetros y valores particulares usados para este ejemplo específico del modelo se seleccionan para clasificar los embriones para transferencia del día tres) y los asociados con el cribado genético previo a la implantación. Los 3.275 embriones DIC restantes comprendieron embriones que podrían dividirse en cuatro grupos ambientales principales, en concreto (i) fecundación FIV clásica y atmósfera de incubación baja en oxígeno, (ii) fecundación FIV clásica y atmósfera de incubación de oxígeno ambiental, (iii) fecundación por IICE y atmósfera baja en oxígeno y (iv) fecundación por IICE y atmósfera de oxígeno ambiental. Los datos para los 3.275 embriones provienen de 23 clínicas diferentes, aportando 21 clínicas datos para al menos 10 embriones DIC y aportando 9 de estos datos para al menos 100 embriones DIC.

El procesamiento de la figura 5 se aplicó a cada uno de los 3.275 embriones DIC. Los resultados de esto, por ejemplo, con respecto a cuántos embriones se asignaron las diferentes puntuaciones, pueden estar representados por un árbol de clasificación para el modelo, tal como se representa en la figura 6.

Por tanto, la figura 6 es un árbol de clasificación que representa la aplicación del modelo de la figura 5 a los 3.275 embriones DIC. Cada nodo de rama (donde se toma una decisión de clasificación) y nodo final/de hoja (donde se asigna una puntuación) se identifica en la figura 6 mediante la etapa correspondiente del procesamiento de la figura 5 con la que se relaciona el nodo. Cada nodo también está asociado con una indicación del número de embriones (n) que alcanzaron ese nodo del árbol y el éxito de implantación de esos embriones (imp). Por tanto, el árbol comienza en la etapa S5 con una población de 3.275 embriones, de los que 25,0 % se implantaron con éxito. El procesamiento de la etapa S5 divide los 3.275 embriones en embriones que muestran división directa (267 embriones de los que 5,6 % se implantaron con éxito) y embriones que no muestran división directa (3.008 embriones de los que 26,6 % se implantaron con éxito). El procesamiento de la etapa S7 divide después los 3.008 embriones de la etapa S5 en embriones que muestran desarrollo lento (470 embriones de los que 12,1 % se implantaron con éxito) y embriones que no muestran desarrollo lento (2.538 embriones de los que 29,4 % se implantaron con éxito). El procesamiento de la etapa S9 divide después los 2.538 embriones de la etapa S7 en 161 embriones de los que 15,5 % se implantaron con éxito y 2.229 embriones de los que 30,7 % se implantaron con éxito). Cabe señalar que no todos los embriones se clasifican en esta etapa (es decir,  $161 + 2.229 < 2.538$ ). Esto se debe a que hay algunos embriones para los que no fue posible aplicar el criterio de clasificación, por ejemplo, porque los tiempos relevantes no eran identificables en los datos de cámara rápida. Estos pueden denominarse datos imputados y se descuentan de consideraciones posteriores en la aplicación del modelo de la figura 5 a embriones DIC para fines de validación como se representa en el árbol de clasificación de la figura 6 (es decir, no se les asigna una puntuación). Si hay embriones que no pueden clasificarse en una aplicación práctica del modelo a una cohorte de embriones de un paciente, puede usarse en su lugar aporte convencional del embriólogo para ayudar a clasificar estos embriones. Más en general, se reconocerá que, en cualquier caso, cabe esperar que la clasificación de acuerdo con las realizaciones descritas en el presente documento se use normalmente para ayudar a un embriólogo a tomar una decisión de clasificación final y las clasificaciones obtenidas de acuerdo con realizaciones de la invención podrían no tomarse como definitivas sin aportes adicionales del embriólogo.

Como se puede ver en el árbol de clasificación de la figura 6, la aplicación del modelo de la figura 5 a los embriones DIC clasifica 1294 embriones con una puntuación de 5 y estos embriones tienen un éxito de implantación de 36,1 %. Esto es aproximadamente 50 % más alto que el éxito de implantación de la población en su conjunto, lo que demuestra la fuerza del modelo para poder identificar embriones de calidad/potencial de desarrollo relativamente altos dentro de una pluralidad de embriones para clasificar. También se puede ver que a un total de 935 embriones se les asigna una puntuación de 4, siendo el desglose de 410 embriones en la etapa S14 con un éxito de implantación de 22,9 % y 525 embriones en la etapa S12 con un éxito de implantación de 23,2 %. Debido a que estadísticamente se ha descubierto que los embriones que alcanzan la etapa S12 y los embriones que alcanzan la etapa S14 tienen tasas de éxito de implantación comparables, a estos dos grupos se les asigna la misma puntuación.

El resultado de aplicar el modelo de la figura 5 a los 3.275 embriones DIC utilizados para la validación también se representa en la figura 7. Este es un gráfico de barras que muestra la distribución porcentual de los 3.275 embriones DIC asociados con el árbol de clasificación de la figura 6 entre las diferentes puntuaciones (identificados por la leyenda "todos los datos DIC") y también la distribución porcentual de los embriones asociados con el árbol de clasificación de la figura 6 que se implantó con éxito (identificado por la leyenda "DIC positivo"). También se muestra en la figura 7 una distribución porcentual de una población de embriones que se sabe que dio lugar a un nacimiento vivo entre las puntuaciones determinadas para estos embriones de acuerdo con el modelo representado en las figuras 5 y 6 (identificado por la leyenda "nacimiento vivo").

La población de embriones asociados con los datos de nacimientos vivos en la figura 7 no se corresponde simplemente con los 3.275 embriones DIC que dieron lugar a un nacimiento vivo. Esto se debe a que no están disponibles datos de nacimientos vivos para estos 3.275 embriones DIC. Esto se debe a que una vez que una paciente queda embarazada no siempre sucede que la clínica de FIV donde fue tratada reciba información sobre el resultado final del embarazo. De los 3.275 embriones DIC asociados con el árbol de clasificación de la figura 6, se sabe que solo

aproximadamente 180 dieron lugar a un nacimiento vivo. Cabe esperar que muchos otros embriones de implantación también den lugar a un nacimiento vivo, pero los datos de estos embriones simplemente no están disponibles. Por tanto, los datos de nacimientos vivos representados en la figura 7 corresponden a los aproximadamente 180 de los 3.275 embriones para los que hay datos de nacimientos vivos y otros aproximadamente 120 embriones adicionales de los cuales hay datos de nacimientos vivos.

La figura 7 demuestra cómo la evaluación del potencial de desarrollo de acuerdo con realizaciones de la invención ayuda a identificar embriones que tienen buen potencial de desarrollo. Por ejemplo, resulta evidente que las distribuciones de embriones asociados con buen potencial de desarrollo (es decir, embriones "DIC positivos" y "con nacimientos vivos") están sesgadas a puntuaciones mayores que la población en su conjunto.

Se apreciará que hay diversas modificaciones del enfoque de la figura 5 que se pueden adoptar de acuerdo con diferentes realizaciones. Por ejemplo, mientras que la figura 5 representa un enfoque en general por iteraciones en el que los embriones se consideran y puntúan uno a uno, en otras implementaciones, los embriones pueden puntuarse en paralelo o al menos parcialmente en paralelo. Por ejemplo, en lugar de repetir las etapas S2 a S16 para cada embrión, en otras implementaciones de las etapas individuales del procedimiento de clasificación se puede realizar para una pluralidad de embriones antes de pasar a la siguiente etapa del procedimiento de clasificación. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una etapa correspondiente a la etapa S3 para todos los embriones antes de que el procesamiento pase a una etapa correspondiente a la etapa S5 en la que se puede realizar una evaluación de si se debe considerar que los embriones han experimentado división directa para todos los embriones que no se clasificaron con una puntuación de 0 en la etapa correspondiente a la etapa S3.

Asimismo, en algunas implementaciones puede no haber una etapa correspondiente a S3. Es decir, en algunas implementaciones puede no haber una evaluación de si un embrión debe clasificarse en función de la aparición o no de dos pronúcleos. En este caso, el procesamiento puede ser en general similar al representado en la figura 5, pero sin etapas correspondientes a las etapas S3 y S4. De manera similar, puede no haber etapas correspondientes a las etapas S13 y S14 en algunos ejemplos.

Además, y como ya se ha mencionado, se pueden usar diferentes parámetros y diferentes valores de umbral para las distintas etapas del método. Lo que es significativo para determinadas realizaciones de la invención es que el modelo tiene en cuenta la división directa, lentitud en el desarrollo (en particular, desarrollo temprano) e irregularidad en el desarrollo (al evaluar la proporción de dos caracteres asociados con diferentes etapas de desarrollo de los embriones) al clasificar los embriones según su potencial de desarrollo. Hay muchos parámetros diferentes que son indicativos de estas características, tales como los diferentes ejemplos proporcionados anteriormente. Los parámetros específicos y los valores umbral asociados pueden variar entre implementaciones. Por ejemplo, aunque se ha descubierto que el enfoque anterior proporciona un modelo que es aplicable universalmente, puede ser que una clínica específica desee desarrollar su propio modelo basado en estos enfoques y en este caso puede descubrir que otros parámetros y/o valores umbral proporcionan diferenciación optimizada del potencial de desarrollo embrionario para embriones cultivados en esa clínica. En cualquier caso, los parámetros y valores relevantes pueden establecerse a partir de un análisis estadístico de embriones DIC asociados con las condiciones de desarrollo relevantes. Por ejemplo, en el caso de buscar establecer un modelo aplicable universalmente, un análisis de cómo diferentes parámetros y valores umbral asociados rindieron en la clasificación de los embriones en comparación con los resultados conocidos para los 3.275 embriones DIC analizados anteriormente identificó los parámetros y valores específicos para esos parámetros utilizados en la implementación ilustrativa específica representada por el árbol de clasificación de la figura 6.

Como ya se ha mencionado, las realizaciones de la invención están dirigidas a clasificar los embriones de una manera que tenga en cuenta tres aspectos del desarrollo embrionario, en concreto, si los embriones experimentan o no división directa, si los embriones presentan o no desarrollo relativamente lento y si los embriones presentan o no desarrollo relativamente irregular. Se puede establecer si un embrión presenta o no alguna de estas características a partir de datos morfocinéticos/morfológicos asociados con el desarrollo del embrión. En la implementación ilustrativa asociada con el árbol de clasificación de la figura 6, la evaluación de la división directa se basa en el parámetro  $(t3-tPNf)$ , la evaluación del desarrollo relativamente lento se basa en el parámetro  $t3$  y la evaluación del desarrollo relativamente irregular se basa en el parámetro  $(t5-t3)/(t5-t2)$ . Los valores umbral para cada parámetro en esta implementación ilustrativa en particular se adoptan como se ha analizado anteriormente y como se establece en la figura 6. Sin embargo, como se ha observado anteriormente, existen diversos otros parámetros y umbrales correspondientes que pueden usarse igualmente para evaluar las tres características de desarrollo identificadas anteriormente (división directa, desarrollo lento, desarrollo irregular) para clasificar los embriones de acuerdo con otras implementaciones.

Por tanto, las figuras 8, 10 y 12 son similares a, y se entenderán a partir de, la figura 6, pero muestran árboles de clasificación que representan diferentes modelos basados en diferentes parámetros y/o valores umbral para evaluar si se considera que los embriones están asociados con división directa, desarrollo lento y/o desarrollo irregular. Las figuras 9, 11 y 13 son gráficos de barras correspondientes que son similares a, y se entenderán a partir de, la figura 7 para los respectivos árboles de clasificación representados en las figuras 8, 10 y 12. De nuevo, estos muestran cómo las distribuciones de embriones asociados con buen potencial de desarrollo determinado de acuerdo con realizaciones de la invención están sesgadas a puntuaciones mayores que la población en su conjunto.

