

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 985**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/52** (2015.01)

**C12N 5/076** (2010.01)

**G01N 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2005 E 10182063 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2269617**

54 Título: **Proceso para enriquecer una población de células espermáticas**

30 Prioridad:

**22.07.2004 US 590270 P**

**23.07.2004 US 590769 P**

**13.10.2004 US 618440 P**

**29.09.2004 US 614178 P**

**29.03.2005 US 92313**

**29.03.2005 US 92509**

**29.03.2005 US 92338**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2016**

73 Titular/es:

**INGURAN, LLC (100.0%)  
22575 State Highway 6 South  
Navasota, TX 77868, US**

72 Inventor/es:

**GRAHAM, JEFFREY A.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 583 985 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**

Proceso para enriquecer una población de células espermáticas

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al enriquecimiento de una población de células espermáticas. En particular, la presente invención se refiere en general al enriquecimiento de una población de células espermáticas viables sin clasificar físicamente las células.

10

## Antecedentes

La fertilización de animales mediante inseminación artificial (IA) y el trasplante de embriones tras la fertilización in vitro es una práctica establecida. En la industria ganadera, la capacidad de afectar el resultado reproductivo hacia una progenie que tenga una o más características deseadas tiene ventajas evidentes. A modo de ejemplo, existiría un beneficio económico en la industria láctea para preseleccionar la progenie en favor de las hembras para asegurar la producción de vacas productoras de leche. La separación del esperma en poblaciones enriquecidas de células que contienen el cromosoma X y el cromosoma Y, conocida como semen enriquecido por género o esperma enriquecido por género, es un método para conseguir la progenie preseleccionada.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

Johnson et al. (patente de Estados Unidos n.º 5.135.759) describen la separación de poblaciones de esperma que contienen el cromosoma X y el cromosoma Y intactos de acuerdo con el contenido de ADN utilizando un citómetro de flujo/clasificador de células en poblaciones enriquecidas en esperma que contiene el cromosoma X y el cromosoma Y. Como se ha descrito, el esperma se combina con un colorante selectivo al ADN a una temperatura de 30°C a 39°C durante un periodo de 1 hora (39°C) a 1,5 horas (30°C). A continuación se usa un citómetro de flujo para medir la cantidad de luz fluorescente desprendida cuando el esperma pasa a través de un haz de rayos láser. Como el esperma que contiene el cromosoma X tiene más ADN que el esperma que contiene el cromosoma Y, aproximadamente de un 3 % a un 5 % dependiendo de la especie, el esperma que contiene el cromosoma X da como resultado una mayor intensidad de la luz fluorescente que el esperma que contiene el cromosoma Y. Las gotículas que contienen un único esperma de una intensidad fluorescente predeterminada reciben una carga y se desvían electrostáticamente a recipientes de recogida. La población de esperma enriquecido por género recogida se usa a continuación para la microinyección o la inseminación artificial. De forma notable, este método requiere que las células espermáticas se clasifiquen físicamente para conseguir la población de esperma enriquecido por género. La clasificación física de acuerdo con Johnson requiere tiempo y es costosa.

Koller et al. (documento WO 01/68110A) describen métodos y equipos para identificar selectivamente, y dirigir individualmente mediante un haz de energía, células específicas de una población de células mixtas para inducir una respuesta en las células diana.

Didion et al. (documento WO 02/41906A2) describen métodos, composiciones de materia, y equipos para clasificar esperma para producir subpoblaciones enriquecidas en esperma que contienen determinantes cromosómicos de la progenie de machos o hembras y describe además la preparación de células espermáticas tiñéndolas mediante colorantes de unión a ADN para las células espermáticas a baja temperatura en un citómetro de flujo.

