

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 144**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10721965 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2434873**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la conservación de núcleos celulares**

30 Prioridad:

25.05.2009 DE 102009022580

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.11.2013

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)
Hansastraße 27c
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**FUHR, GÜNTER R. y
ZIMMERMANN, HEIKO**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 429 144 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

Procedimiento y dispositivo para la conservación de núcleos celulares

La invención se refiere a un procedimiento para la conservación de núcleos celulares de células biológicas, particularmente para la criopreservación de núcleos celulares y dado el caso de otros componentes celulares tales como, por ejemplo, orgánulos celulares y/o citoplasma, o de células biológicas desnucleadas. La invención se refiere además a un dispositivo el cual está configurado para la puesta en práctica de dicho procedimiento y particularmente para la conservación de núcleos celulares de células biológicas y dado el caso de otros componentes celulares o células biológicas desnucleadas. La invención se refiere también a un procedimiento para la regeneración o recuperación de células biológicas. Las aplicaciones de la invención se demuestran particularmente en la conservación y almacenamiento de materiales biológicos.

La criopreservación de materiales biológicos, particularmente de tejidos, grupos celulares, células o componentes celulares, es una técnica conocida desde hace decenas de años con numerosas aplicaciones en medicina, biología, biotecnología, agricultura, industria alimentaria e ingeniería ambiental (véanse, por ejemplo, las patentes US 3.648.475 A y US 2002/0177119 A1). Aunque las células biológicas pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo en estado congelado, por ejemplo años o decenas de años, y después de su descongelación recobrar toda su vitalidad, se han demostrado en la práctica índices de vitalidad limitados. El índice de vitalidad, es decir la proporción de células viables después de la descongelación, depende de la especie biológica y del tipo celular y puede ascender a menos de un 1% (por ejemplo, en huevos de insecto, ovocitos de mamíferos, peces o reptiles) o hasta a un 95% o más (por ejemplo, en células grasas de mamíferos). Una serie de tipos celulares son inadecuados para la criopreservación convencional, ya que no pueden congelarse y revitalizarse. En las células animales, esto se aplica especialmente a ovocitos, mientras que las células vegetales frecuentemente no pueden congelarse manteniendo la vitalidad a causa de las vacuolas en las células. Se comprueba que existen problemas particularmente en la protección de especies, ya que para la mayoría de especies es posible una criopreservación de esperma, pero no de ovocitos. Z. He y col. ("Fertility and Sterility" vol. 79, 2003, pág. 347 y siguientes) describen la criopreservación de material nuclear de ovocitos, en la cual se aíslan cuerpos polares y pronúcleos, se transfieren en grupos a una zona pelúcida y se congelan en esta. Este procedimiento está limitado a la criopreservación de material nuclear de ovocitos y es desventajoso debido a la compleja preparación del material celular.

Para compensar la pérdida de células las cuales ya no son viables después de la descongelación, se congelan en la práctica cuantas más células mejor de la muestra para conservar, por ejemplo millones de células o más. Con el número creciente de células, crece sin embargo el tamaño de la criomuestra y por tanto el gasto de la criopreservación y el espacio necesario en el almacenamiento. También es desventajoso que en tareas de conservación especiales, tales como por ejemplo en la criopreservación de citoblastos adultos o de óvulos esenciales o productos de fusión tales como, por ejemplo, células de hibridoma, estén a disposición solo bajos números de células.

Otro problema conocido en la práctica de la criopreservación convencional consiste en la dependencia del índice de vitalidad de las condiciones de congelación y posterior descongelación de las células. Cuantas más subetapas se recorran en la congelación o descongelación y/o cuantos más agentes crioprotectores se utilicen, mayor es el estrés para las células en la criopreservación. Ya que el índice de vitalidad se reduce al crecer el estrés celular, existe hasta ahora la tendencia, particularmente en la congelación, de realizar cuantas menos subetapas en el tiempo más corto posible. Así, se ha propuesto impedir la creación de cristales de hielo en el material celular mediante una congelación prácticamente instantánea (vitrificación) y por tanto minimizar el estrés celular. Sin embargo, es desventajoso que hasta ahora se hayan realizado en la práctica enfoques exitosos para la elevación del índice de vitalidad específicamente sólo de tipos celulares o clases de muestra determinados, pero en general no fueran aplicables con la reproducibilidad deseada.

Se ha propuesto además reprimir la creación de cristales de hielo añadiendo a la muestra al menos un agente crioprotector (crioprotector), tal como por ejemplo DMSO, glicerina o trehalosa. El crioprotector influye en la estructura de la creación de hielo dentro y fuera de las células. Sin embargo, es desventajoso que los crioprotectores utilizados hasta ahora puedan influir desventajosamente en las células e índice de vitalidad, ya que se añaden en concentraciones altas no fisiológicas (por ejemplo, de 5 a 40%).

Otra desventaja de los crioprotectores convencionales consiste en que estos tienen una capacidad limitada de atravesar las membranas celulares (permeabilidad por membrana limitada). Ya que para la eficacia de los crioprotectores en la criopreservación convencional es esencial que estos puedan difundirse pasivamente en las células (por ejemplo DMSO), las sustancias con permeabilidad por membrana limitada son inadecuadas hasta ahora como crioprotectores.

Es conocido por ejemplo por la patente US 2005/0277107 A1 alimentar crioprotectores para la criopreservación de células biológicas a través de su membrana celular, para deshidratar las células y congelar las células en estado deshidratado. La aplicación de este procedimiento está sujeta en la práctica a limitaciones, ya que la alimentación de crioprotectores debe realizarse tan cuidadosamente para que las células vuelvan a ser viables después de la descongelación, y es necesaria una alta concentración de crioprotector la cual es tolerada sólo por pocos tipos

celulares. Se describe un criotratamiento de moléculas de ácido nucleico utilizando crioprotectores en la patente WO 00/27361 A1.

5 En la congelación, debe alcanzarse hasta ahora lo más rápido posible la temperatura de criopreservación a la cual no aparecen alteraciones dentro ni fuera de las células, de modo que las células pueden mantenerse sin daños. Ya que las temperaturas por encima de -130°C pueden dar lugar a la recristalización de dominios de hielo microscópicos, se realiza la congelación y el almacenamiento de muestras en la criopreservación convencional a temperaturas por debajo de los -140°C , por ejemplo a -196°C (temperatura del nitrógeno líquido) o a -145 a -160°C en fase gaseosa enfriada (vapor de nitrógeno líquido) para conseguir un alto índice de vitalidad.

10 El objetivo de la invención es procurar un procedimiento mejorado para la criopreservación de materiales biológicos el cual supere las limitaciones del procedimiento de criopreservación convencional y el cual se caracterice particularmente por una proporción elevada de células vitales las cuales sean obtenibles después de la criopreservación. El procedimiento debe ser practicable particularmente con alta fiabilidad y reproducibilidad incluso con cantidades de muestra pequeñas y para tipos celulares los cuales sean inadecuados para la criopreservación convencional. El objetivo de la invención es también procurar un dispositivo mejorado para la criopreservación de materiales biológicos el cual evite las desventajas de los dispositivos convencionales de criopreservación. Estos objetivos se consiguen con procedimientos o dispositivos para criopreservación con las características de las reivindicaciones independientes. Los modos de realización y aplicaciones ventajosas de la invención se demuestran por las características de las reivindicaciones dependientes.

20 La invención referida al procedimiento se basa en las enseñanzas técnicas generales de someter a una célula biológica (o células biológicas) en primer lugar a una preparación en la cual se actúa de manera invasiva sobre la membrana celular de las células biológicas. Apartándose de las técnicas convencionales, las cuales se dirigen al mantenimiento de las células, se rompe la membrana celular con la preparación, en la cual pueden aparecer daños del citoplasma de las células. Mediante la rotura, se altera la membrana celular de manera que las células pierden su vitalidad. La rotura de la membrana celular comprende, por ejemplo, una perforación, una separación o una degradación (destrucción). Ventajosamente, se facilita por tanto la provisión selectiva de condiciones físicas y/o químicas predeterminadas al entorno inmediato del núcleo celular. Se procuran condiciones tales que el núcleo celular no se exponga a alteraciones durante la criopreservación las cuales limitarían la función biológica del núcleo celular después de su descongelación. Después de la descongelación, puede introducirse el núcleo celular en una célula desnucleada para crear una célula vital. Por tanto, pueden obtenerse células vitales después de la criopreservación (regenerarse o recuperarse), lo cual es especialmente ventajoso para tipos celulares los cuales con la técnica convencional no podían criopreservarse o solo limitadamente.