En cada una de las figuras 8, 10 y 12, los nodos del árbol de clasificación se identifican mediante la etapa del método de la figura 5 que está más estrechamente asociado con el nodo. Sin embargo, los modelos representados en las figuras 8, 10 y 12 no incluyen todas las etapas correspondientes al procesamiento del método de la figura 5 y, por lo tanto, no existe una correspondencia directa entre todos los nodos en los árboles de clasificación de las figuras 8, 10 y 12 y el árbol de clasificación de la figura 6.

Por ejemplo, de acuerdo con el modelo de clasificación representado en la figura 8, no hay ninguna etapa correspondiente a la etapa S13 en el método de la figura 5. Es decir, la clasificación de los embriones de acuerdo con el modelo de la figura 8 no implica una etapa basada en la determinación de si el embrión ha alcanzado una etapa dada de desarrollo en un tiempo dado. En consecuencia, hay un nodo de decisión menos en el árbol de clasificación y, en consecuencia, la puntuación máxima para el modelo de clasificación es menor (es decir, 4 en lugar de 5). Sin embargo, se apreciará que la clasificación numérica específica obtenida de acuerdo con cualquier modelo dado es para clasificar el potencial de desarrollo relativo de los embriones según ese modelo. No se pretende que la puntuación numérica sea una clasificación "absoluta" para la comparación con embriones clasificados con diferentes modelos. Es decir, una puntuación de 5 en el modelo representado por la figura 6 se interpreta como una clasificación más alta que una puntuación de 4 en el modelo representado por la figura 6, pero no debe interpretarse necesariamente como una indicación de una clasificación mayor que una puntuación de 4 en el modelo representado por la figura 8.

Asimismo, no hay ninguna etapa correspondiente a la etapa S11 del modelo representado en la figura 6 en los modelos representados en las figuras 10 y 12. Esto se debe a que la evaluación del desarrollo (ir)regular en la figura 6 se basa en si el parámetro  $(t5-t3)/(t5-t2)$  queda dentro o fuera de un intervalo definido por un límite inferior en la etapa S11 y un límite superior en la etapa S13, pero la evaluación del desarrollo (ir)regular en el modelo de la figura 10 se basa en una evaluación de si  $(t8-t5)/(t8-2)$  queda dentro o fuera del intervalo que está limitado solo en un extremo.

Para cada modelo, las puntuaciones relativas asociadas con cada nodo de hoja se basan en el éxito de implantación respectivo para los embriones que alcanzan ese nodo de hoja. Por ejemplo, en el modelo de la figura 12, los embriones DIC que alcanzan las etapas marcadas como correspondientes a la etapa S6 (es decir, clasificados como sometidos a división directa) y S8 (es decir, clasificados como no sometidos a división directa, pero que presentan desarrollo lento), tienen ambas probabilidades de implantación comparables y, por lo tanto, se les asigna la misma puntuación.

Como se puede ver a partir del modelo representado en las figuras 6, 8, 10 y 12, a pesar de basarse en diferentes parámetros específicos y valores umbral para evaluar embriones con respecto a división directa, desarrollo lento y desarrollo irregular, no obstante, todos los modelos pueden clasificar embriones según el éxito de la implantación. Para cada modelo, los embriones a los que se asigna la puntuación más alta se asocian con probabilidades de implantación de aproximadamente 32 % a 36 %, lo que representa una mejora significativa sobre la probabilidad de implantación para la población de embriones DIC tomados en su conjunto, que es 25 %. Es decir, el enfoque de clasificación de embriones basado en las tres características identificadas anteriormente puede identificar los que tengan una mayor probabilidad de implantación que los que tengan una menor probabilidad de implantación.

Las figuras 14 a 17 son diagramas de árbol de clasificación que son similares a, y se entenderán a partir de, la figura 6. Los árboles de clasificación de las figuras 14 a 18 se basan en el mismo modelo que el árbol de clasificación de la figura 6 (p. ej., con respecto a los parámetros y umbrales específicos utilizados para evaluar la división directa, el desarrollo lento e irregular), pero muestran los resultados de aplicar el modelo a diferentes subpoblaciones de los 3.275 embriones DIC.

La figura 14 muestra el resultado de aplicar el modelo al subconjunto de los 3.275 embriones DIC incubados en una atmósfera de oxígeno reducido y la figura 15 muestra el resultado de aplicar el modelo al subconjunto de los 3.275 embriones DIC incubados en una atmósfera de oxígeno ambiental. Se puede ver que los resultados de la aplicación del modelo a embriones incubados en atmósferas de oxígeno reducido y ambiental son comparables, lo que demuestra que el enfoque es capaz de clasificar embriones con poca sensibilidad en cuanto a si los embriones se incuban en condiciones de oxígeno reducido o ambiental y esto demuestra la universalidad de los enfoques de acuerdo con realizaciones de la invención.

La figura 16 muestra el resultado de aplicar el modelo al subconjunto de los 3.275 embriones DIC fecundados por IICE y la figura 17 muestra el resultado de aplicar el modelo al subconjunto de los 3.275 embriones DIC fecundados por FIV clásica. Se puede ver que los resultados de aplicar el modelo a embriones IICE y embriones de FIV son comparables, lo que demuestra que el enfoque es capaz de clasificar embriones con poca sensibilidad en cuanto a si los embriones se fecundan mediante IICE o FIV y esto demuestra además la universalidad de los enfoques de acuerdo con realizaciones de la invención.

Se apreciará que, además de evaluar embriones para determinar la división directa, lentitud en el desarrollo e irregularidad al establecer su clasificación, otro aspecto de determinadas realizaciones de la invención es reconocer cuáles de estas características contribuirían más a una clasificación baja. En particular, se ha identificado que la división directa es un indicador más fuerte de escaso potencial de desarrollo que el desarrollo lento, que a su vez es un indicador más fuerte de escaso desarrollo que el desarrollo irregular. En consecuencia, de acuerdo con determinadas realizaciones, los embriones que presentan división directa se clasifican más bajo que los embriones

que no presentan división directa, independientemente de si los embriones cumplen los otros criterios. Es decir, de los tres criterios: división directa, lentitud e irregularidad, la determinación con respecto a la división directa tiene una mayor influencia en la clasificación de un embrión en relación con los otros embriones que la determinación con respecto a la lentitud y la determinación con respecto a la lentitud a su vez tiene una gran influencia en la clasificación de un embrión en relación con los otros embriones que la determinación con respecto a la irregularidad.

Los diversos árboles de clasificación analizados anteriormente para embriones DIC demuestran cómo los enfoques para clasificar una pluralidad de embriones de acuerdo con realizaciones de la invención pueden ayudar a identificar los embriones que tienen el mayor potencial de desarrollo (mejor calidad). Esto se ha mostrado principalmente en el contexto del potencial de desarrollo medido por la probabilidad de implantación. Sin embargo, y como ya se ha observado, esta es solo una medida ilustrativa para el potencial de desarrollo de los embriones y el principio descrito en el presente documento puede usarse igualmente para clasificar los embriones en función de otras medidas de potencial de desarrollo, por ejemplo, la probabilidad de alcanzar una etapa de blastocisto y/o la probabilidad de que un embrión implantado se desarrolle a un nacimiento vivo y/o la probabilidad de que un embrión implantado se desarrolle a una etapa asociada con un latido cardíaco y/o la probabilidad de que una paciente a quien se transfiere el embrión quede embarazada.

Se apreciará que el enfoque de árbol de clasificación/por etapas analizado anteriormente es simplemente un enfoque algorítmico para clasificar embriones en función de esto y otros enfoques algorítmicos pueden en efecto dar lugar al mismo esquema de clasificación. Por ejemplo, en lugar de clasificar los embriones usando un árbol de decisiones, tal como se representa en el enfoque de las figuras 5 y 6, para identificar clasificaciones para los embriones, todos los embriones pueden evaluarse con respecto a las tres características (división directa, lentitud, irregularidad) y puede obtenerse una puntuación acumulada en función del resultado de la evaluación con respecto a cada característica. Por ejemplo, a los embriones que no muestran división directa se les puede asignar una puntuación de 100 y a los embriones que presentan división directa se les puede asignar una puntuación de 0 para este componente de puntuación. A los embriones que no muestran lentitud se les puede asignar una puntuación de 10 y a los embriones que muestran lentitud se les puede asignar una puntuación de 0 para este componente de puntuación. A los embriones que no muestran irregularidades se les puede asignar una puntuación de 1 y a los embriones que muestran irregularidades se les puede asignar una puntuación de 0 para este componente de puntuación. Por tanto, un embrión que presenta división directa, lentitud e irregularidad tendrá una puntuación acumulada de cero, mientras que un embrión que no presenta división directa, lentitud o irregularidad, tendrá una puntuación acumulada de 111 (máximo). Basándose en este enfoque, los embriones se clasificarían en un orden correspondiente al del enfoque de la figura 6 (excepto con una clasificación más refinada de los embriones dentro de algunas de las categorías de puntuación asociadas con la figura 5).

Por tanto, se ha descrito un método para clasificar los embriones para indicar su potencial de desarrollo. El método comprende: obtener valores para una pluralidad de características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones durante un periodo de observación; determinar para los embriones respectivos si el embrión ha experimentado o no un acontecimiento de división directa y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa; y para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa, determinar si una duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión supera o no una duración umbral predefinida y clasificar los embriones para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida con una clasificación que indica un menor potencial de desarrollo que para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida; y para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida, determinar si las duraciones relativas de dos etapas de desarrollo predefinidas para el embrión están o no fuera de un intervalo predefinido y clasificar los embriones para los que las duraciones relativas de dos etapas de desarrollo predefinidas para el embrión están fuera de un intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones para los que las duraciones relativas de dos etapas de desarrollo predefinidas para el embrión no están fuera del intervalo predefinido.

En algunos aspectos, algunas realizaciones ilustrativas proporcionan un método para clasificar embriones para indicar su potencial de desarrollo; comprendiendo el método: obtener valores para una pluralidad de características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones durante un periodo de observación; determinar para los respectivos embriones una medida de si el embrión experimentó o no un acontecimiento de división directa; determinar para los respectivos embriones una medida de si la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión fue o no mayor que una duración umbral predefinida; determinar para los respectivos embriones una medida de si las duraciones relativas de dos etapas de desarrollo predefinidas para el embrión están o no fuera de un intervalo predefinido; y clasificar los embriones de tal manera que una determinación de que un embrión experimentó un acontecimiento de división directa contribuye más a una clasificación que indica un potencial de desarrollo relativamente bajo que una determinación de que la duración de la etapa de desarrollo predefinida para el embrión fue más larga que la duración umbral predefinida y en donde una determinación de que la etapa de desarrollo predefinida para el embrión fue más larga que la duración umbral predefinida contribuye más a una clasificación que indica un potencial de desarrollo relativamente bajo que una determinación de que las duraciones relativas de dos etapas de

desarrollo predefinidas para el embrión están fuera del intervalo predefinido.