## 45 Sumario de la invención

La presente invención se dirige a un proceso para disminuir selectivamente la capacidad de una subpoblación de células espermáticas no humanas en una dispersión de células espermáticas, el proceso comprende a) marcar una muestra de células espermáticas con una mezcla de marcado que incluye un agente químico que induce la inmovilidad del esperma y un colorante selectivo al ADN a una temperatura entre 30 °C y 39 °C para formar una dispersión de células espermáticas marcadas en un líquido, en el que la cantidad de marca asociada con una célula espermática indica una característica genética, estructural proteómica, o funcional de una subpoblación de células espermáticas en la dispersión, b) inspeccionar ópticamente la dispersión para identificar células espermáticas individuales como miembros de la subpoblación, c) determinar la posición de los miembros de la subpoblación en la dispersión; y d) suministrar una dosis de energía a diferentes posiciones en la dispersión para disminuir selectivamente la capacidad de los miembros de la subpoblación para fertilizar un óvulo sin afectar de forma similar las células espermáticas en otras posiciones en la dispersión para producir una población de células espermáticas enriquecidas.

Otros aspectos y características de la invención serán en parte evidentes y en parte se apuntan a partir de ahora en el presente documento.

## Descripción detallada de la invención

De manera ventajosa, una población de células espermáticas viables puede estar enriquecida con respecto a una característica de acuerdo con la presente invención sin clasificar físicamente las células. Esta característica puede

ser, por ejemplo, si las células espermáticas contienen un cromosoma X o un cromosoma Y. Como alternativa, la característica puede ser otra característica genética tal como la presencia de un polimorfismo de nucleótido único ("SNP") que codifica una productividad animal mejorada (tal como, por ejemplo, producción de leche mejorada) o que codifica un lípido para mejorar la crioconservación de las células seleccionadas. La característica puede ser también una característica proteómica tal como una proteína para mejorar el comportamiento del esperma, tal como, por ejemplo, una proteína que mejorare el comportamiento en el útero mejorando las características acrosómicas beneficiosas. La característica puede ser también una característica estructural, tal como, por ejemplo, integridad acrosómica, o una característica funcional, tal como, por ejemplo, motilidad progresiva.

El enriquecimiento de una población de células espermáticas con respecto a una característica genética, proteómica, estructural, o funcional se puede conseguir, por ejemplo, marcando las células espermáticas en la población que tiene (o, como alternativa, que carece) la característica, convirtiendo las células espermáticas en sustancialmente inmóviles, y dosificar selectivamente las células espermáticas inmóviles con una dosis de energía para disminuir la viabilidad de las células dosificadas o disminuir al menos la capacidad de las células dosificadas de fertilizar un óvulo in vitro o in vivo (es decir, tras la inseminación). Como las células espermáticas de la dispersión denominada algunas veces como suspensión, son sustancialmente inmóviles y están marcadas selectivamente, el haz de energía puede suministrarse a una posición específica de la dispersión para dosificar una célula espermática individual; repitiendo esta etapa de proceso, es decir, dosificando individualmente células espermáticas inmóviles en posiciones discretas en la dispersión, se puede enriquecer eficazmente una subpoblación de células espermáticas que tengan una característica deseada en la dispersión, por ejemplo, con respecto al porcentaje de células de la subpoblación que tiene la característica deseada; con respecto el porcentaje de progenie que tiene una determinada característica genética o proteómica como resultado de producirse mediante fertilización con las células espermáticas; o con respecto a ambas.

En cualquier caso, la población de células espermáticas puede estar enriquecida para una subpoblación concreta sin separar físicamente las células que tienen la característica deseada de las que carecen de la característica deseada (es decir, sin separar las células dosificadas de las células no dosificadas). Opcionalmente, puede conseguirse el enriquecimiento adicional de las células mediante purificación adicional de las células separando físicamente las células dosificadas y no dosificadas en subpoblaciones separadas de acuerdo con los métodos descritos a continuación.