35 El procedimiento de criopreservación según la invención se caracteriza además por una deshidratación del núcleo celular. Preferiblemente, se deshidratan exclusivamente los núcleos celulares. La deshidratación comprende en general una reducción de la proporción de agua en el núcleo celular. Ventajosamente, se reprime o evita totalmente con la deshidratación el problema presentado en la criopreservación convencional de creación de cristales de hielo en el núcleo celular, ya que por la proporción reducida de agua en el núcleo celular se dificulta la creación de cristales en la congelación. Este procedimiento conduciría a la destrucción del citoplasma en una célula intacta. La deshidratación del núcleo celular puede realizarse ya durante la preparación de las células biológicas o como alternativa proporcionarse después de la preparación. Las etapas de preparación y deshidratación se efectúan en un almacenamiento intermedio del material biológico, el cual se realiza preferiblemente a una temperatura mayor que el almacenamiento permanente posterior en las condiciones de conservación.

45 El procedimiento de criopreservación según la invención se caracteriza además por el ajuste de las condiciones de conservación en las cuales los núcleos celulares son almacenables permanentemente. El ajuste de las condiciones de conservación comprende particularmente el ajuste de la temperatura de conservación en un intervalo de temperatura en el cual no aparecen recristalizaciones en los núcleos celulares o su entorno, así que pueden almacenarse permanentemente manteniendo su capacidad de crear células vivas de núcleos celulares. Ya que los núcleos celulares contienen una proporción de agua reducida en comparación con el estado natural por la deshidratación, o son totalmente anhidros, se evita en la criopreservación cualquier creación de cristales indeseados en el material nuclear. El núcleo celular permanece intacto, así que mantiene su vitalidad después de la criopreservación, particularmente después de la descongelación a temperatura ambiente.

50 La invención se basa particularmente en las siguientes consideraciones y resultados experimentales de los inventores. Las investigaciones han demostrado que en los núcleos celulares de células biológicas las cuales han experimentado la criopreservación convencional se crean dominios de hielo. Aunque en la criopreservación convencional se realiza un transporte de agua del interior de las células a su entorno, hasta ahora el núcleo celular no participaba en este transporte de agua. Ya que los núcleos celulares están recubiertos por una doble membrana (membrana nuclear), los núcleos celulares pueden deshidratarse sólo por los poros de la membrana nuclear. Los núcleos celulares se caracterizan por tanto por una inercia osmótica debido a la cual los núcleos celulares no pueden participar en el transporte de agua hacia fuera en la criopreservación convencional. Adicionalmente, el citoplasma conecta osmóticamente el núcleo celular con la disolución externa. De esta manera, se refuerza la inercia y por tanto se retrasa la deshidratación del núcleo. En contraposición con esta característica comprobada por los inventores del

procedimiento convencional, con la etapa de preparación se pierde la viabilidad de las células en conjunto, para poder ajustar las condiciones físicas y/o químicas selectivamente en el entorno inmediato del núcleo celular, es decir en el lado externo de la membrana nuclear, de modo que en la etapa de deshidratación se realice un transporte de agua del interior del núcleo celular a su entorno.

5 El procedimiento convencional para crioconservación con un tratamiento cuidadoso de las células para mantener su vitalidad se reemplaza según la invención por una preparación invasiva con daños de la membrana celular y la deshidratación selectiva posterior del núcleo celular. Con la etapa de preparación, puede compensarse el efecto desventajoso de la inercia osmótica del núcleo celular. Con la deshidratación del núcleo según la invención, se evitan dominios de hielo en el núcleo y sus consecuencias desventajosas durante el almacenamiento en estado crioconservado.

10 El procedimiento según la invención para crioconservación no está limitado a un tipo celular determinado. La invención puede realizarse, por ejemplo, con células animales o humanas, particularmente óvulos, células nerviosas, células musculares o células inmunitarias, tales como linfocitos, macrófagos o citoblastos, sin estar limitada a estos tipos celulares. Preferiblemente, se proporcionan células las cuales contienen un núcleo celular completamente desarrollado (sin etapas previas de material nuclear).

15 Una ventaja importante de la invención consiste en que pueden utilizarse nuevos grupos de sustancias como crioprotectores o sustancias deshidratantes las cuales son inadecuadas para el procedimiento convencional para crioconservación debido a su permeabilidad por membrana limitada. Pueden utilizarse particularmente sustancias como crioprotectores las cuales no son permeables por la membrana y las cuales son demasiado deshidratantes y dañinas para el citoplasma. A causa de la renuncia a la vitalidad de las células para conservar, pueden utilizarse, por ejemplo, proteínas anticongelantes orgánicas (AFP- Antifreeze Proteine) tales como, por ejemplo, polipéptidos del grupo AFP1 de peces de la región polar (por ejemplo, platija de invierno o bacalao ártico), o AFP de tipos I a IV, tales como están contenidas en insectos, anfibios o algas, o glucoproteínas (AFGP), en la crioconservación según la invención como crioprotectores o sustancias deshidratantes.

20 Con el procedimiento según la invención, se mantiene el estado biológico de los núcleos celulares y por tanto su capacidad funcional biológica de crear células vivas de núcleos celulares, particularmente de contener el material genético completo y sin daños, durante la crioconservación y la descongelación. Esta capacidad funcional se designa aquí también como vitalidad de los núcleos celulares. Para la obtención de células vivas, puede proporcionarse preferiblemente según el procedimiento de la invención la introducción de los núcleos celulares en células hospedadoras y su cultivo según procedimientos en sí conocidos los cuales se describen, por ejemplo, en K. H. S. Campell y col. (Nature, vol. 380, 1996, pág. 64-66), A. Baguisi y col. (Nature Biotechnology, vol. 17, 1999, pág. 456-461), R. Briggs y col. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 38, 1952, pág. 455-463) y P. Chesne y col. (Nature Biotechnology, vol. 20, 2002, pág. 366-369).

25 El objetivo citado anteriormente respecto al dispositivo se consigue mediante enseñanzas técnicas generales de procurar un dispositivo de crioconservación el cual presente un equipo de preparación el cual esté configurado para la práctica de la etapa de preparación anteriormente citada y un equipo de deshidratación con cual puedan someterse los núcleos celulares a la deshidratación anteriormente citada. Además, el dispositivo de crioconservación según la invención presenta un equipo de conservación con el cual núcleos celulares son convertibles a un estado crioconservado.

30 La invención no está limitada a la deshidratación y conservación de núcleos celulares. Según un modo de realización preferido de la invención, se someten otros componentes celulares, particularmente membranas celulares, citoplasma, orgánulos celulares y/o partes de los mismos a deshidratación y posterior crioconservación. Estas etapas se realizan separadamente del tratamiento de los núcleos celulares. Ventajosamente, pueden optimizarse por tanto para los componentes celulares individuales las condiciones físicas y/o químicas para la crioconservación, manteniendo la función biológica del componente celular respectivo. Así, se proporcionan de manera especialmente preferente los componentes celulares aislados entre sí deshidratar y conservar. Para este modo de realización de la invención, el dispositivo de crioconservación según la invención está equipado con varios equipos de deshidratación y varios equipos de conservación los cuales están configurados respectivamente para la deshidratación o bien crioconservación de determinados componentes celulares. Ventajosamente, pueden utilizarse los otros componentes celulares en la regeneración o recuperación de células vitales combinándolos con los núcleos celulares descongelados.

35 Con la etapa de preparación según la invención, se proporciona un daño o destrucción de componentes esenciales (particularmente membrana celular, estructura del citoplasma) de las células biológicas. La membrana celular se altera de modo que se pierde la vitalidad de la célula. Los componentes del entorno nuclear ofrecen el mejor mantenimiento de la capacidad funcional de los núcleos celulares (uso como capa sacrificatoria). Ventajosamente, existen distintas variantes para efectuar la preparación.

40 Según una primera variante, se proporciona el enfriamiento de las células biológicas. El enfriamiento se realiza con una velocidad de enfriamiento ajustada de tal manera que la membrana celular se destruya. A este respecto, la muestra está preferiblemente exenta de crioprotectores. Ventajosamente, pueden efectuarse en este caso la

preparación y posterior ajuste de las condiciones de crioconservación con un equipo de enfriamiento único cuyo perfil de temperatura es controlable.

5 Según una segunda variante, la preparación comprende una destrucción mecánica de las membranas celulares, por ejemplo mediante una centrifugación o una permeabilización eléctrica. En este caso, se evita ventajosamente el enfriamiento de la muestra antes de la deshidratación de los núcleos celulares.