En algunos aspectos, algunas otras realizaciones ilustrativas proporcionan un método para establecer una puntuación para indicar un potencial de desarrollo para un embrión; que comprenden: obtener valores para una pluralidad de características relacionadas con el desarrollo morfológico del embrión durante un periodo de observación; determinar, como primer componente de puntuación, una medida de si el embrión experimentó o no un acontecimiento de división directa; determinar, como segundo componente de puntuación, una medida de si la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión fue o no mayor que una duración umbral predefinida; determinar, como tercer componente de puntuación, una indicación de si las duraciones relativas de dos etapas de desarrollo predefinidas para el embrión están o no fuera de un intervalo predefinido; y establecer una puntuación para indicar un potencial de desarrollo para el embrión teniendo en cuenta el primer componente de puntuación, el segundo componente de puntuación y el tercer componente de puntuación de tal manera que el primer componente de puntuación tenga una mayor influencia en la puntuación que el segundo o tercer componente de puntuación y el segundo componente de puntuación tiene mayor influencia en la puntuación que el tercer componente de puntuación.

Por tanto, y como se ha analizado anteriormente, los métodos de acuerdo con los principios descritos en el presente documento pueden usarse para establecer una puntuación para indicar un potencial de desarrollo para un embrión. Los ejemplos establecidos anteriormente se han centrado principalmente en proporcionar una indicación de la probabilidad de implantación exitosa basada en datos de implantación conocidos para una muestra de embriones. Sin embargo, como ya se ha explicado, el método también es aplicable para establecer puntuaciones relacionadas con otras características potenciales de desarrollo para embriones, por ejemplo, la probabilidad de que un embrión se desarrolle hasta la etapa de blastocisto.

A este respecto, el modelo representado en la figura 6 se ha aplicado a un conjunto de datos que comprende 10.316 embriones de 2413 pacientes/37 clínicas incubados durante cinco días y para los que se sabe si los embriones se desarrollaron o no hasta la etapa de blastocisto en 120 horas. En efecto, esto corresponde al uso de lo que podría denominarse "datos de blastocisto conocidos" en lugar de "datos de implantación conocidos" utilizados para algunos de los otros resultados descritos en el presente documento para establecer la capacidad del modelo para establecer un indicador del potencial de desarrollo.

El conjunto de datos de 10.316 embriones fue completamente independiente del conjunto de datos en el que se desarrolló el modelo de la figura 6. Este conjunto de datos de 10.316 embriones contenía información cinética de los parámetros de desarrollo relevantes anotados de acuerdo con las directrices propuestas en el documento "Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group" de Ciray *et al.* - Hum. reprod. 2014; 29; 2650-2660 [1]. La información cinética hasta el día tres después de la fecundación se utilizó para puntuar los embriones de acuerdo con el algoritmo representado por la figura 6, asignando de este modo cada embrión a uno de los grupos de puntuación (1, 2, 3, 4 o 5).

El número de embriones a los que se asignó la puntuación 1 fue 2024 (de los que 1911 fueron fecundados por FIV tradicional; 93 fueron fecundados por IICE; y el método de fecundación para 20 era desconocido). El número de embriones a los que se asignó la puntuación 2 fue 1443 (de los que 1281 fueron fecundados por FIV tradicional; 143 fueron fecundados por IICE; y el método de fecundación para 19 era desconocido). El número de embriones a los que se asignó la puntuación 3 fue 656 (de los que 629 fueron fecundados por FIV tradicional; 16 fueron fecundados por IICE; y el método de fecundación para 11 era desconocido). El número de embriones a los que se asignó la puntuación 4 fue 1734 (de los que 1546 fueron fecundados por FIV tradicional; 147 fueron fecundados por IICE; y el método de fecundación para 41 era desconocido). El número de embriones a los que se asignó la puntuación 5 fue 4459 (de los que 3991 fueron fecundados por FIV tradicional; 417 fueron fecundados por IICE; y el método de fecundación para 51 era desconocido). Por tanto, para el total de 10.316 embriones, 9.358 fueron fecundados por FIV tradicional; 816 fueron fecundados por IICE; y el método de fecundación para 142 era desconocido.

Para evaluar la capacidad del algoritmo modelo como herramienta de predicción de blastocistos, se determinó la proporción de los embriones que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto (formación de blastocisto) 120 horas después de la fecundación para cada uno de los cinco grupos de puntuación. Los resultados de esto se presentan en la figura 18. Esto muestra claramente una proporción creciente de embriones asociados con cada puntuación desarrollados hasta la etapa de blastocisto con puntuación creciente (por ejemplo, más de 60 % de los embriones asociados con puntuación 5 se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto en comparación con aproximadamente 10 % de los embriones asociados con puntuación 1 que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto). Esto demuestra adicionalmente la capacidad de los métodos descritos anteriormente para establecer un indicador de un potencial de desarrollo embrionario (en este caso, la probabilidad de desarrollarse hasta la etapa de blastocisto).

Para evaluar las diferencias en la fracción de embriones que formaron blastocistos entre los grupos de puntuación a los que se asignaron, se realizó una regresión generalizada de efectos mixtos lineales (RGEML, con una distribución de errores de Bernoulli) con respecto a la probabilidad de formación de blastocistos para los diferentes grupos de puntuación, método de fecundación (IICE o FIV) e incubaciones de nivel de oxígeno (reducido o ambiental) como variables explicativas (efectos fijos). Todos los términos de interacción entre el grupo de puntuación, método de fecundación y nivel de oxígeno se incluyeron para verificar si las fracciones de formación de blastocistos en los grupos

5 de puntuación estaban influidas por estas características de incubación. Para tener en cuenta la variabilidad de pacientes y clínicas, esta información se incluyó como una intersección aleatoria, en la que los pacientes se alojaron en clínicas. Se utilizó eliminación hacia atrás por etapas para reducción del modelo, comenzando con el modelo completo, incluyendo todas las interacciones de los parámetros. Se usó un criterio de inclusión de  $p < 0,01$  en el procedimiento de eliminación. El modelo final incluyó los principales efectos de la puntuación y el método de fecundación (IICE/FIV).

10 Este análisis demostró 1) una diferencia significativa en la probabilidad de formación de blastocistos entre los grupos de puntuación, estando una puntuación creciente asociada a una mayor probabilidad de formación de blastocistos y 2) la proporción de blastocistos para la FIV fue mayor que para IICE. Esto ilustra que el principal descrito en el presente documento se puede utilizar en función de la información disponible hasta el día tres después de la fecundación para predecir la probabilidad de formación de blastocistos. Ya que no se encontró que ninguno de los términos de interacción fuera significativo, se puede concluir que el patrón general de las proporciones de blastocistos en los grupos de puntuación es el mismo entre FIV e IICE. El hecho de que la proporción de blastocistos fuera mayor en FIV que en IICE puede explicarse por la práctica clínica general de que IICE se usa especialmente para los casos más difíciles.

15 Se establecen aspectos particulares y preferidos adicionales de la presente invención en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Se apreciará que las características de las reivindicaciones dependientes se pueden combinar con características de las reivindicaciones independientes en combinaciones distintas de las expuestas de manera explícita en las reivindicaciones.

#### Referencias

25 [1] Ciray *et al.*, "Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group", Hum. reprod. 2014; 29; 2650-2660.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método implementado por ordenador para clasificar embriones de FIV para predecir su potencial de desarrollo después de la transferencia; comprendiendo el método:

5 obtener valores para una pluralidad de características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones durante un periodo de observación;  
determinar para los embriones respectivos una medida de si el embrión ha experimentado o no un acontecimiento de división directa y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa; y  
10 para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa, determinar si una medida de la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión supera o no una duración umbral predefinida y clasificar los embriones para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida con una clasificación que indica un menor potencial de desarrollo que para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida; y  
15 para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida, determinar si una medida de una duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está o no fuera de un intervalo predefinido y clasificar los embriones para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones para los que la duración relativa no está fuera del intervalo predefinido.

25 2. El método según la reivindicación 1, en donde determinar una medida de si un embrión ha experimentado un acontecimiento de división directa comprende determinar si un primer parámetro asociado con el desarrollo del embrión es menor que una primera cantidad umbral y, si es así, determinar que el embrión ha experimentado un acontecimiento de división directa.

30 3. El método según la reivindicación 2, en donde:

(i) el primer parámetro es una medida del periodo de tiempo entre el desvanecimiento de los pronúcleos, tPnF, y el tiempo de división hasta 3 células, t3, y en donde la primera cantidad umbral se selecciona del grupo que comprende: 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas y 14 horas; o  
35 (ii) el primer parámetro es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 3 células, t3, y la primera cantidad umbral se selecciona del grupo que comprende: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas y 11 horas; o  
(iii) el primer parámetro es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 4 células, t4, y el tiempo de división hasta 5 células, t5, y en donde la primera cantidad umbral se selecciona del grupo que  
40 comprende: 0,1 horas, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas y 11 horas; o  
(iv) el primer parámetro es una medida de una relación de un tiempo de división hasta 3 células, t3, con respecto a un momento de división a 4 células, t4, y en donde la primera cantidad umbral se selecciona del grupo que comprende: 0,9, 0,8, 0,7 y 0,6.

45 4. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde determinar si una medida de la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión supera o no una duración umbral predefinida comprende:

(i) determinar si una medida de un tiempo de división hasta 2 células, t2, supera un tiempo seleccionado del grupo que comprende: 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas y 35 horas; o  
50 (ii) determinar si una medida de un tiempo de división hasta 3 células, t3, supera un tiempo seleccionado del grupo que comprende: 38 horas, 39 horas, 40 horas, 41 horas, 42 horas, 43 horas, 44 horas, 45 horas, 46 horas, 47 horas y 48 horas; o  
(iii) determinar si una medida de un tiempo de división hasta 4 células, t4, supera un tiempo seleccionado del grupo que comprende: 41 horas, 42 horas, 43 horas, 44 horas, 45 horas, 46 horas, 47 horas, 48 horas, 49 horas y 50  
55 horas; o  
(iv) determinar si una medida de un tiempo de división hasta 5 células, t5, supera un tiempo seleccionado del grupo que comprende: 55 horas, 56 horas, 57 horas, 58 horas, 59 horas, 60 horas, 61 horas, 62 horas y 63 horas.

60 5. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde al determinar si una medida de la duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está fuera de un intervalo predefinido,

(i) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el momento de división hasta 3 células, t3, y el tiempo de división hasta 5 células, t5, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 5 células,