#### Dispersión de células espermáticas

##### Densidad de las células espermáticas

Por lo general, las dispersiones de células espermáticas que tienen una población que puede estar enriquecida en alguna característica pueden prepararse con un amplio intervalo de densidades de células espermáticas. Normalmente, sin embargo, la densidad de células espermáticas será al menos de aproximadamente  $1 \times 10^3$  espermatozoides/ml, y generalmente no excede de aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  espermatozoides/ml, y más preferentemente no excede de aproximadamente  $5 \times 10^8$  espermatozoides/ml de dispersión. Por ejemplo, en un ejemplo, las dispersiones pueden contener espermatozoides en una densidad "relativamente baja", es decir, en una densidad de menos de aproximadamente  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml, preferentemente menos de aproximadamente  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml, más preferentemente aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml, aún más preferentemente aproximadamente  $1 \times 10^3$  a aproximadamente  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml, incluso de forma más preferente aproximadamente  $1 \times 10^4$  a aproximadamente  $1 \times 10^5$  espermatozoides/ml, y lo más preferente aproximadamente  $1 \times 10^5$  espermatozoides/ml de dispersión. En un ejemplo alternativo, las dispersiones pueden contener espermatozoides en una densidad "intermedia", es decir, en una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^7$  a aproximadamente  $1 \times 10^8$  espermatozoides/ml de dispersión. En otro ejemplo alternativo más, las dispersiones pueden contener espermatozoides en una densidad "relativamente elevada", es decir, en una densidad de al menos aproximadamente  $1 \times 10^8$  espermatozoides/ml, preferentemente aproximadamente  $1 \times 10^8$  a aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  espermatozoides/ml, más preferentemente aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  a aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  espermatozoides/ml, incluso de forma más preferente aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  a aproximadamente  $2 \times 10^8$  espermatozoides/ml, y lo más preferente aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  espermatozoides/ml de dispersión. De esta manera, por ejemplo, las dispersiones pueden contener al menos aproximadamente  $0,04 \times 10^6$  espermatozoides/ml de dispersión en un ejemplo; al menos aproximadamente  $1 \times 10^6$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $2 \times 10^6$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $3 \times 10^6$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $0,5 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $1 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $1,25 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $2 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $3 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $4 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $5 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $6 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $7,0 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $8 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $9 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $10 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $11 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $12 \times 10^7$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $1,25 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $1,75 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $2,0 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos

aproximadamente  $2,25 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $2,5 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $2,75 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $3 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $5 \times 10^8$  en otro ejemplo; al menos aproximadamente  $7,0 \times 10^8$  en otro ejemplo; o incluso al menos aproximadamente  $8 \times 10^8$  espermatozoides/ml de dispersión. En un ejemplo alternativo, la dispersión puede contener menos de aproximadamente  $9 \times 10^5$ , menos de aproximadamente  $7 \times 10^5$ , menos de aproximadamente  $5 \times 10^5$ , menos de aproximadamente  $2 \times 10^5$ , menos de aproximadamente  $1 \times 10^5$ , menos de aproximadamente  $1 \times 10^4$ , o incluso menos de aproximadamente  $1 \times 10^3$  espermatozoides/ml de dispersión.

La densidad de espermatozoides puede variar basándose en numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, las variaciones entre diferentes especies de mamíferos, las diferencias entre los mamíferos de una única especie, e incluso las variaciones entre diferentes eyaculados de un único mamífero. Por ejemplo, los espermatozoides de bovino pueden estar en una dispersión a una mayor densidad, pero normalmente en un volumen más pequeño, tal como por ejemplo  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides /ml a aproximadamente  $8 \times 10^7$  espermatozoides/ml en un volumen de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 25 ml. Los espermatozoides de porcino, sin embargo, pueden estar en una dispersión a una baja densidad, pero normalmente en un volumen mayor, tal como por ejemplo  $0,04 \times 10^6$  espermatozoides/ml a aproximadamente  $1 \times 10^7$  espermatozoides/ml en un volumen de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 250 ml.

La densidad de espermatozoides en las dispersiones de esperma puede depender también del método por el cual las células espermáticas pueden enriquecerse o clasificarse sustancialmente. Por ejemplo, las células espermáticas pueden clasificarse utilizando citometría de flujo como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 2005/0112541. En tal caso, la dispersión puede ser normalmente de densidad "intermedia" o "relativamente alta" de espermatozoides. Otras técnicas de clasificación o enriquecimiento, que se describe con mayor detalle en lo sucesivo, pueden beneficiarse de una densidad menor de espermatozoides, tal como una densidad "relativamente baja" de espermatozoides, marcados con un marcador, tales como, por ejemplo, los colorantes y marcas descritos en el presente documento.