Según una tercera variante, puede proporcionarse una destrucción química de las membranas celulares (lisis), por ejemplo utilizando enzimas o detergentes. También en este caso, se evita ventajosamente el enfriamiento antes de la deshidratación de los núcleos celulares.

10 Una cuarta variante comprende una destrucción osmótica de las membranas celulares. Para ello, se exponen las células biológicas a un entorno de presión osmótica reducida. Por ejemplo, se disponen las células biológicas en agua, preferiblemente agua destilada, de modo que las células se hinchen y desgarren las membranas celulares (exploten). Por el efecto de la presión osmótica, penetra agua en la célula, donde se crean dominios de hielo en el citoplasma en el entorno del núcleo celular, retirándose el agua de los núcleos celulares durante la fase de deshidratación.

15 Según la invención, puede proporcionarse la práctica de al menos dos de las variantes citadas combinadas, particularmente simultánea o consecutivamente.

20 Según un modo de realización ventajoso de la invención, se realiza en la preparación no sólo una rotura de la membrana celular, sino una perturbación, por ejemplo, un daño o fragmentación, de al menos parte del citoplasma de las células biológicas en el entorno de los núcleos celulares. Ventajosamente, puede mejorarse por tanto el efecto de la preparación y facilitarse el ajuste de las condiciones de deshidratación físicas y/o químicas para los núcleos celulares.

25 Según otro modo preferido de realización de la invención, la preparación comprende una combinación de acciones térmicas y mecánicas sobre las células biológicas. Puede proporcionarse, según la invención, una trituración del material celular biológico el cual contiene las células biológicas en estado congelado. La trituración puede realizarse, por ejemplo, utilizando ultrasonidos. Los inventores han comprobado que con la acción de ultrasonidos sobre material celular congelado se consigue el daño de membranas celulares y citoplasma, mientras que se mantienen los núcleos celulares y otros componentes celulares opcionales, tales como por ejemplo orgánulos celulares, particularmente mitocondrias.

30 Cuando según otra modificación de la invención se proporciona una separación de los núcleos celulares de otros componentes de las células biológicas, particularmente de las membranas celulares y del citoplasma, pueden demostrarse ventajas para la deshidratación selectiva de los núcleos celulares. Los núcleos celulares pueden disponerse en uno de los medios exentos de componentes celulares, en el cual son ajustables las condiciones físicas y/o químicas de deshidratación. Además, puede proporcionarse el recubrimiento de los núcleos celulares con una sustancia encapsulante la cual sea, por ejemplo, de alginato. Por tanto, produce una protección adicional a los núcleos celulares

35 Los inventores han comprobado que están disponibles distintos procedimientos para la deshidratación de los núcleos celulares. Puede seleccionarse cuál de estos procedimientos aplicar, practicables individualmente o en combinación, al mismo tiempo o consecutivamente, dependiendo del objetivo de conservación concreto, particularmente dependiendo de los tipos celulares.

40 Según una primera variante, la deshidratación aplicada según la invención comprende el ajuste de la temperatura de deshidratación en el entorno de los núcleos celulares. La temperatura de deshidratación se selecciona de modo que el agua en el entorno de los núcleos celulares se congele y cree cristales de hielo, rebasándose tan levemente el punto de congelación que se realice una recrystalización en los cristales de hielo. Preferiblemente, se selecciona la temperatura de deshidratación en el intervalo por debajo de 0°C, preferiblemente de por debajo de -5°C. Además, se selecciona la temperatura de deshidratación preferiblemente en el intervalo por encima de los -130°C, por ejemplo por encima de -80°C, de manera preferentemente especial por encima de -40°C. Hasta ahora, no se habían tenido en cuenta estos intervalos de temperatura para procedimientos de conservación, ya que se suponía que eran necesarias temperaturas más bajas para el mantenimiento vital del material celular. La recrystalización de dominios de hielo en el entorno de los núcleos celulares significa la creación de zonas microscópicas de agua líquida o de cristales de hielo cambiantes los cuales ejercen una presión osmótica sobre el agua encontrada en los núcleos celulares. Como resultado, se transporta el agua de los núcleos celulares a través de su membrana nuclear al entorno de los núcleos celulares. Crecen entonces cristales de hielo grandes a costa de cristales de hielo menores. Este fenómeno se designa como "crecimiento migratorio". El intervalo de temperatura citado tiene además la ventaja de que puede realizarse el dispositivo de crioconservación económica, particularmente con un enfriador de Peltier.

55 El ajuste de la temperatura de deshidratación puede incluir una variación de la temperatura en el entorno del núcleo celular. Ventajosamente, puede ajustarse un ciclo de temperatura de deshidratación en cuyo desarrollo temporal la temperatura de deshidratación aumenta o se reduce varias veces en el intervalo de temperatura anteriormente citado.

5 Por tanto, se estimula la recristalización en el entorno de los núcleos celulares. Ventajosamente, se potencia por tanto la deshidratación de los núcleos celulares. Como alternativa o adicionalmente, el ciclo de temperatura de deshidratación puede comprender una o varias elevaciones de temperatura hasta por encima del punto de fusión de la muestra congelada, particularmente por encima de 0°C. En este caso, el ciclo de temperatura de deshidratación contiene fases en las cuales el entorno del núcleo celular está totalmente descongelado. Durante las fases de descongelación del ciclo de temperatura de deshidratación, puede elevarse la presión osmótica sobre los núcleos celulares y reforzarse el transporte de agua al entorno. Además, puede proporcionarse ventajosamente durante las fases de descongelación un intercambio de material con el entorno de los núcleos celulares. En este caso, se eleva la temperatura de la muestra temporalmente en el ciclo de temperatura de deshidratación de modo que el entorno de los núcleos celulares esté líquido. En este estado, puede añadirse al entorno de los núcleos celulares una sustancia con la cual se potencie la deshidratación. Este proceso puede apoyarse en la adición de sustancias las cuales reduzcan el punto de congelación, tales como por ejemplo sustancias de alto peso molecular, particularmente dextrano o electrolitos.

15 Según una segunda variante de la deshidratación aplicada según la invención, se dispone en el entorno de los núcleos celulares una sustancia deshidratante la cual produce la deshidratación del núcleo celular. La deshidratación con una sustancia deshidratante puede efectuarse ventajosamente a temperatura ambiente. Se ponen a disposición como sustancias deshidratantes distintos grupos de sustancias las cuales comprenden alcoholes, proteínas, azúcares, electrolitos y/o polímeros, y se caracterizan respectivamente por la creación de un potencial osmótico frente al interior de los núcleos celulares. La concentración de la sustancia deshidratante puede seleccionarse dependiendo de las condiciones de procedimiento concretas, por ejemplo, mediante ensayos o utilizando parámetros osmóticos conocidos de las sustancias (valores tabulados).

20 Según una tercera variante de la deshidratación aplicada según la invención, se procura al entorno de los núcleos celulares una sustancia estabilizante la cual penetra por la membrana nuclear en los núcleos celulares y desplaza el agua en los mismos. Es utilizable como sustancia estabilizante cualquier sustancia la cual presente en el entorno molecular del interior de los núcleos celulares una estabilidad termodinámica mayor que fuera de los núcleos celulares y que el agua en los núcleos celulares. Ventajosamente, están a disposición distintos grupos de sustancias las cuales comprenden particularmente alginatos, nanopartículas, matrices, celulosa, polímeros y/o geles. También puede seleccionarse la concentración de sustancia estabilizante dependiendo de las condiciones de procedimiento concretas.

30 Cuando, según otro modo de realización ventajoso de la invención, se realiza la deshidratación mientras se disponen en el entorno de los núcleos celulares los componentes celulares de las células (particularmente membrana celular y citoplasma), pueden demostrarse ventajas para la combinación de las etapas de preparación y deshidratación y su práctica en un equipo combinado de preparación y deshidratación. Como alternativa, puede proporcionarse según la invención la práctica de la deshidratación después de haber separado los núcleos celulares del resto de componente celulares. En este caso, se demuestran ventajas para un ajuste especialmente eficaz de las condiciones de deshidratación.

35 Según otra variante ventajosa de la invención, puede estar presente durante la preparación y/o deshidratación en el entorno de los núcleos celulares al menos un crioprotector. A diferencia de las técnicas convencionales, se alimenta y dosifica el crioprotector de modo que actúe exclusivamente para la protección del núcleo celular. Por ejemplo, se procura a un medio en el entorno de las células crioprotector a una proporción de menos de un 5% en vol., preferiblemente de menos de un 3% en vol., por ejemplo de 1% en vol. o menos. La alimentación del crioprotector puede realizarse a temperaturas fisiológicas, particularmente por encima de 10°C y/o por debajo de 38°C.