## ES 2 799 887 T3

t5, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t5-t3)/(t5-t2)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: 0,1 a 0,9, 0,2 a 0,8, 0,3 a 0,7, 0,4 a 0,6 y 0,5 a 0,6;

o

5 (ii) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 3 células, t3, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 5 células, t5, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t3-t2)/(t5-t2)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: 0,1 a 0,9, 0,1 a 0,8, 0,2 a 0,7, 0,3 a 0,6 o 0,4 a 0,5;

o

10 (iii) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 3 células, t3, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 3 células, t3, y el tiempo de división hasta 5 células, t5, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t3-t2)/(t5-t3)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: 0,05 a 10, 0,1 a 9, 0,15 a 8, 0,2 a 7, 0,25 a 6, 0,3 a 7, 0,35 a 6, 0,4 a 5, 0,45 a 4, 0,5 a 3, 0,6 a 2 y 0,75 a 1;

o

15 (iv) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 3 células, t3, y el tiempo de división hasta 5 células, t5, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del tiempo de división hasta 5 células, t5, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t5-t3)/t5$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: más de 0,1, más de 0,2 y más de 0,3;

o

20 (v) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 3 células, t3, y el tiempo de división hasta 4 células, t4, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 3 células, t3, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t4-t3)/(t3-t2)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: menos de 0,1, menos de 0,2, menos de 0,3, menos de 0,4 y menos de 0,5;

o

25 (vi) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 5 células, t5, y el tiempo de división hasta 8 células, t8, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 3 células, t3, y el tiempo de división hasta 5 células, t5, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t8-t5)/(t5-t3)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: menos de 0,1, menos de 0,15 y menos de 0,2;

o

30 (vii) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida de los periodos de tiempo combinados entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 3 células, t3, y entre el tiempo de división hasta 4 células, t4, y el tiempo de división hasta 5 células, t5, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 4 células, t4, y el tiempo de división hasta 8 células, t8, de modo que la duración relativa es una medida de  $((t3-t2)+(t5-t4))/(t8-t4)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: más de 0,3, más de 0,4, más de 0,5, más de 0,6, más de 0,7 y más de 0,8;

o

35 (viii) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 5 células, t5, y el tiempo de división hasta 8 células, t8, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 4 células, t4, y el tiempo de división hasta 8 células, t8, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t8-t5)/(t8-t4)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: más de 0,3, más de 0,4, más de 0,5, más de 0,6, más de 0,7, más de 0,8, más de 0,9 y más de 0,97;

o

40 (ix) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el desvanecimiento de los pronúcleos, tPNf, y el tiempo de división hasta 3 células, t3, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el desvanecimiento de los pronúcleos, tPNf, y el tiempo de división hasta 4 células, t4, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t3-tPNf)/(t4-tPNf)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: más de 0,35, más de 0,45, más de 0,55, más de 0,65, más de 0,75, más de 0,85 y más de 0,95;

o

45 (x) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 3 células, t3, y el tiempo de división hasta 4 células, t4, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 4 células, t4, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t4-t3)/(t4-t2)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: menos de 0,3, menos de 0,4, menos de 0,5, menos de 0,6 y menos de 0,7;

o

50 (xi) la primera etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 5 células, t5, y el tiempo de división hasta 8 células, t8, y la segunda etapa de desarrollo predefinida es una medida del periodo de tiempo entre el tiempo de división hasta 2 células, t2, y el tiempo de división hasta 8 células, t8, de modo que la duración relativa es una medida de  $(t8-t5)/(t8-t2)$ , y en donde el intervalo predefinido se selecciona del grupo que comprende: menos de 0,2, menos de 0,3, menos de 0,4, menos de 0,5 y menos de 0,6.

55

60

65

6. El método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además:  
para los embriones para los que la duración relativa de la primera etapa de desarrollo predefinida con respecto a la segunda etapa de desarrollo predefinida está fuera de un intervalo predefinido, determinar si la duración relativa está por encima o por debajo del intervalo predefinido; y clasificar los embriones para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido a un lado del intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido al otro lado del intervalo predefinido.
7. El método según cualquier reivindicación anterior, que comprende, además  
para los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa, determinar si una medida de la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión supera o no una duración umbral predefinida y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa y para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida con una clasificación que indica un menor potencial de desarrollo que para los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa y para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida.
8. El método según cualquier reivindicación anterior, que comprende, además  
para los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa, determinar si una medida de una duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está o no fuera de un intervalo predefinido y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado una división directa y para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa y para los que la duración relativa no está fuera del intervalo predefinido.
9. El método según cualquier reivindicación anterior, que comprende, además  
para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa y para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida, determinar si una medida de una duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está fuera de un intervalo predefinido y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado una división directa y para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida y para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa y para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida y para los que la duración relativa no está fuera del intervalo predefinido.
10. El método según cualquier reivindicación anterior, en donde,  
para los embriones para los que se ha determinado que la duración relativa de la primera etapa de desarrollo predefinida con respecto a la segunda etapa de desarrollo predefinida está dentro del intervalo predefinido, determinar si los embriones respectivos se han desarrollado o no hasta un número predefinido de células dentro de un tiempo predefinido y clasificar los embriones que no se han desarrollado hasta el número predefinido de células en el tiempo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que se ha determinado que se han desarrollado hasta el número predefinido de células en el tiempo predefinido.
11. El método según cualquier reivindicación 10, en donde el número predefinido de células es ocho células y el tiempo predefinido se selecciona del grupo que comprende: 64 horas, 65 horas, 66 horas, 67 horas, 68 horas, 69 horas, 70 horas, 71 horas y 72 horas.
12. El método según cualquier reivindicación anterior, que comprende además emitir una indicación que representa las clasificaciones para al menos algunos de los embriones entre sí.
13. Un aparato (2) para clasificar embriones de FIV para predecir su potencial de desarrollo después de la transferencia, comprendiendo el aparato:  
un elemento (6) de aporte de datos configurado para obtener valores para una pluralidad de características relacionadas con el desarrollo morfológico de los embriones durante un periodo de observación; y  
un elemento procesador (4) configurado para:  
determinar para los embriones respectivos una medida de si el embrión ha experimentado o no un acontecimiento de división directa y clasificar los embriones que se ha determinado que han experimentado un acontecimiento de división directa con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa; y  
para los embriones que no se ha determinado que hayan experimentado un acontecimiento de división directa, determinar si una medida de la duración de una etapa de desarrollo predefinida para el embrión supera o no

una duración umbral predefinida y clasificar los embriones para los que se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida con una clasificación que indica un menor potencial de desarrollo que para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida; y

5 para los embriones para los que no se determina que la duración de la etapa de desarrollo predefinida supera la duración umbral predefinida, determinar si una medida de una duración relativa de una primera etapa de desarrollo predefinida para el embrión con respecto a una segunda etapa de desarrollo predefinida para el embrión está o no fuera de un intervalo predefinido y clasificar los embriones para los que la duración relativa está fuera del intervalo predefinido con una clasificación que indica un potencial de desarrollo menor que para  
10 los embriones para los que la duración relativa no está fuera del intervalo predefinido.

14. Un producto de programa informático no transitorio que contiene instrucciones legibles por máquina que, cuando se implementa en un ordenador, provoca que el ordenador lleve a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15 Un aparato (4) cargado con y operativo para ejecutar instrucciones legibles por máquina para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