La densidad de los espermatozoides en las dispersiones de esperma puede también manipularse artificialmente para conseguir una dispersión con una densidad específica de espermatozoides. Las manipulaciones de la densidad de espermatozoides en una dispersión de esperma, por ejemplo, en una pajilla de inseminación, pueden basarse en factores tales como la temperatura a la cual se puede almacenar la dispersión, la duración del periodo de almacenamiento, si los espermatozoides en la dispersión de esperma están clasificados o no, las especies de mamíferos machos de los que se recogieron los espermatozoides, la fertilidad del mamífero del que se recogieron los espermatozoides, y las especies de mamíferos hembras que se van a inseminar.

La densidad de los espermatozoides en una dispersión de esperma puede también verse afectada mediante concentración simple de los espermatozoides, tal como por ejemplo, mediante centrifugación. En tal caso, la dispersión se separaría sustancialmente en lo que se denomina comúnmente como aglomerado (una masa de células que contiene una cantidad mínima de fluido) y un sobrenadante (una fracción líquida soluble). El sobrenadante puede decantarse a continuación sin perturbar el aglomerado, dando como resultado por tanto un aglomerado relativamente denso de células espermáticas que contiene una cantidad mínima del inhibidor, siendo el efecto reducir el volumen de la dispersión sin cambiar los componentes de la dispersión. Como resultado, las células espermáticas del aglomerado permanecen en un estado inmóvil.

#### 45 Inmovilidad de las células espermáticas

La dispersión de células espermáticas contiene células espermáticas que tienen una motilidad sustancialmente reducida. Se puede conseguir una reducción sustancial de la motilidad de las células espermáticas en la dispersión de células espermáticas de numerosas maneras, incluyendo, por ejemplo, poner en contacto las células espermáticas con un inhibidor de la motilidad, reducir la temperatura de las células espermáticas o del entorno inmediato que rodea las células espermáticas (es decir, la dispersión espermática), o mediante una combinación de ambos. Las células espermáticas en la dispersión espermática pueden comportarse, en determinados aspectos, de una manera característica de los espermatozoides del epidídimo; por ejemplo, las células espermáticas de la población son sustancialmente inmóviles y/o pueden tener una menor velocidad de respiración endógena en comparación con los espermatozoides lavados o eyaculados recientemente. De manera ventajosa, las células espermáticas inmóviles, denominadas algunas veces células espermáticas quiescentes, tienen la capacidad, tras la separación del inhibidor(es) o la exposición a un aumento en la temperatura, de comportarse de una manera característica de los espermatozoides eyaculados (y no característica de los espermatozoides del epidídimo) con respecto a la motilidad.

En un ejemplo, el inhibidor, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambas reduce la velocidad de la ruta (denominada algunas veces motilidad o motilidad de la ruta), velocidad progresiva (denominada algunas veces movilidad progresiva), o ambos, determinadas mediante el análisis HTM-IVOS del esperma (sistema de análisis del esperma asistido por ordenador Hamilton-Thorne HTM-IVOS de Hamilton-Thorne Research, Beverly MA) de al menos aproximadamente un 50 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie.

Preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambos, como se ha medido mediante el análisis HTM-IVOS del esperma, de al menos aproximadamente un 60 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Más preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambos, como se ha medido mediante el análisis HTM-IVOS del esperma, de al menos aproximadamente un 70 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. De forma aún más preferente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambos, como se ha medido mediante el análisis HTM-IVOS del esperma, de al menos aproximadamente un 80 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Incluso más preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambos, como se ha medido mediante el análisis HTM-IVOS del esperma, de al menos aproximadamente un 90 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Incluso más preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambos, como se ha medido mediante el análisis HTM-IVOS del esperma, de al menos aproximadamente un 95 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. De manera más preferida, el inhibidor de la movilidad reduce la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambos, como se ha medido mediante un análisis HTM-IVOS del esperma, de al menos aproximadamente un 99 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la velocidad de la ruta, la velocidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie.