40 El ajuste según la invención de las condiciones de conservación para los núcleos celulares comprende preferiblemente el ajuste de una temperatura de almacenamiento a la cual se reprima o excluya la recristalización de dominios de hielo. Se ajusta preferiblemente una temperatura de almacenamiento por debajo de -80°C, de manera preferentemente especial por debajo de -130°C. Ventajosamente, se excluye por tanto un eventual daño por dominios residuales microscópicos de agua en los núcleos celulares. Además, la temperatura de almacenamiento coincide ventajosamente con las temperaturas finales habituales de la criopreservación convencional, por lo cual pueden combinarse núcleos celulares preparados y deshidratados según la invención junto con material celular procesado convencionalmente en un equipo de conservación común.

45 Según otras modificaciones del procedimiento según la invención, los núcleos celulares pueden someterse a una compactación o deposición individual. En el caso de compactación, se realiza una concentración de los núcleos celulares. Los núcleos celulares se disponen para la criopreservación a una densidad volumétrica elevada. Ventajosamente, puede elevarse por tanto la eficacia de almacenamiento. Con la deposición individual proporcionada alternativamente, se aíslan los núcleos celulares y se almacenan separados entre sí. En este caso, se demuestran ventajas por la posibilidad de descongelar núcleos celulares individuales de una muestra y alimentar a otra aplicación.

50 Un rasgo especial de la invención consiste en el uso de sustancias las cuales potencian un aumento y recristalización de los dominios de hielo en el entorno de los núcleos celulares, tales como crioprotectores. Los crioprotectores según la invención se caracterizan porque no son permeables por la membrana nuclear y no reducen el tamaño de los dominios de hielo en el entorno del núcleo. Otras propiedades de los crioprotectores según la invención consisten en que son osmóticamente eficaces y/o causan una segregación del entorno líquido del núcleo en cristales de

hielo y sustancias concentradas. En los procedimientos de criopreservación convencionales, sustancias tales como, por ejemplo, alcoholes, proteínas, azúcares, electrolitos, polianiones, policationes, polímeros, aceites o geles no son nada adecuadas como crioprotectores, ya que en los procedimientos convencionales los dominios de hielo deben mantenerse lo más pequeños y estables posibles. El uso de las sustancias citadas como crioprotectores representa por tanto un objeto independiente de la invención.

Se describen otras particularidades y ventajas de la invención a continuación con referencia a los dibujos adjuntos. Se muestran:

- Figura 1: una ilustración esquemática de las etapas de procedimiento en la cual se proporcionan en modos de realización preferidos del procedimiento según la invención;
- Figuras 2 a 4: ilustraciones esquemáticas de tres modos de realización de la criopreservación según la invención de núcleos celulares;
- Figuras 5 y 6: Ilustraciones esquemáticas de la deshidratación y almacenamiento permanente de núcleos celulares según la invención;
- Figura 7: una ilustración esquemática de la producción de células vitales utilizando un procedimiento de transferencia nuclear; y
- Figura 8: una ilustración esquemática de un modo de realización del dispositivo de criopreservación según la invención.

Una célula biológica 1 comprende como componentes celulares en general la membrana celular 2, el núcleo celular 3, el citoplasma 4 y los orgánulos celulares 5 tales como, por ejemplo, mitocondrias, retículo endoplásmico o aparato de Golgi. En la criopreservación convencional, se congelan cuidadosamente células enteras. Por ello, en contraposición, se tratan en el procedimiento según la invención, tal como se ilustra esquemáticamente en la Figura 1, células biológicas 1 de modo que se rompa la membrana celular 2 por tanto se destruya la célula 1. Los componentes celulares 2, 3, 4 y 5 pueden separarse entre sí con procedimientos de aislamiento en sí conocidos. De los componentes celulares, se someten al menos el núcleo celular 3, pero opcionalmente también la membrana celular 2, el citoplasma 4, orgánulos celulares 5 y/o partes de los mismos a deshidratación y criopreservación.

En la etapa de preparación, se procesa la célula 1 según una de las variantes ilustradas a continuación. Se deshidrata a continuación el núcleo celular 3 en un entorno de componentes de la célula destruida en el equipo de deshidratación 20 mostrado esquemáticamente, y a continuación se conserva en el equipo de conservación 30. Opcionalmente, pueden someterse los orgánulos celulares 5, células desnucleadas (las cuales comprenden la membrana celular 2 y el citoplasma 4 sin núcleo celular) y/o partes del citoplasma 4, dado el caso con orgánulos celulares 5 o partes de los mismos, a deshidratación y posterior conservación. A este respecto, pueden ajustarse las condiciones de procedimiento selectivas las cuales se adaptan específicamente a los componentes celulares respectivos. Por ejemplo, pueden tratarse las mitocondrias como núcleos celulares, proporcionándose una deshidratación y quedando el interior de las mitocondrias exento de crioprotectores. En la criopreservación de retículo endoplásmico o aparato de Golgi en cambio, se proporciona la adición de sustancias estabilizantes tales como, por ejemplo, alginato o polielectrolitos, particularmente para estabilizar estos componentes celulares especialmente sensibles. Las membranas celulares pueden compactarse en una disolución acuosa, para mantener en la conservación un paquete compacto.

Normalmente, la muestra biológica, la cual se somete al procedimiento según la invención, comprende una pluralidad de células biológicas 1 de modo que al mismo tiempo se deshidratan y conservan los núcleos celulares 3 en el entorno de componentes celulares y se deshidratan y conservan aisladamente los otros componentes celulares. A este respecto, es ventajosamente posible congelar conjuntamente los mismos componentes celulares de distintas células.

Se ilustran a continuación modos de realización preferidos de la criopreservación de núcleos celulares según la invención con referencia a tres posibilidades de procedimiento. Estas comprenden en primer lugar un tratamiento de los núcleos celulares *in situ*, es decir, en las células y/o en la estructura celular (Figura 2); en segundo lugar, un tratamiento de los núcleos celulares después de su aislamiento de las células y/o su separación de la estructura celular (Figura 3) y en tercer lugar el tratamiento de los núcleos celulares dentro de las células con una posterior separación de los núcleos celulares de las células (Figura 4). Se subraya que la conversión de la invención no está limitada a estos esquemas, sino que puede incluir otras etapas de procedimiento. Otras etapas de procedimiento pueden comprender tratamientos físicos y/o químicos tales como, por ejemplo, elevaciones o reducciones de temperatura, procesamientos mecánicos o intercambio de medio ambiente. Además, el tratamiento de otros componentes celulares puede realizarse como el tratamiento de los núcleos celulares.

La invención se ilustra particularmente con referencia a las particularidades de las etapas de preparación y

deshidratación. Otras particularidades, por ejemplo la conservación permanente, no se ilustran, ya que estas son conocidas por los procedimientos de crioconservación convencionales.

Para la crioconservación *in situ* de núcleos celulares, la Figura 2A muestra en primer lugar la provisión de una muestra la cual contiene las células 1 con las membranas celulares 2 y los núcleos celulares 3. Las células 1 se presentan aisladas y suspendidas en una disolución de suspensión o como composición celular 6 (tejido o parte de tejido) en un medio de cultivo. La provisión de las células 1 se realiza a una primera temperatura T_1 por encima del punto de congelación de la muestra, particularmente por encima del punto de congelación del agua (0°C). La primera temperatura T_1 se selecciona de modo que ni las células 1 ni su medio ambiente (disolución de suspensión y/o medio de cultivo) estén congelados. En este estado, puede añadirse a las células 1 o la composición celular 6 una sustancia deshidratante y/o estabilizante.

Las células comprenden preferiblemente células animales o humanas, particularmente óvulos, células nerviosas, células musculares o células inmunitarias tales como linfocitos, macrófagos o citoblastos. En un modo de realización concreto, las células 1 comprenden, por ejemplo, células musculares o nerviosas en una disolución de cultivo fisiológica. Se procura, por ejemplo, un volumen de muestra de 1 a $100\ \mu\text{l}$ con aproximadamente 10 a 10.000 células.