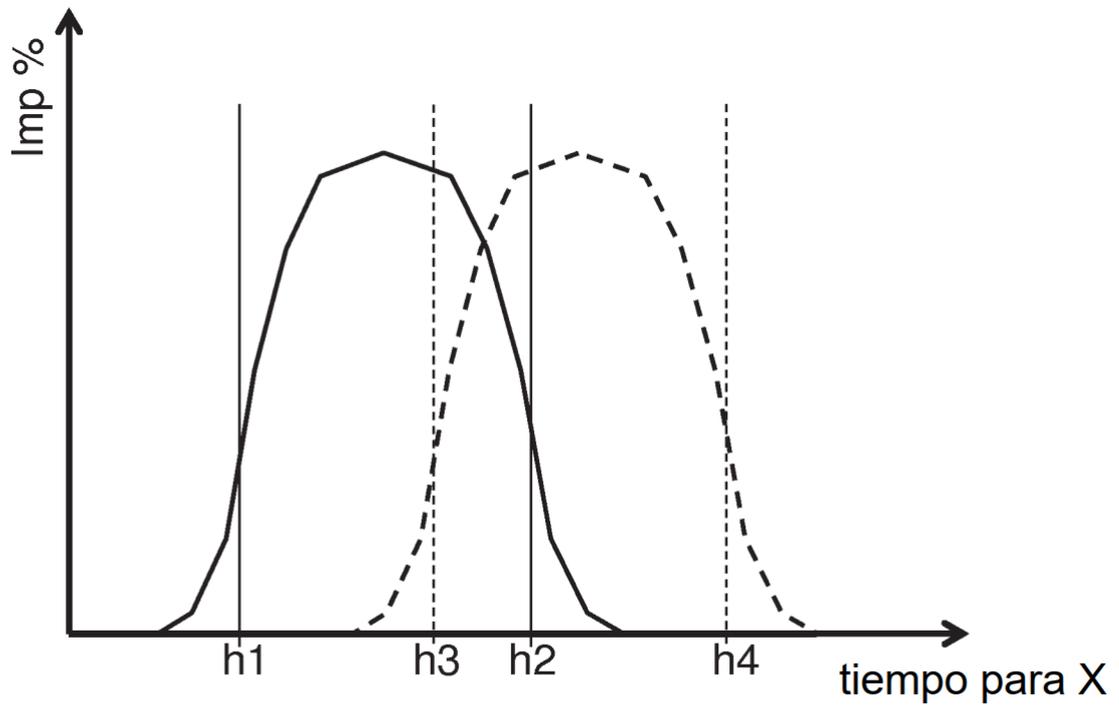


Fig. 1

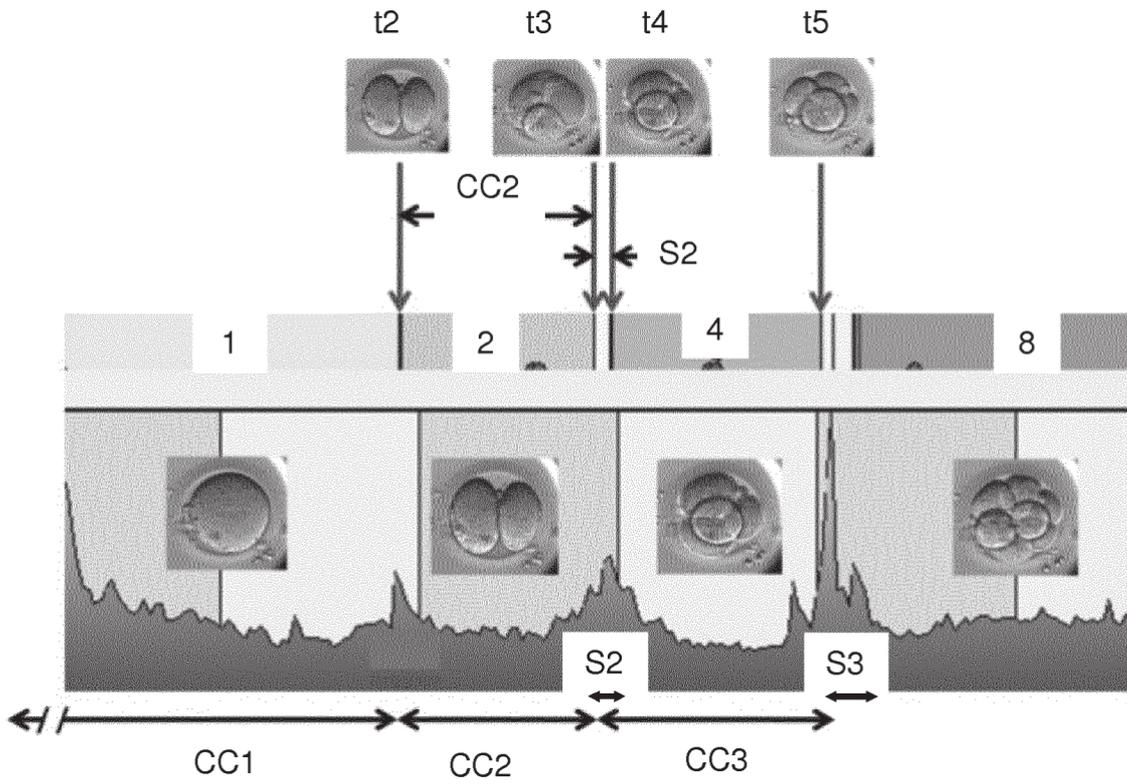


Fig. 2

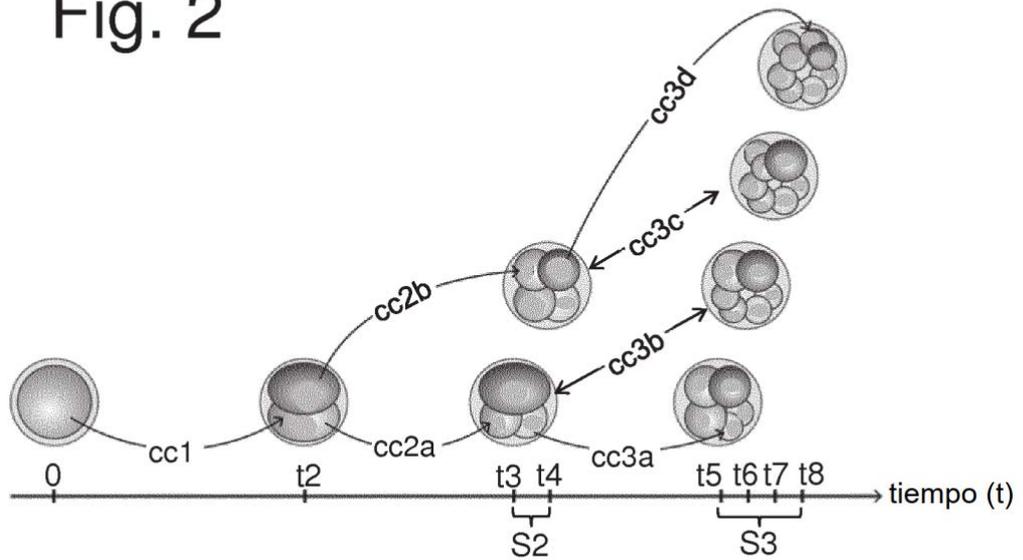


Fig. 3

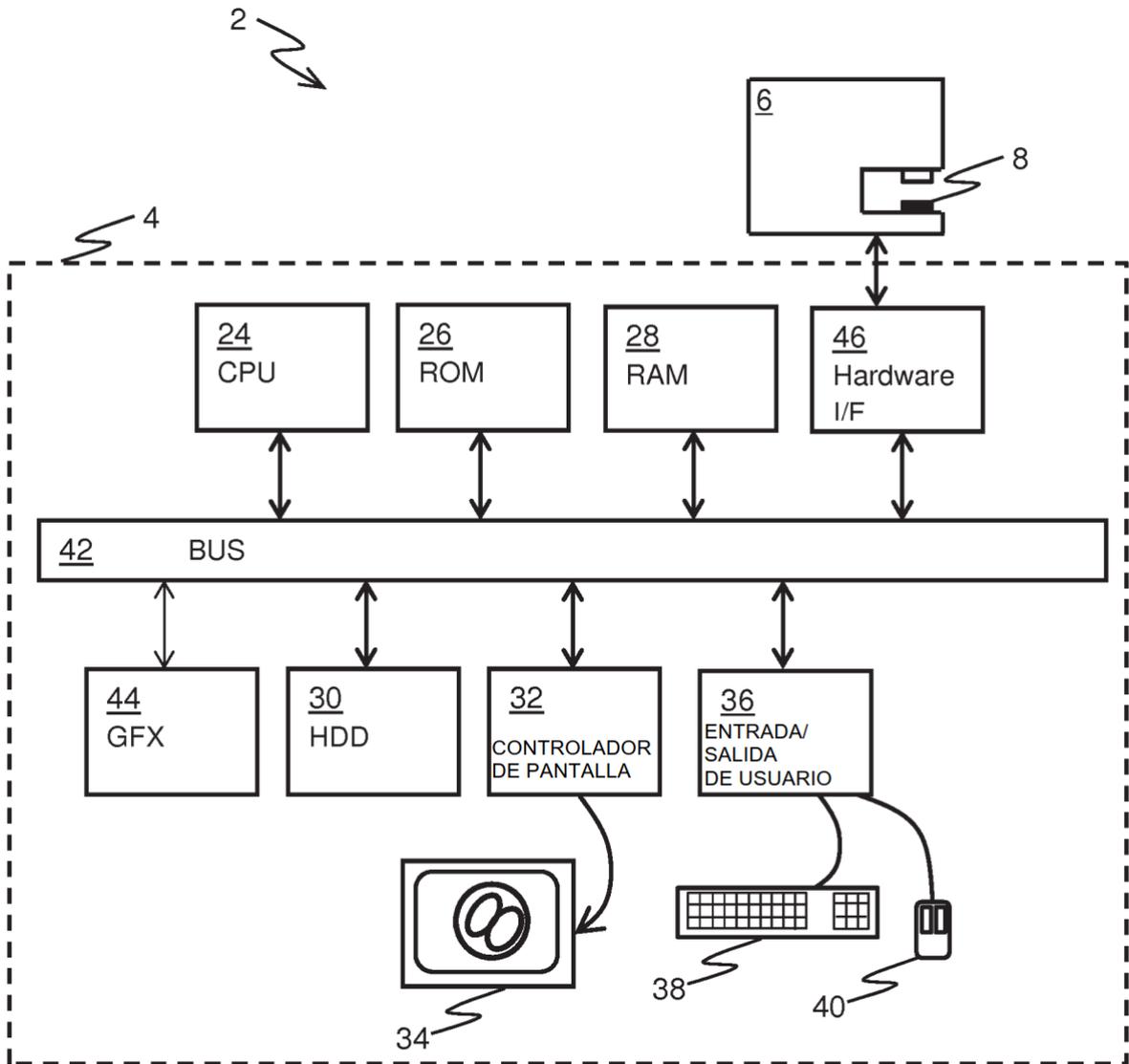


Fig. 4

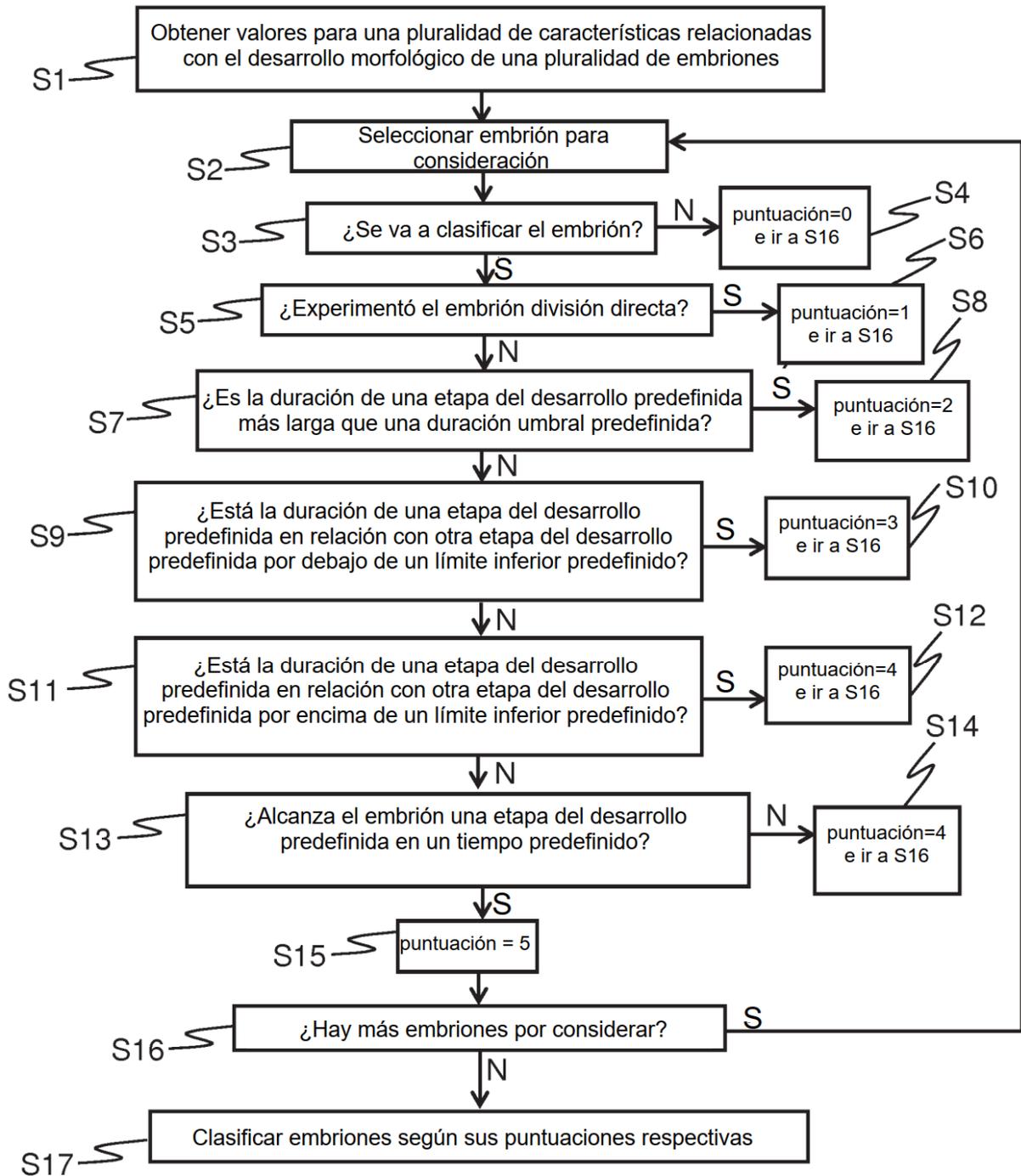


Fig. 5

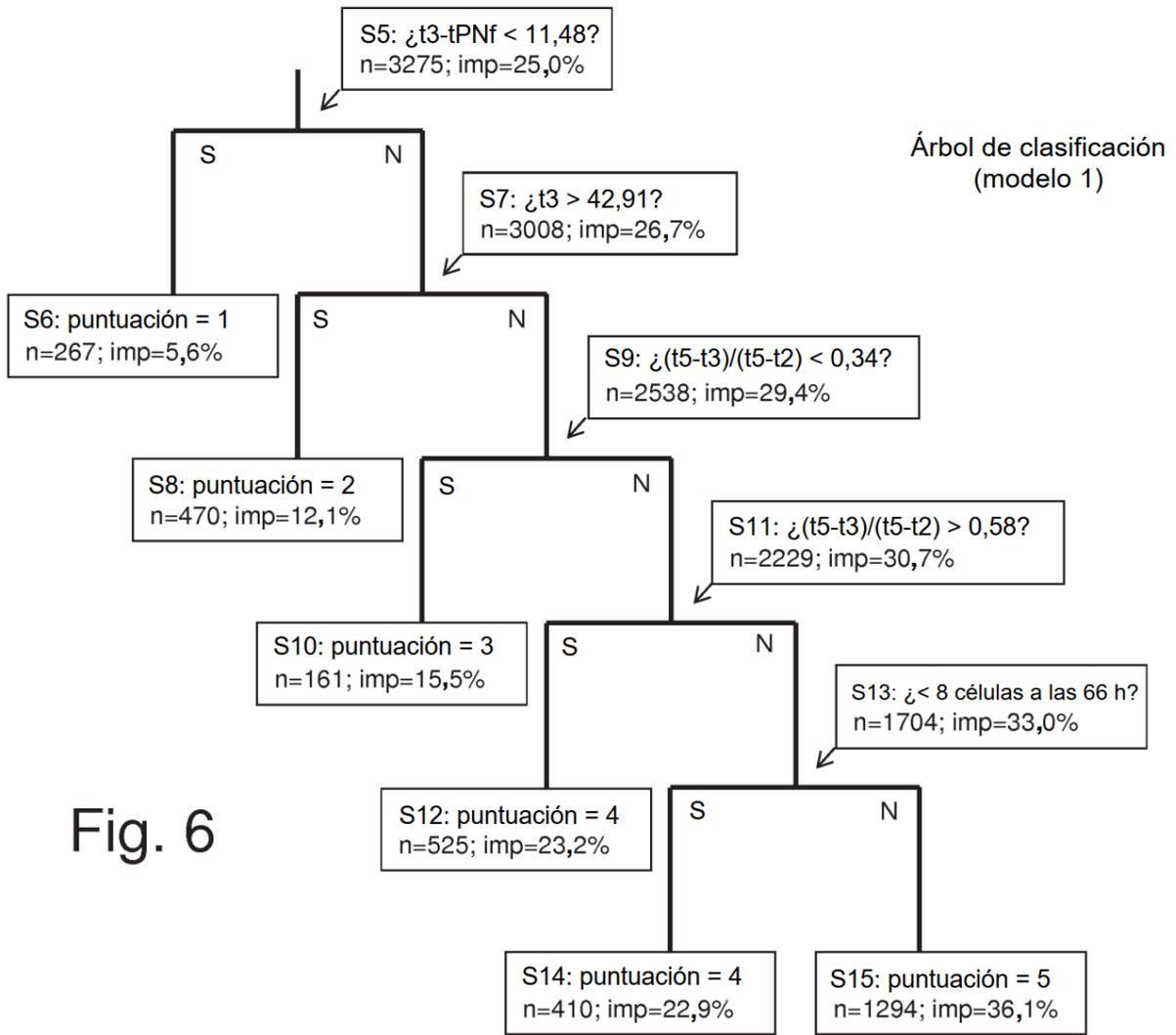
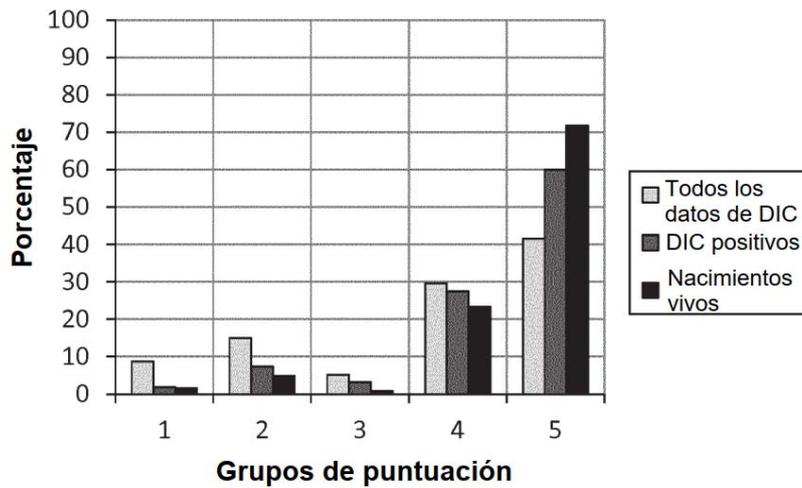