Se puede usar un inhibidor de la movilidad para reducir sustancialmente la movilidad de las células espermáticas en la dispersión de células espermáticas. El inhibidor puede ser cualquiera de una gama de composiciones que tienen un efecto depresor de la movilidad del esperma. Dichas composiciones incluyen, por ejemplo, inhibidores del canal de sodio, tal como, ouabaina; composiciones que comprenden iones potasio; y composiciones que comprenden iones potasio y sodio. Por ejemplo, concentraciones relativamente altas de iones potasio en la dispersión tienden a deprimir la motilidad del esperma. Por lo general, por tanto, se prefiere que la dispersión contenga una fuente de iones potasio y que la concentración de potasio en la dispersión sea al menos de aproximadamente 0,05 moles/l. Más preferentemente, la concentración de potasio puede ser al menos aproximadamente de 0,05 moles/l a aproximadamente 0,5 moles/l. De forma aún más preferente, la concentración de potasio puede ser al menos aproximadamente de 0,1 moles/l a aproximadamente 0,3 moles/l. De manera más preferida, la concentración de potasio puede ser de aproximadamente 0,173 moles/l. Dichas dispersiones contendrán normalmente, pero no de manera necesaria, una fuente de iones sodio. Cuando está presente sodio, la relación molar de potasio a sodio es generalmente igual a o mayor de 1:1, respectivamente, pero generalmente no excederá de una relación molar de 8:1. Preferentemente, la relación molar de potasio a sodio es al menos de aproximadamente 1,25:1, De forma aún más preferente, la relación molar de potasio a sodio es al menos de aproximadamente 1,5:1, De forma aún más preferente, la relación molar de potasio a sodio es al menos de aproximadamente 1,75:1, De forma aún más preferente, la relación molar de potasio a sodio es al menos de aproximadamente 1,78:1, En un ejemplo concreto, la relación molar de potasio a sodio puede ser al menos de aproximadamente 2:1. En otro ejemplo más, la relación molar de potasio a sodio puede ser al menos de aproximadamente 3:1. En otro ejemplo más, la relación molar de potasio a sodio puede ser al menos de aproximadamente 4:1. En otro ejemplo más, la relación molar de potasio a sodio puede ser al menos de aproximadamente 5:1. En otro ejemplo más, la relación molar de potasio a sodio puede ser al menos de aproximadamente 6:1. En otro ejemplo más, la relación molar de potasio a sodio puede ser al menos de aproximadamente 7:1. En otro ejemplo más, la relación molar de potasio a sodio puede ser al menos de aproximadamente 8:1.

La dispersión del esperma puede comprender adicionalmente un ion o una fuente de dióxido de carbono capaz de potenciar la regulación por defecto de la motilidad. En un ejemplo, la fuente de dióxido de carbono puede ser, por ejemplo, uno o más carbonatos. En un ejemplo, la dispersión del esperma comprende  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{KHCO}_3$ , proporcionando por tanto una fuente de iones potasio y sodio, así como una presión parcial aumentada del dióxido de carbono (con respecto a la atmósfera ambiente). Por ejemplo, la dispersión puede comprender  $\text{NaHCO}_3$  y  $\text{KHCO}_3$  en una solución acuosa, preferentemente  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{KHCO}_3$ , y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  en agua; por lo general, la concentración de  $\text{KHCO}_3$  en la dispersión puede ser al menos aproximadamente de 0,05 moles/l. Más preferentemente, la concentración de  $\text{KHCO}_3$  puede ser al menos aproximadamente de 0,05 moles/l a aproximadamente 0,5 moles/l. De forma aún más preferente, la concentración de  $\text{KHCO}_3$  puede ser al menos aproximadamente de 0,1 moles/l a aproximadamente 0,3 moles/l. En un ejemplo, la dispersión puede formarse utilizando un inhibidor de la motilidad que comprende 0,097 moles/l de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,173 moles/l de  $\text{KHCO}_3$ , 0,090 moles/l de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  en agua como se describe en Salisbury & Graves, J. *Reprod. Fertil.*, 6:351-359 (1963). Las células espermáticas permanecerán generalmente quiescentes siempre que se expongan al (a los) inhibidor(es) de la motilidad.