A continuación, se realizan las etapas de preparación y deshidratación según la invención a una segunda temperatura T_2 (temperatura de almacenamiento intermedio) por debajo del punto de congelación de la muestra, particularmente por debajo del punto de congelación del agua (Figura 2B). A la segunda temperatura T_2 , las células 1 con los núcleos celulares 3 y el medio ambiente 7 están congelados. En el enfriamiento de la muestra en el intervalo de temperatura de -5 a -80°C , por ejemplo aproximadamente a -20°C , se destruyen las membranas celulares 2. La destrucción de las membranas celulares 2 está causada porque en el intervalo de temperatura citado crecen cristales de hielo en el entorno de las células 1 y lo reestructuran, realizándose una permeabilización de las membranas celulares. Al mismo tiempo, los núcleos celulares 3 están protegidos por el citoplasma circundante, de modo que las membranas nucleares de los núcleos celulares 3 no se perturban, sino que se conservan.

A la segunda temperatura T_2 , se posibilita mediante la destrucción de las membranas celulares 2 y la perturbación de la estructura del citoplasma de las células 1 que el agua se transporte de los núcleos celulares 3 a su entorno. La deshidratación se realiza por tanto al mismo tiempo que la preparación. Además, puede difundirse en los núcleos celulares 3 como sustancia estabilizante, por ejemplo, un electrolito el cual contiene iones K^+ , Cl^- , Na^+ y/o Ca^{2+} ; un polielectrolito aniónico o catiónico, por ejemplo, pectinas, alginatos, polisacáridos, poli(ácido acrílico), polietilenimina, polivinilamina, polivinilpiridina, biopolímeros (tal como ADN); dextrano o azúcares del medio ambiente 7, y allí sustituir al agua incorporada. El agua reemplazada escapa al entorno de los núcleos celulares 3.

Puede seleccionarse una segunda temperatura T_2 ajustada estrechamente. Como alternativa, pueden efectuarse programas de temperatura con temperaturas crecientes y decrecientes en el intervalo citado. Puede proporcionarse la descongelación al menos temporal del medio ambiente 7 (temperatura particularmente por encima del punto de congelación del agua), para añadir a o retirar del medio ambiente 7 sustancias deshidratantes y/o estabilizantes.

La duración de las etapas de preparación y deshidratación a la segunda temperatura T_2 depende de la temperatura seleccionada y/o del perfil de temperatura seleccionado, así como de las propiedades de la muestra tales como, por ejemplo, el tamaño de la muestra y el número de núcleos celulares 3. La duración de las etapas de preparación y deshidratación asciende al menos a media hora, pero puede ascender también al menos a 1 hora, 5 horas, 24 horas o más, por ejemplo 2 días o más o incluso meses hasta años. Generalmente, las etapas de preparación y deshidratación a la segunda temperatura T_2 representan por tanto un almacenamiento intermedio en el cual el entorno de los núcleos celulares 3 se altera dinámicamente, particularmente por recristalizaciones, para causar la deshidratación de los núcleos celulares 1.

A continuación, se realiza el ajuste de las condiciones de conservación en las cuales los núcleos celulares 3 presentan un estado crioconservado inalterado permanente (Figura 2C). Para ello, se ajusta una tercera temperatura T_3 (temperatura de almacenamiento) la cual se selecciona por debajo de -80°C , preferiblemente por debajo de -130°C . A estas temperaturas, se reprime cualquier proceso de recristalización en el entorno de los núcleos celulares 3, de modo que los núcleos celulares 3 y sus componentes, particularmente componentes de ADN, ya no se alteran. Durante el almacenamiento a la tercera temperatura T_3 , siguen existiendo restos de células biológicas 1 en el entorno de los núcleos celulares 3. A diferencia de la crioconservación convencional de células vitales, sin embargo, las membranas celulares 2 se permeabilizan en gran medida o se destruyen totalmente y la estructura citoplasmática se altera en gran medida (por ejemplo, se segrega o se mezcla con dominios de hielo) o se destruye totalmente (función del citoplasma como "capa sacrificatoria").

La Figura 2D ilustra esquemáticamente la recuperación de los núcleos celulares 3 después de la crioconservación. Para ello, se calientan los núcleos celulares 3 a una cuarta temperatura T_4 y se descongelan. La cuarta temperatura T_4 se selecciona preferiblemente por encima de -5°C , de manera preferentemente especial por encima de 0°C . También en el paso de la tercera temperatura T_3 a la cuarta temperatura T_4 pueden proporcionarse

cambios de temperatura con temperaturas crecientes y decrecientes para someter los núcleos celulares 3 a una rehidratación.

En el modo de realización ilustrado en la Figura 3 del procedimiento según la invención, se preparan células 1 con núcleos celulares 3 a una primera temperatura T_1 por encima del punto de congelación de la muestra, particularmente por encima de 0°C (Figura 3A) y se someten a una separación de los núcleos celulares 1 del resto de componentes celulares. La separación comprende un procedimiento en sí conocido tal como, por ejemplo, una centrifugación en gradiente de densidad, en la cual las membranas celulares 2 se destruyen y los núcleos celulares 3 se aíslan. En una fracción, se compactan los núcleos celulares 3. Como resultado, se presenta una muestra con un volumen de, por ejemplo, 1 a $10\ \mu\text{l}$ con 1 a 1.000 núcleos celulares 3.

Después, se realiza la deshidratación de los núcleos celulares 3 incorporando en primer lugar los núcleos celulares aislados 3 a un medio de congelación 8 (Figura 3B). El medio de congelación 8 es una disolución fisiológica la cual contiene sustancias tales como, por ejemplo, electrolitos, suero, glucosa o proteínas, las cuales potencian la congelación de los núcleos celulares 3. Adicionalmente, el medio de congelación 8 puede contener crioprotectores convencionales. La alimentación al medio de congelación se realiza a una segunda temperatura T_2 la cual se selecciona por encima del punto de congelación del medio de congelación 8.

A continuación, se enfría la suspensión de núcleos celulares 3 en un medio de congelación 8 a una tercera temperatura T_3 (almacenamiento intermedio, Figura 3C). La tercera temperatura T_3 se selecciona del intervalo de -5 a -80°C , preferiblemente a -20°C , pudiendo proporcionarse un cambio de temperatura en este intervalo de temperatura como en el modo de realización según la figura 2. Además, pueden proporcionarse fases de descongelación en las cuales la temperatura se selecciona por encima del punto de congelación del medio de congelación 8. Durante el almacenamiento intermedio a la tercera temperatura T_3 , se realiza una recristalización en el entorno de los núcleos celulares 3, una deshidratación del espacio interior de los núcleos celulares 3 y, dado el caso, una difusión de sustancias estabilizantes en los núcleos celulares 3. Para ello, la duración del almacenamiento intermedio, tal como se menciona ha mencionado anteriormente en la Figura 2, puede seleccionarse dependiendo del programa de temperatura y/o propiedades de la muestra. La creación de hielo puede inducirse mediante una vibración o mediante la aplicación de ultrasonidos en puntos temporales determinados. Opcionalmente, puede proporcionarse durante el almacenamiento intermedio a la tercera temperatura T_3 una extracción de agua del medio de congelación congelado o temporalmente descongelado. En estado congelado, puede proporcionarse, por ejemplo, una sublimación en un entorno de presión reducida, por ejemplo al vacío.

A continuación, se realiza el almacenamiento a la temperatura de almacenamiento T_4 , la cual se selecciona por ejemplo por debajo de -130°C (Figura 3D). Puede ajustarse una temperatura de almacenamiento T_4 mayor, por ejemplo, en el intervalo de -80 a -130°C , particularmente cuando antes se ha separado el agua del medio de congelación 6, por ejemplo mediante sublimación. Finalmente, la Figura 3E ilustra la recuperación de los núcleos celulares 3 mediante un calentamiento a la temperatura elevada T_5 por encima del punto de congelación del medio de congelación 8.

La Figura 4 ilustra el modo de realización de la invención en el cual se efectúa la preparación y deshidratación de los núcleos celulares 3 en condiciones *in situ* y a continuación se realiza una separación de los núcleos celulares 3 del resto del material celular. En primer lugar, se realizan la preparación y deshidratación tal como se ha descrito anteriormente con referencia a la Figura 2 (Figuras 4A, 4B). A la segunda temperatura T_2 , la cual se selecciona por ejemplo en el intervalo de -20 a -196°C , se realiza un tratamiento mecánico de la muestra congelada, por ejemplo mediante la acción de ultrasonidos o mediante trituración mecánica por herramientas u otras vibraciones. A este respecto, los núcleos celulares 3 pueden separarse del resto de componentes celulares. A continuación, se realiza a la tercera temperatura T_3 , la cual se selecciona en el intervalo de 0 a -80°C , otra deshidratación de los núcleos celulares 1. A la tercera temperatura T_3 pueden añadirse, por ejemplo, sustancias deshidratantes y/o sustancias estabilizantes al medio de congelación 8 o retirarse agua del mismo. Finalmente, las imágenes parciales C y D de la Figura 4 ilustran el almacenamiento permanente de los núcleos celulares deshidratados y su posterior recuperación (véanse las Figuras 2 y 3).