Fig. 6

Fig. 7



Árbol de clasificación  
(modelo 2)

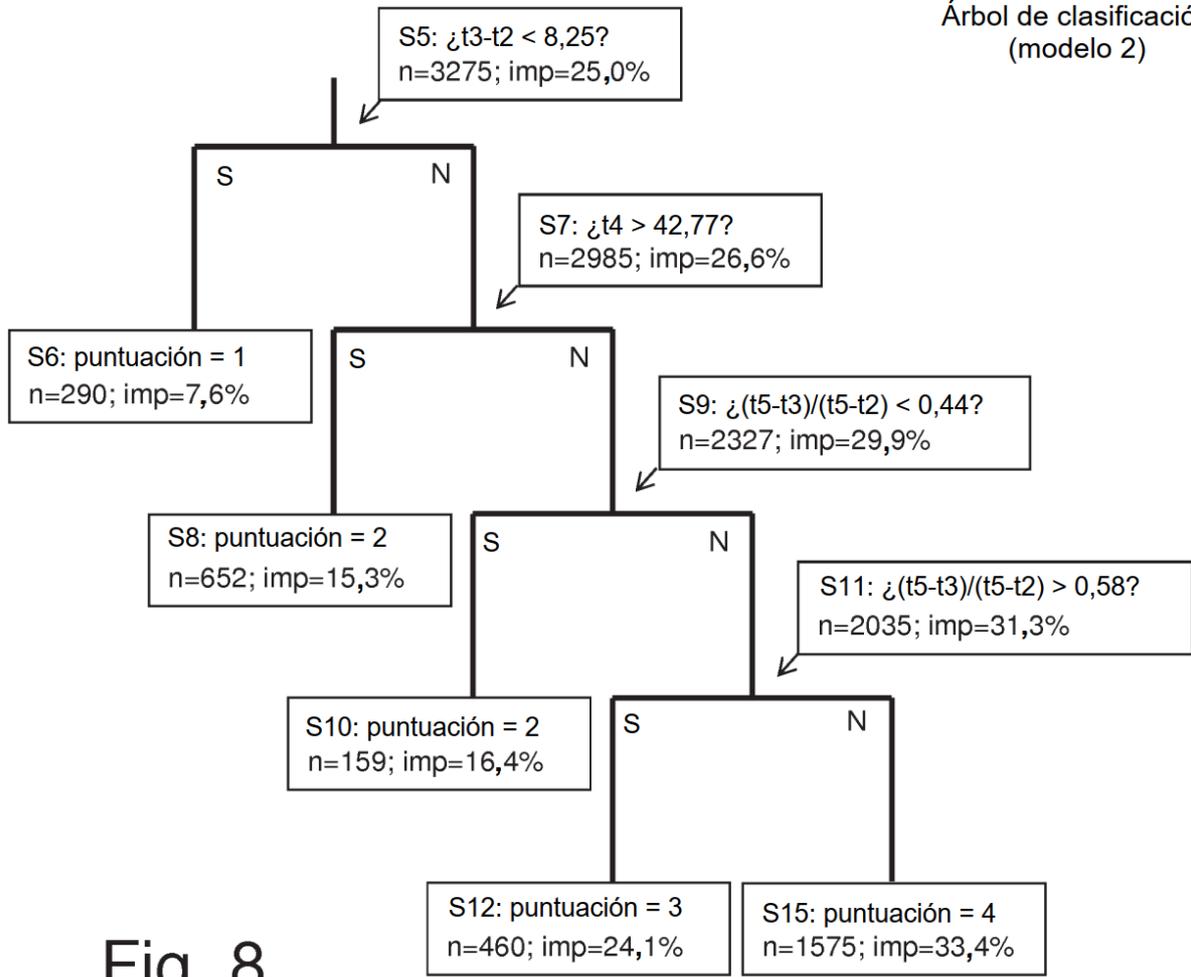


Fig. 8

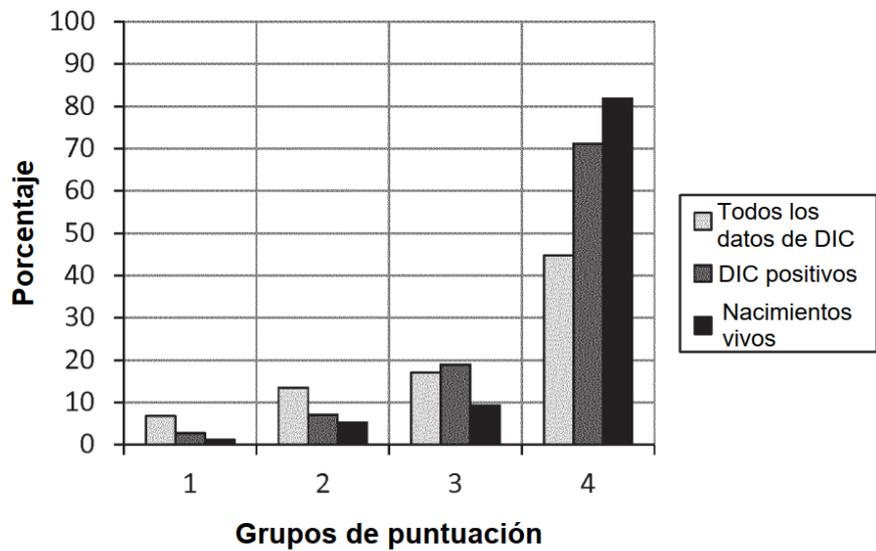


Fig. 9

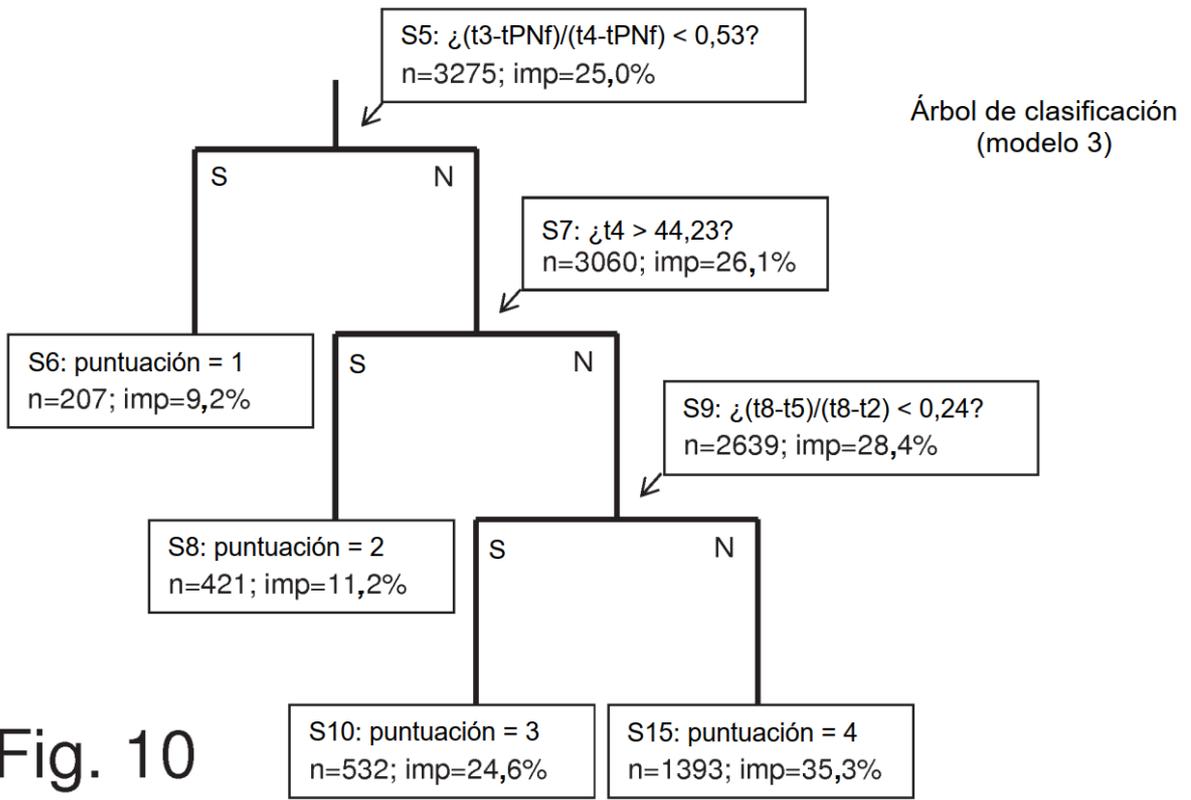


Fig. 10