65

5 Cuando  $C_6H_8O_7-H_2O$  está presente en la dispersión, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $NaHCO_3$  puede ser como se ha descrito anteriormente. La relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  puede ser generalmente igual a o mayor de 1:1, respectivamente, pero generalmente no excederá de una relación molar de 8:1. Preferentemente, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 1,25:1. De forma aún más preferente, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 1,5:1. De forma aún más preferente, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 1,75:1. En un ejemplo, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 2:1. En otro ejemplo más, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 3:1. En otro ejemplo más, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 4:1. En otro ejemplo más, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 5:1. En otro ejemplo más, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 6:1. En otro ejemplo más, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 7:1. En otro ejemplo más, la relación molar de  $KHCO_3$  a  $C_6H_8O_7-H_2O$  es al menos de aproximadamente 8:1. En un ejemplo particularmente preferido, la dispersión puede formarse utilizando un tampón inhibidor que comprende 0,097 moles/l de  $NaHCO_3$ , 0,173 moles/l de  $KHCO_3$ , 0,090 moles/l de  $C_6H_8O_7-H_2O$  en agua como se describe en Salisbury & Graves, J. *Reprod. Fertil.*, 6:351-359 (1963). Las células espermáticas permanecerán generalmente quiescentes siempre que se expongan al (a los) inhibidor(es) de la motilidad.

20 Las evidencias experimentales hasta la fecha sugieren además que la salud global y otras características vitales de las células espermáticas pueden mejorarse si la dispersión del esperma se mantiene en una atmósfera que reduce o evita la difusión del oxígeno en la dispersión. Esto se puede conseguir sustituyendo la atmósfera de gas por encima de la dispersión del esperma con una atmósfera que tenga una presión parcial potenciada de, por ejemplo, dióxido de carbono, nitrógeno, u otros gases inertes con respecto al aire ambiente. En un ejemplo, la dispersión puede mantenerse en una atmósfera que tenga una presión parcial potenciada de dióxido de carbono con respecto al aire. En otro ejemplo, la atmósfera sobre la dispersión tiene una presión parcial de dióxido de carbono de al menos aproximadamente 0,0001 atm (10,13 Pa), pero generalmente menos de aproximadamente 5 atm (506,72 kPa) a presión atmosférica. En un ejemplo, la presión parcial del dióxido de carbono puede ser aproximadamente de 0,5 atm (50,67 kPa) a aproximadamente 2 atm (202,65 kPa) a presión atmosférica; en otro ejemplo, la presión parcial del dióxido de carbono puede ser aproximadamente de 0,9 atm (91,2 kPa) a aproximadamente 2 atm (202,65 kPa) a presión atmosférica; en otro ejemplo, la presión parcial del dióxido de carbono puede ser de aproximadamente 0,95 atm (96,26 kPa) a aproximadamente 2 atm a presión atmosférica. En un ejemplo particularmente preferido, la atmósfera sobre la dispersión tiene una presión parcial de dióxido de carbono de al menos 0,9 atm (91,2 kPa); más preferentemente, al menos aproximadamente 0,95 atm (96,26 kPa).

35 Como alternativa, o además del uso de un inhibidor de la motilidad, la temperatura de las células espermáticas o la dispersión puede estar alterada a fin de inducir a las células espermáticas a volverse inmóviles. Se puede inducir la inmovilidad del esperma inducida por la temperatura, por ejemplo, reduciendo la temperatura de las células espermáticas o la dispersión de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 15 °C, preferentemente de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C; más preferentemente de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, de forma aún más preferente desde aproximadamente 3 °C a aproximadamente 6 °C, e incluso de forma más preferente de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 5 °C, y de forma aún más preferente aproximadamente 5 °C. Preferentemente, sin embargo, las células espermáticas no se exponen a temperaturas que afecten negativamente a la viabilidad de las células o afecten significativamente la capacidad de las células espermáticas de unirse o captar una marca.