Las Figuras 5 y 6 ilustran esquemáticamente las operaciones las cuales se desarrollan en la deshidratación según la invención de los núcleos celulares a la temperatura de almacenamiento intermedia. En la Figura 5, se ilustran esquemáticamente las condiciones al inicio del almacenamiento intermedio. Se muestra un núcleo celular 3 individual rodeado por una membrana nuclear 3.1 (doble membrana) dispuesto en el medio de congelación 8. En el interior del núcleo celular 3, se encuentran proporciones de agua 3.2, cromatina 3.3 y ADN 3.4 (en estado adherido a histona). Las proporciones de agua 3.2 pueden estar en estado líquido o ya en estado congelado. Fuera del núcleo celular 3, se encuentran igualmente proporciones de agua 8.1 en el medio de congelación 8 las cuales pueden estar en estado líquido (disuelto) o congelado.

La Figura 6 muestra la situación después de un almacenamiento intermedio de varios meses. Como resultado de la deshidratación del núcleo celular 3, las proporciones de agua 3.2 del interior del núcleo celular se retiran parcial o totalmente, mientras que crecen las proporciones de agua 8.1 en el medio de congelación 8. Al mismo tiempo, pueden difundirse en el interior del núcleo celular 3 sustancias estabilizantes. La Figura 6 muestra la diferencia esencial de la invención frente al procedimiento convencional en el cual en el entorno de los núcleos celulares 3 se induce el

crecimiento de dominios de hielo 8.1 grandes deshidratantes del interior del núcleo celular 3.

5 La Figura 7 ilustra esquemáticamente, por ejemplo, óvulos de ratón los cuales a partir de un núcleo celular 3 el cual se ha sometido al procedimiento de conservación según la invención, producen una célula vital viable 1.1. A partir de un ratón 9, se obtienen óvulos recientes 1.2 los cuales se desnuclean con un procedimiento en sí conocido. El núcleo celular 3 conservado se extrae del equipo de conservación 30 y se introduce mediante un procedimiento de transferencia nuclear igualmente en sí conocido en la célula desnucleada 1.3. La célula 1.1 así obtenida se somete a continuación a un procedimiento de cultivo incluyendo propagación y crecimiento de células. Apartándose del procedimiento mostrado, puede proporcionarse no transferir el núcleo celular descongelado a óvulos recientes, sino a óvulos desnucleados descongelados.

10 La Figura 8 muestra esquemáticamente un dispositivo de criopreservación 100 con un equipo de preparación 10, un equipo de deshidratación 20 y un equipo de conservación 30. Los equipos de preparación y deshidratación 10 y 20 pueden crearse mediante componentes comunes (véase el cuadro de línea de puntos). Los equipos de preparación y deshidratación 10 y 20 contienen respectivamente un equipo de enfriamiento controlable 11, 21, una toma de muestras 12, 22 y un equipo de conducción 13, 23 con el cual las sustancias pueden alimentarse a la muestra o descargarse de la misma. El equipo de conservación 30 se construye tal como es conocido de la criopreservación convencional. Comprende, por ejemplo, un criotank para la admisión de nitrógeno líquido, en el cual se almacena la muestra con los núcleos celulares congelados en nitrógeno líquido o en vapor de nitrógeno líquido.

20 Cuando se deshidratan varios componentes celulares aislados entre sí y se congelan, el equipo de criopreservación 100 mostrado en la Figura 8 se modifica de tal modo que se proporcionan varios equipos de deshidratación 20 y varios equipos de conservación 30 para el tratamiento de los distintos componentes celulares respectivos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la crioconservación de material biológico el cual contiene células biológicas (1) con membranas celulares (2), núcleos celulares (3), citoplasma (4) y orgánulos celulares (5), que comprende las etapas de:
 - 5 – preparación de las células biológicas (1) de tal modo que se rompan las membranas celulares (2),
 - deshidratación de los núcleos celulares (3) en la cual la deshidratación comprende una reducción de la proporción de agua, y
 - ajuste de las condiciones de conservación en las cuales los núcleos celulares (3) presentan un estado crioconservado.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual la preparación de células biológicas (1) comprende una rotura de la membrana celular la cual hace perder la vitalidad de las células.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el cual la preparación de las células biológicas (1) comprende al menos una de las etapas:
 - 15 – enfriamiento de las células biológicas (1),
 - destrucción mecánica de las membranas celulares (2),
 - destrucción química de las membranas celulares (2),
 - destrucción osmótica de las membranas celulares (2),
 - destrucción de los componentes citoplasmáticos de las células biológicas (1) en el entorno de los núcleos celulares (3),
 - 20 – trituración del material celular biológico el cual contiene las células biológicas (1) en estado congelado, y
 - separación de los núcleos celulares (3) del resto de componentes de las células biológicas.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el cual la deshidratación de los núcleos celulares (3) comprende al menos una de las etapas de:
 - 25 – ajuste de una temperatura de deshidratación en la cual se realiza una recristalización del agua congelada en el entorno de los núcleos celulares (3),
 - provisión de una sustancia deshidratante la cual causa la deshidratación de los núcleos celulares (3) en el entorno de los núcleos celulares (3),
 - provisión de una sustancia estabilizante la cual penetra en los núcleos celulares (3) y desplaza el agua en los mismos, y
 - 30 – sublimación de agua del entorno de los núcleos celulares (3) en estado congelado a presión reducida.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el cual
 - la temperatura de deshidratación se ajusta en el intervalo de temperatura de por debajo de 0°C y por encima de -80°C, particularmente por encima de -40°C y/o
 - 35 – se ajusta un ciclo de temperatura de deshidratación en el cual la temperatura de deshidratación se altera varias veces y/o se ajusta una temperatura elevada por encima del punto de congelación del agua.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el cual
 - durante el ajuste de la temperatura elevada por encima del punto de congelación del agua, se realiza un intercambio de sustancia con el entorno de los núcleos celulares (3).
7. Procedimiento según la reivindicación 4, en el cual
 - 40 – la sustancia deshidratante se selecciona del grupo de sustancias el cual comprende alcoholes, proteínas, azúcares, electrolitos y polímeros, y/o
 - la sustancia estabilizante se selecciona del grupo el cual comprende alginato, nanopartículas, matrices,

celulosa, polímeros y geles.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el cual
- la deshidratación de los núcleos celulares (3) se realiza mientras los núcleos celulares (3) se encuentran en el material celular biológico el cual contiene componentes celulares de las células biológicas (1).
- 5 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual
- la deshidratación de los núcleos celulares (3) se realiza después de haber separado los núcleos celulares (3) del material biológico el cual contiene las células biológicas (1).
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el cual el ajuste de las condiciones de conservación comprende:
- 10 – el ajuste de una temperatura de almacenamiento de los núcleos celulares (3) la cual se selecciona por debajo de -80°C, particularmente por debajo de -130°C.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, con al menos una de las etapas de:
- compactación de los núcleos celulares (3), y
 - deposición individual de los núcleos celulares (3), y
- 15 – se someten al menos uno de membranas celulares (2), citoplasma (4), orgánulos celulares (5) y parte de los mismos a deshidratación y crioconservación.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el cual:
- los núcleos celulares (3), las membranas celulares (2), el citoplasma (4), los orgánulos celulares (5) y/o partes de los mismos se separan entre sí y se crioconservan separados de los núcleos celulares (3).
- 20 13. Dispositivo (100) para la crioconservación de núcleos celulares (3) de células biológicas (1) el cual comprende:
- un equipo de preparación (10) el cual se proporciona para la preparación de células biológicas (1) de tal manera que se rompan las membranas celulares (2) de las células biológicas (1),
 - un equipo de deshidratación (20) el cual se proporciona para la deshidratación de los núcleos celulares (3), en el cual la deshidratación comprende una reducción de la proporción de agua, y
 - un equipo de conservación (30) el cual se proporciona para el ajuste de las condiciones en las cuales los núcleos celulares (3) presentan un estado crioconservado.
- 25
14. Dispositivo según la reivindicación 13, en el cual
- se proporcionan varios dispositivos de conservación (30) los cuales se configuran para el ajuste de las condiciones en las cuales al menos uno de las membranas celulares (2), citoplasma (4), orgánulos celulares (5) y las partes de los mismos presentan un estado crioconservado.
- 30