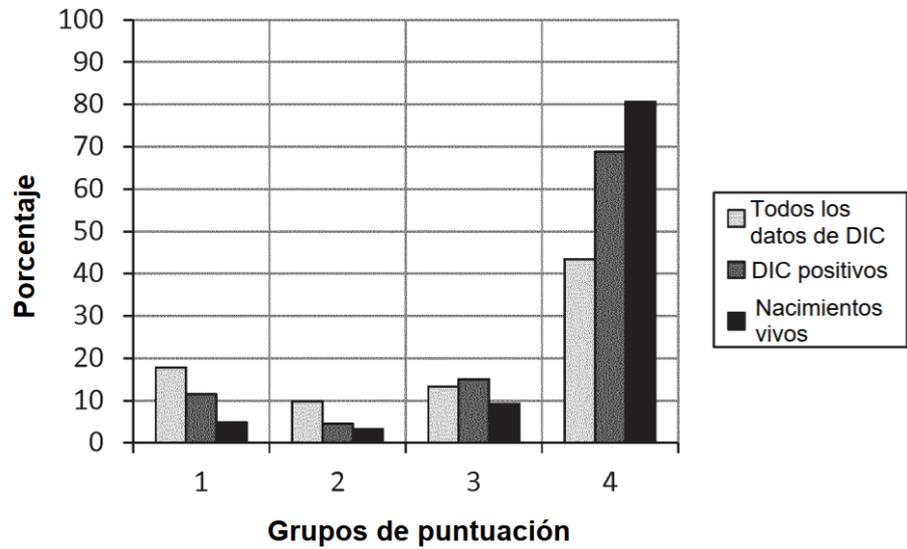


Fig. 11

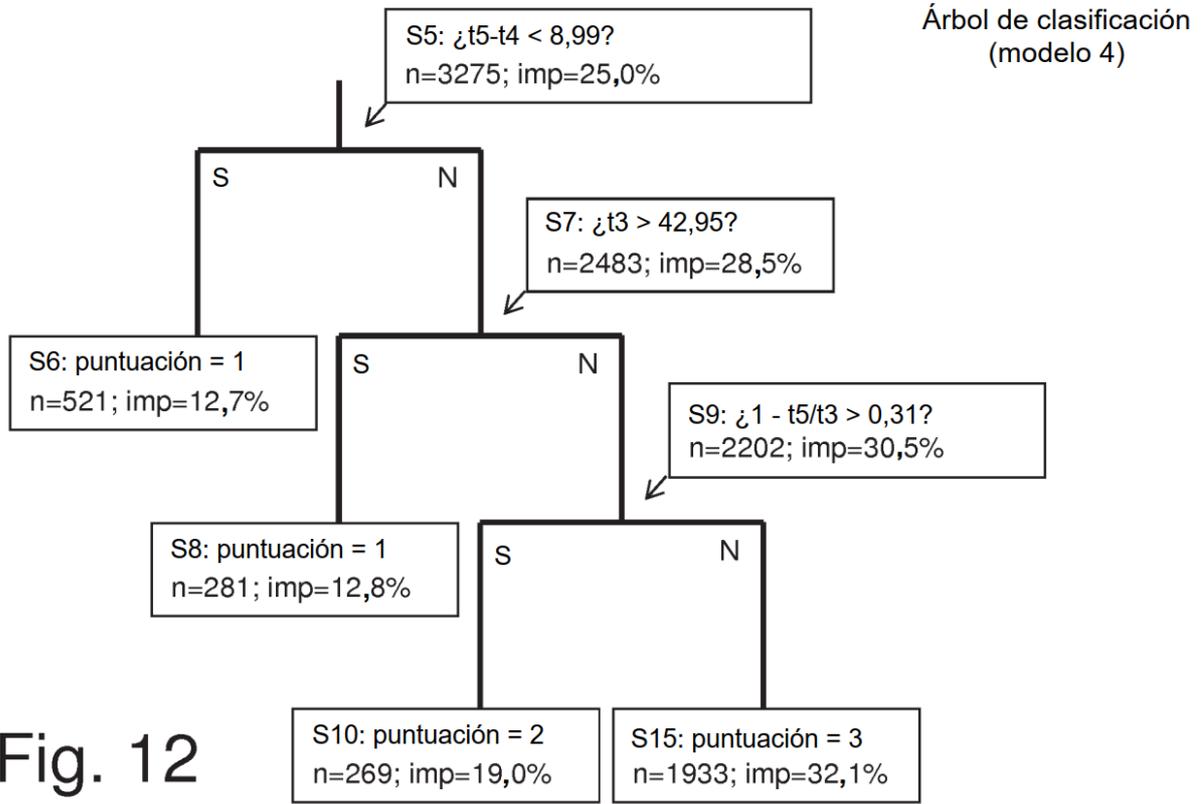


Fig. 12

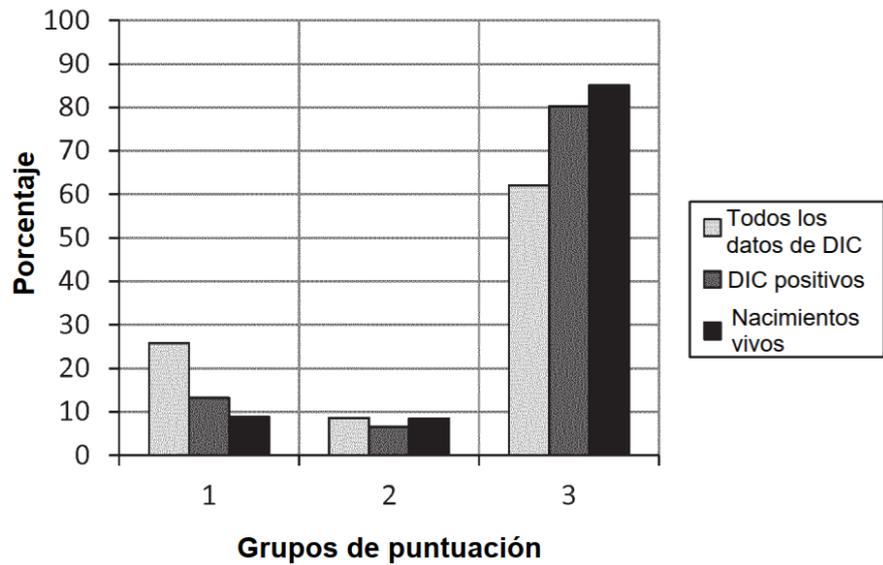


Fig. 13

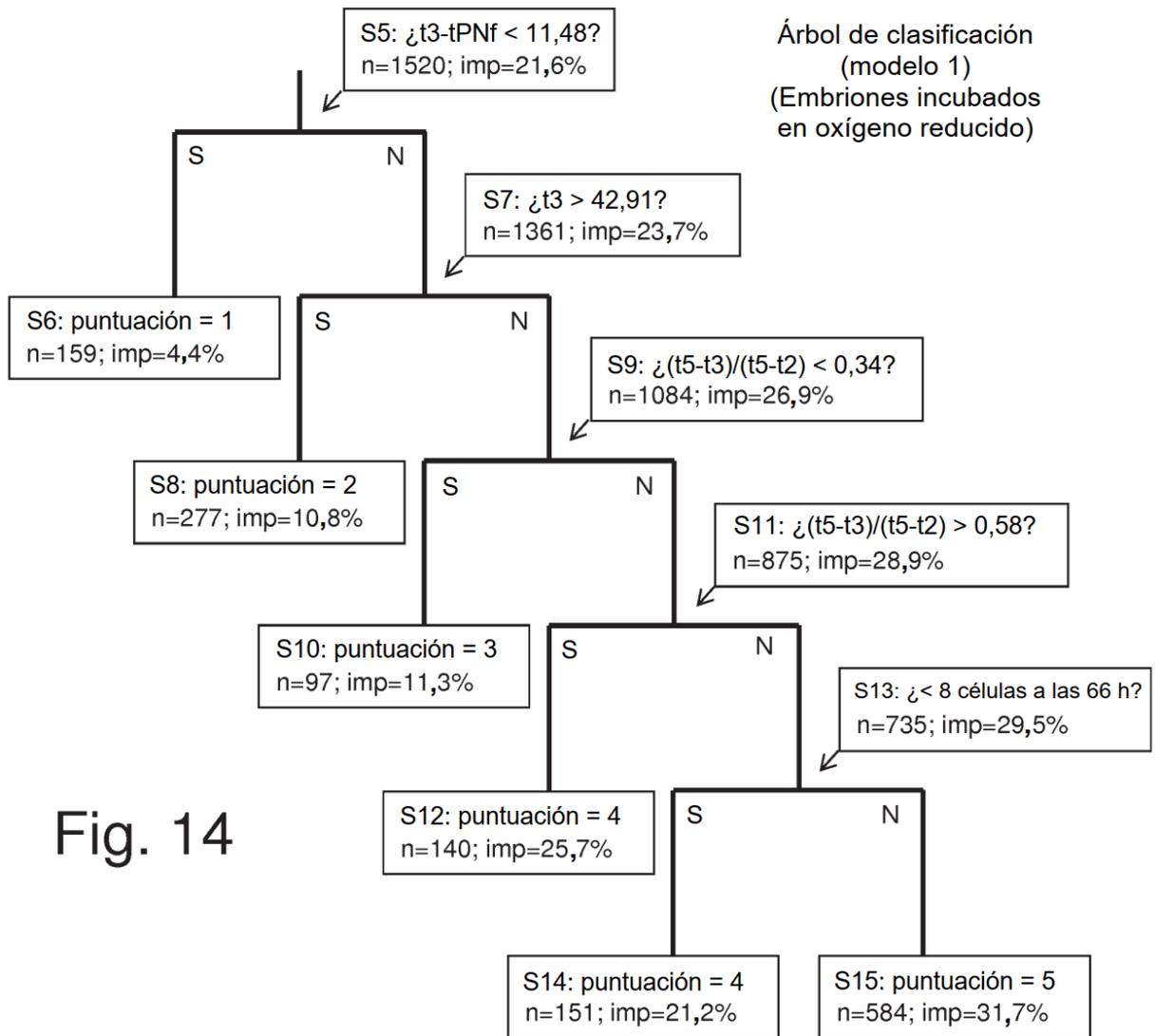


Fig. 14