45 En otro ejemplo, la temperatura de las células espermáticas o la dispersión del esperma puede alterarse de tal manera que las células espermáticas o la dispersión del esperma puede ser a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 50 °C, -preferentemente de aproximadamente 7 °C a aproximadamente 43 °C; más preferentemente de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 39 °C; de forma aún más preferente de aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C; y lo más preferente de aproximadamente 17 °C a aproximadamente 25 °C. En una realización especialmente preferida, la temperatura de las células espermáticas o de la dispersión que las rodea puede ser de aproximadamente 4 °C.

55 Las células espermáticas pueden exponerse a la temperatura reducida y, por tanto, volverse sustancialmente inmóviles, en cualquier momento una vez que las células se han obtenido del mamífero fuente. Por ejemplo, se puede reducir la temperatura de las células espermáticas, induciendo por tanto la inmovilidad del esperma, tras la recogida de las células del mamífero fuente, tras combinar las células con un tampón, tras la formación de la mezcla de marcado, incluyendo antes, durante, o después del proceso de marcado, o tras la formación de la dispersión de las células marcadas. En general, sin embargo, se puede inducir la inmovilidad del esperma mediante una reducción de la temperatura antes de la inspección óptica de la dispersión.

65 Por ejemplo, se puede reducir la temperatura de las células espermáticas (es decir, se puede inducir la inmovilidad del esperma) posterior al marcado de las células, permitiendo por tanto que se produzca el marcado a una temperatura más preferida como se describe a continuación. En un ejemplo, se puede reducir la temperatura de las células espermáticas o de la dispersión que las rodea (es decir, se puede inducir la inmovilidad del esperma) tras el marcado y antes de la inspección óptica de las células.

La exposición de las células espermáticas al inhibidor, a temperatura reducida, o a una combinación de ambas induce que las células espermáticas se vuelvan inmóviles. En una realización, por ejemplo, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas de al menos un 60 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas de al menos un 70 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Más preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas de al menos un 80 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas de al menos un 90 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie. Preferentemente, el inhibidor de la movilidad, la reducción de la temperatura, o una combinación de ambos reduce la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas de al menos un 99 % de las células espermáticas en la dispersión con respecto a la motilidad, la motilidad progresiva, o ambas, de las células espermáticas en un eyaculado reciente de la misma especie.

Las células se vuelven preferentemente inmóviles, independientemente del método utilizado, durante un tiempo suficiente para permitir la inspección óptica de la dispersión, la determinación de la posición de las células miembro de la subpoblación; y la dosificación de las células miembro de la subpoblación con una fuente de energía. Si se desea separar físicamente las células dosificadas de las células no dosificadas, puede preferirse también mantener las células espermáticas en un estado inmóvil a través de esta etapa de proceso. De manera similar, si las células espermáticas se van a crioconservar, se pueden mantener en un estado inmóvil durante la etapa de crioconservación (independientemente de si las células dosificadas se separaron físicamente de las células no dosificadas antes de la crioconservación). En una realización preferida, las células se mantienen inmóviles durante la etapa de crioconservación.

Puede devolverse a las células inmóviles a un estado activo, es decir, comportamiento característico de un eyaculado reciente, separando las células del inhibidor de la motilidad, exponiéndolas al aire, aumentando la temperatura de las células o la dispersión celular (preferentemente a la temperatura típica de los espermatozoides eyaculados recientemente), mediante dilución con suero salino fisiológico (Salisbury et al., 1963) o un tampón tal como un tampón TCA o PBS, o cualquier combinación de los anteriores, dependiendo de, por ejemplo, el método usado para inducir la inmovilidad. Normalmente, al menos aproximadamente un 20 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 50 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 60 %, y de forma más preferente al menos un 70 %, aún de forma más preferente al menos un 80 %, aún de forma más preferente al menos un 90 %, y de forma más preferente al menos un 95 %, y lo más preferente al menos aproximadamente un 99 % de las células que vuelven a un estado activo (es decir, las células reactivadas) tendrán una velocidad de ruta, la velocidad progresiva, o ambas, como se ha medido mediante el análisis HTM-IVOS del esperma, que es al menos aproximadamente un 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente un 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, y de forma más preferente al menos un 80 %, aún de forma más preferente al menos un 90 %, aún de forma más preferente al menos un 95 %, y lo más preferente al menos aproximadamente un 99 % de la velocidad de ruta, la velocidad progresiva, o ambas de las células espermáticas antes de combinarse con el inhibidor de la motilidad (es decir, de las células espermáticas de un eyaculado reciente).