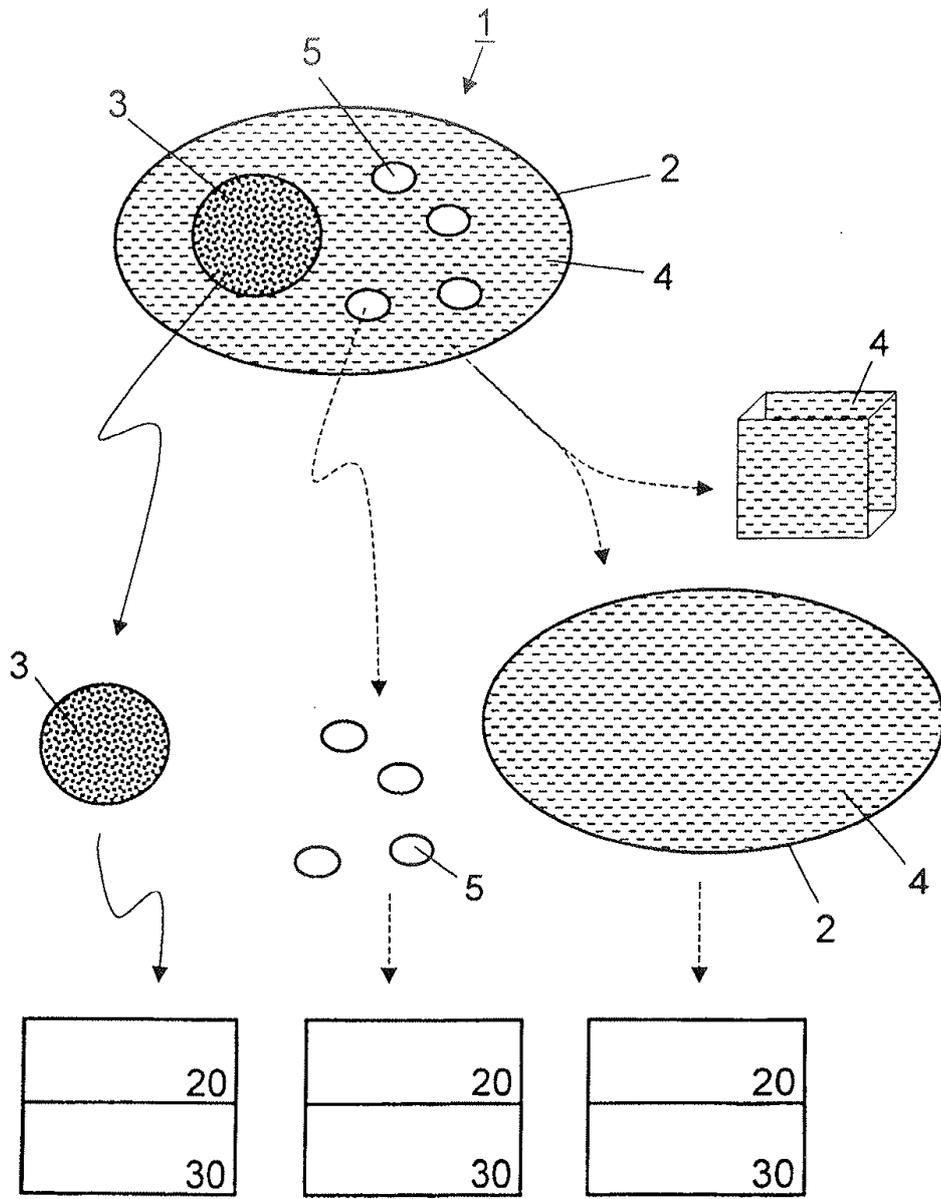


FIG. 1

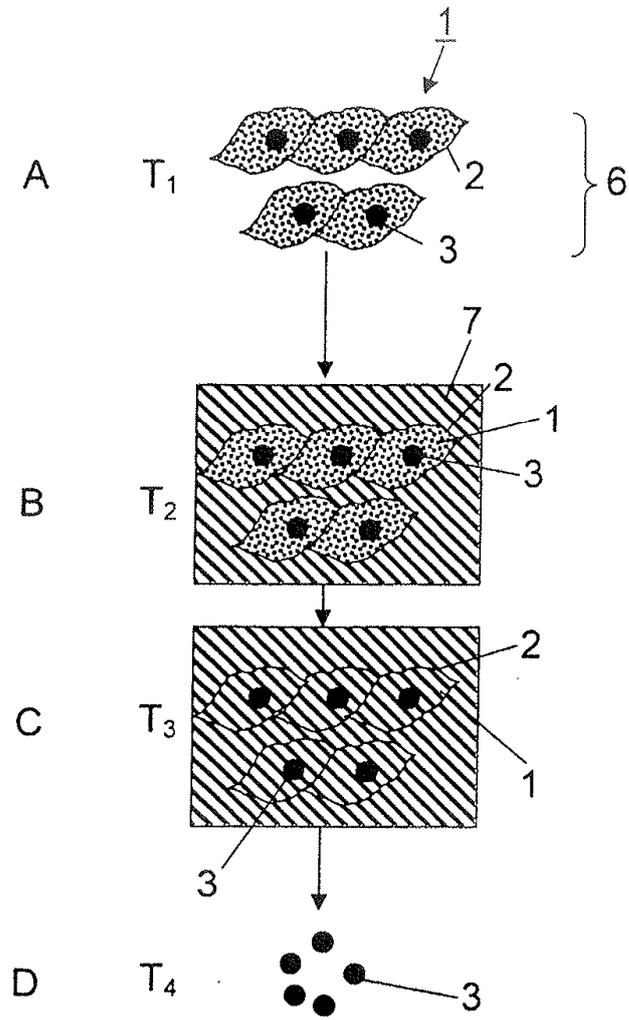


FIG. 2

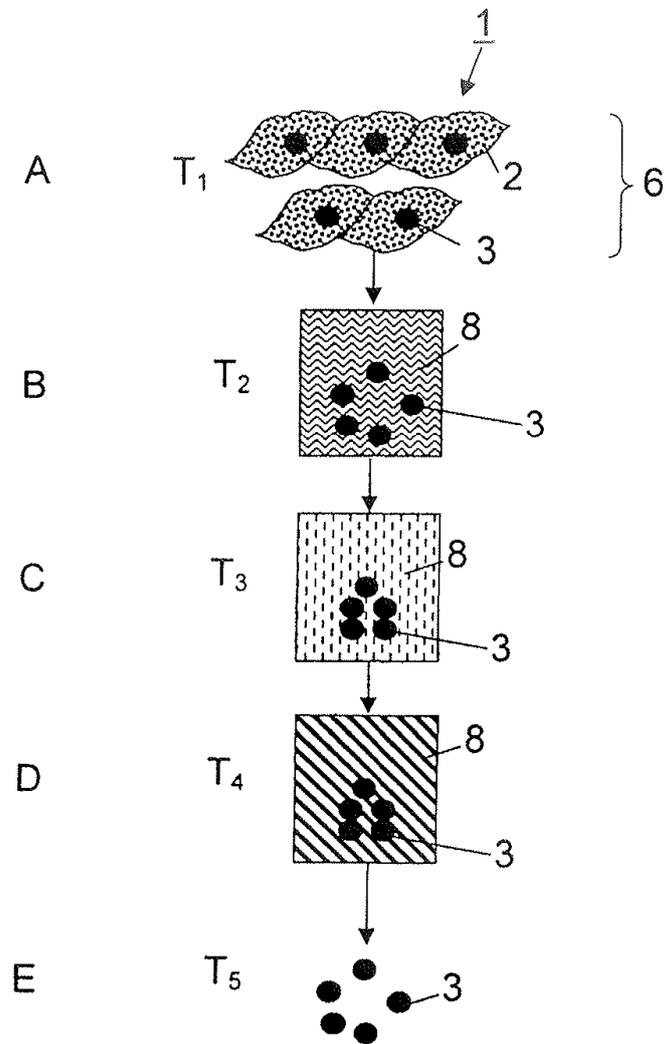


FIG. 3

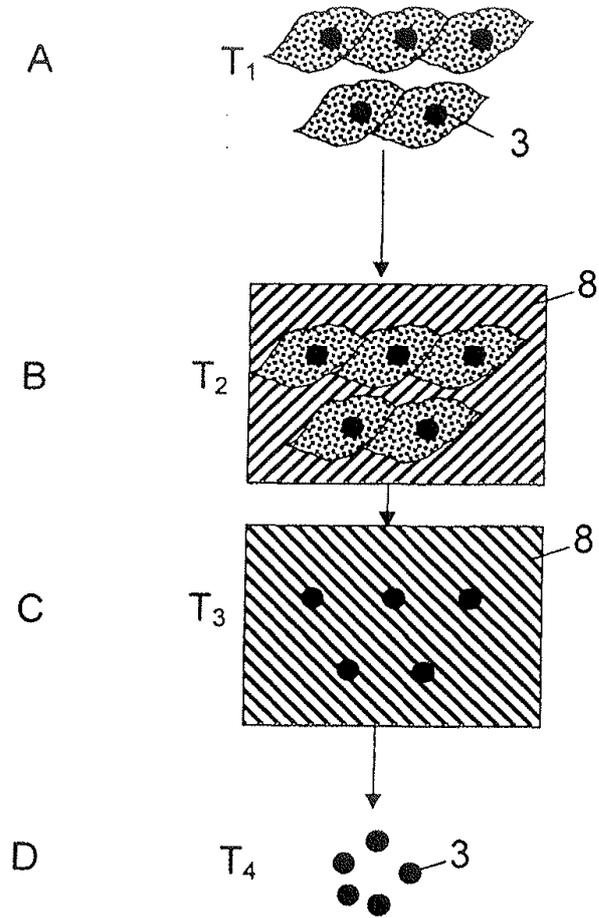


FIG. 4

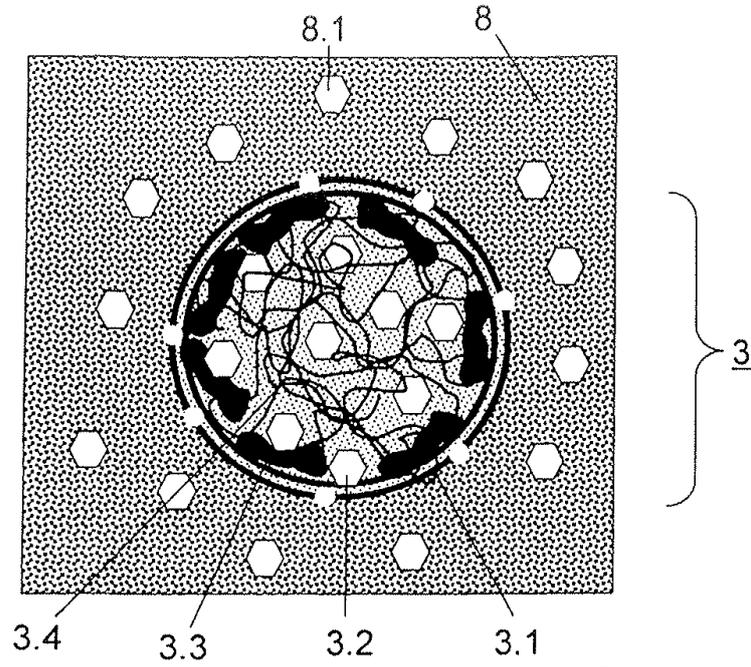


FIG. 5

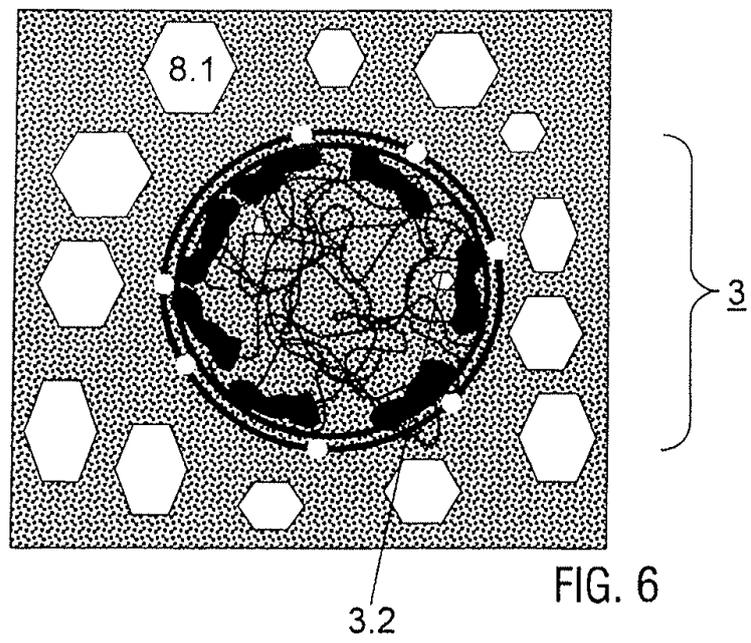


FIG. 6

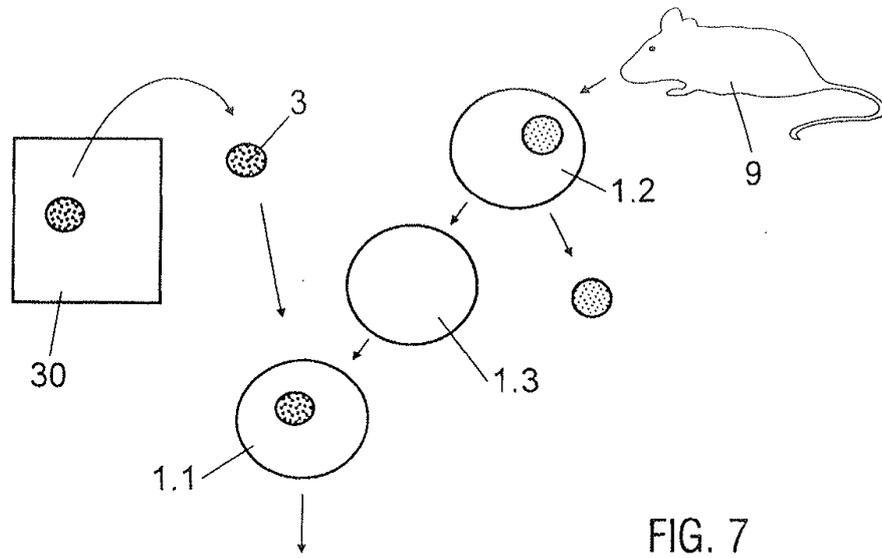


FIG. 7

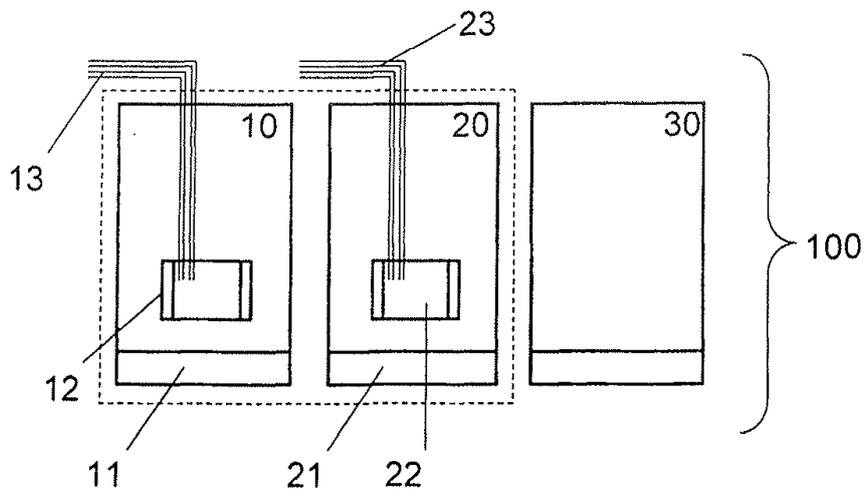


FIG. 8

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

5 En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patente indicados en la descripción

- 10
- US 3648475 A [0002]
 - US 20050277107 A1 [0006]
 - US 20020177119 A1 [0002]
 - WO 0027361 A1 [0006]

15

Literatura no especificada en la descripción de la patente

- **OOZYTEN. Z. HE et al.** *Fertility and Sterility*, 2003, vol. 79, 347 ff [0002]
- **K. H. S. CAMPBELL et al.** *Nature*, 1996, vol. 380, 64-66 [0016]
- **A. BAGUISI et al.** *Nature Biotechnology*, 1999, vol. 17, 456-461 [0016]
- **R. BRIGGS et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1952, vol. 38, 455-463 [0016]
- **P. CHESNE et al.** *Nature Biotechnology*, 2002, vol. 20, 366-369 [0016]