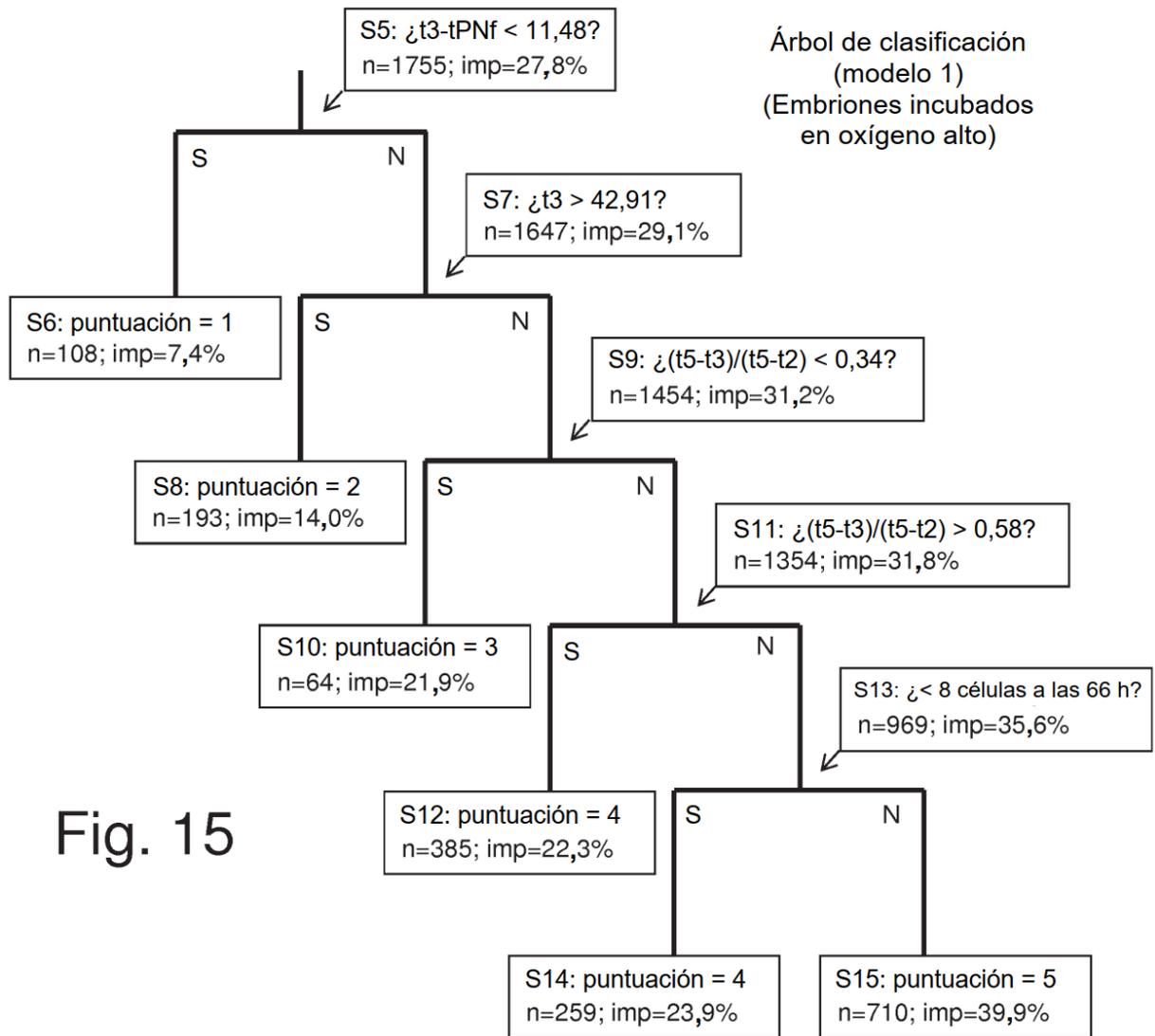


Fig. 15

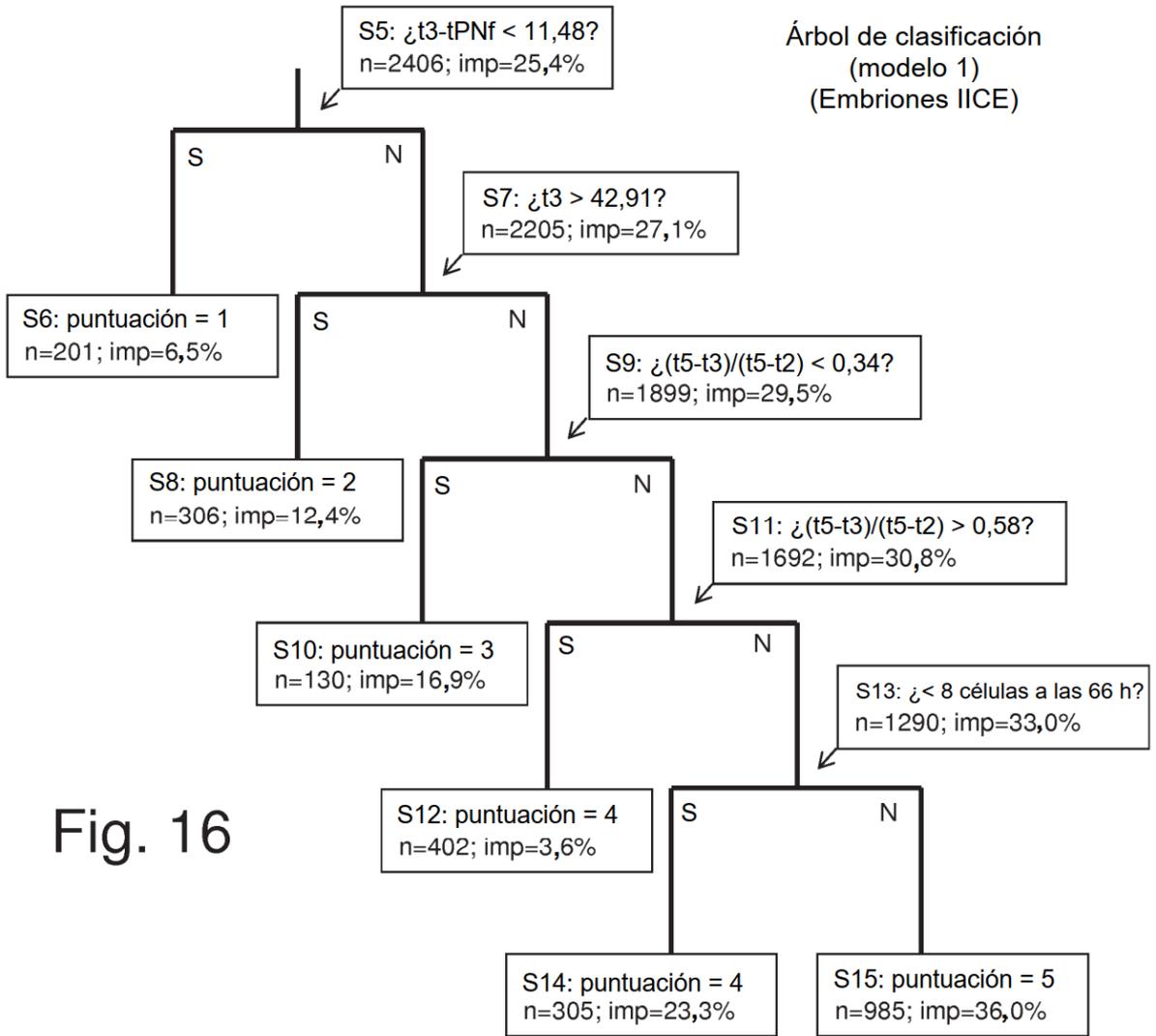


Fig. 16

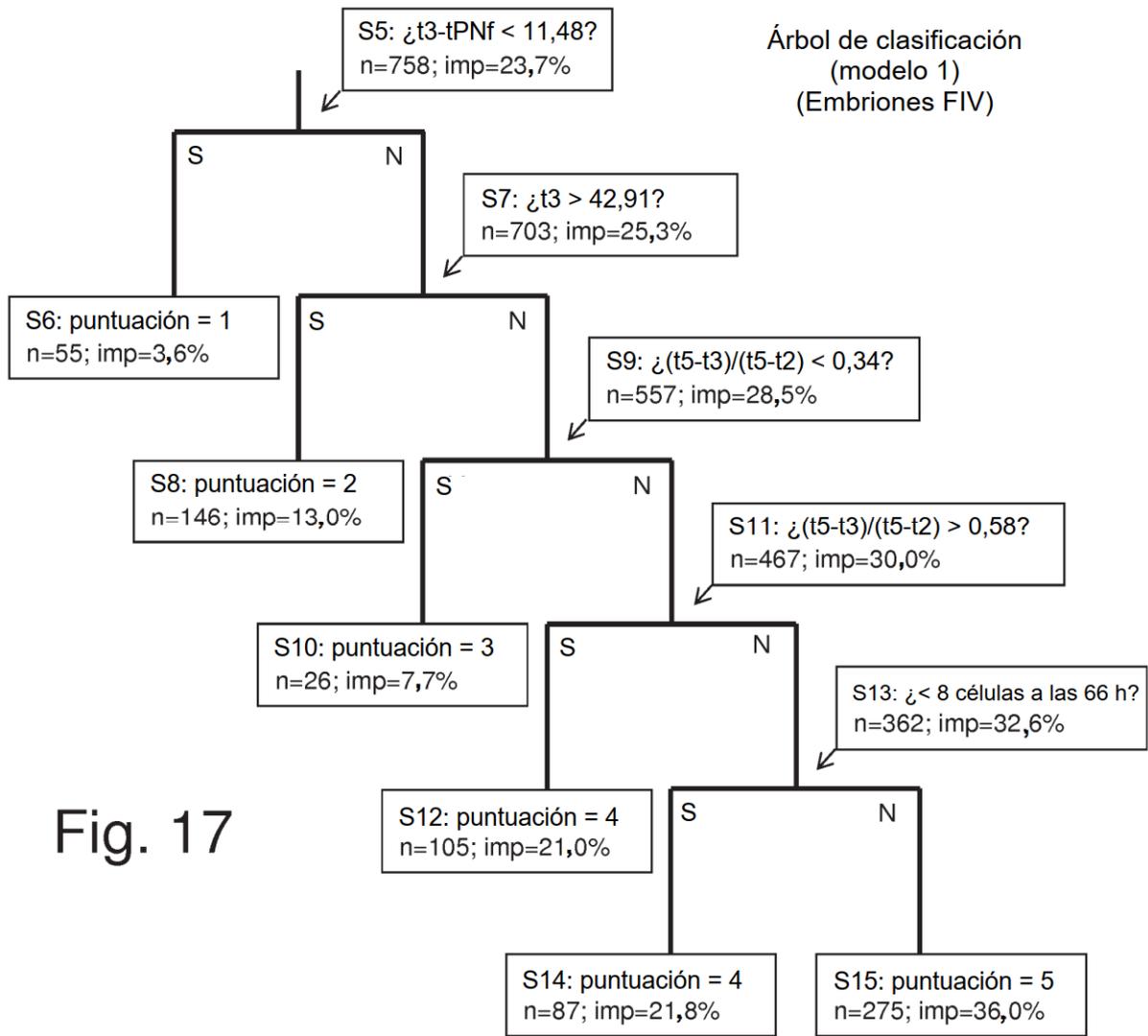


Fig. 17

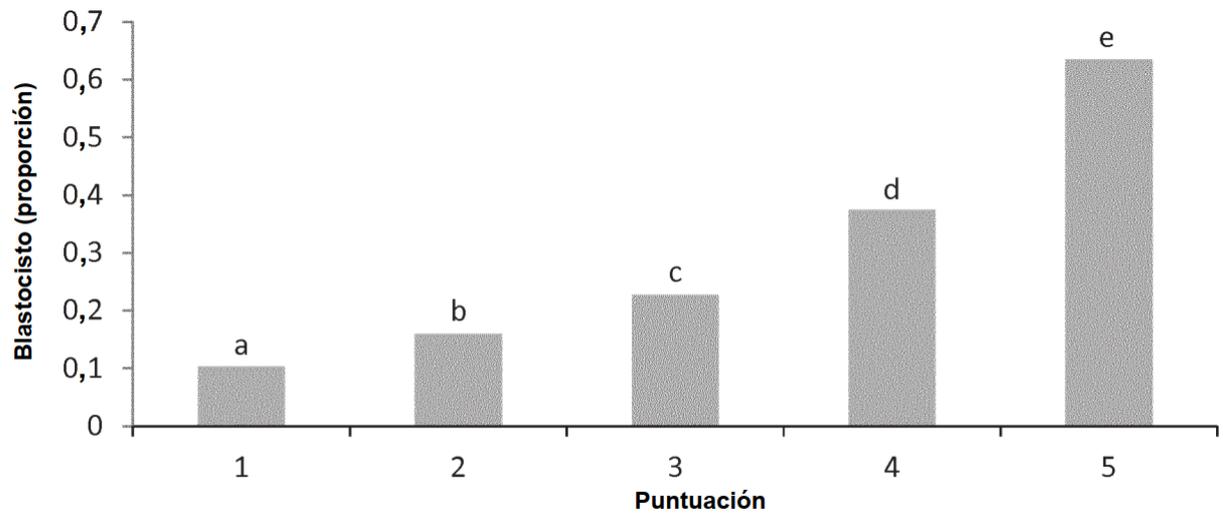


Fig. 18