#### Recogida de las células de un mamífero

Se conocen diversos métodos de recogida de esperma viable. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, el método de la mano enguantada, el uso de una vagina artificial, y la electroeyaculación.

En el momento de la recogida, o posteriormente, el esperma recogido puede combinarse con cualquiera de numerosos tampones diferentes que sean compatibles con el esperma, tales como TCA, HEPES, PBS, o cualquier otro tampón descrito en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US 2005/0003472. Por ejemplo, se puede recoger una muestra de semen de bovino, que contiene normalmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10.000 millones de células espermáticas por mililitro, directamente del mamífero fuente en un recipiente que contiene un tampón para formar una suspensión de esperma. Como alternativa, la muestra de semen puede recogerse en un recipiente vacío y a continuación ponerse en contacto posteriormente con un tampón de varios minutos a horas tras la recogida para formar la suspensión de esperma.

Como alternativa, las células espermáticas pueden recogerse directamente con un inhibidor de la motilidad en lugar de o además de un tampón, formando por tanto una dispersión de esperma. Las células espermáticas pueden recogerse directamente del animal en un recipiente que contiene un inhibidor de la motilidad para formar la dispersión del esperma, o como alternativa, pueden recogerse en un recipiente vacío y a continuación combinarse posteriormente con un inhibidor de la motilidad en varios minutos (o incluso horas) de recogida para formar la dispersión del esperma.

La dispersión del esperma puede contener también un intervalo de aditivos diferentes para potenciar la viabilidad del esperma. Los aditivos ilustrativos incluyen fuentes de proteínas, antibióticos, factores de crecimiento, y composiciones que regulan las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente. Son bien conocidos en la técnica los ejemplos de cada uno de estos aditivos, como se ha demostrado en la divulgación de, por ejemplo, las solicitudes estadounidenses con números de serie 60/557.407 y 11/092.313.

#### Marcado de las células

Las células espermáticas se pueden marcar con cualquiera de numerosas marcas diferentes, incluyendo marcas que se unen al exterior de la célula (tales como, por ejemplo, anticuerpos marcados fluorescentemente) así como marcas que cruzan la membrana celular y se unen a los contenidos internos de la célula (tales como, por ejemplo, colorantes fluorescentes selectivos para el ADN). En general, el proceso de marcado comprende poner en contacto las células espermáticas con una concentración de marca (formando por tanto una mezcla de marcado, denominada algunas veces mezcla de tinción), a una temperatura y un pH que permiten una unión rápida y eficaz o la captación de la marca, durante un tiempo suficientemente largo para obtener el grado deseado de marcado, sin afectar sustancialmente la viabilidad de las células.

El esperma puede estar en la forma de un semen puro, o como alternativa, un derivado de semen que contiene esperma obtenido mediante centrifugación o el uso de otros medios para separar el semen en fracciones. Las células espermáticas se ponen en contacto a continuación o se combinan de otra forma con la marca para formar una mezcla de marcado; opcionalmente, la marca puede estar en la forma de un sólido o una solución. En general, sin embargo, la marca, las células espermáticas, o ambas están en un medio tal como un tampón.

Las células espermáticas pueden combinarse con un tampón para formar una suspensión de esperma. Se puede usar cualquiera de numerosos tampones diferentes que sean compatibles con el esperma, tales como por ejemplo, TCA, HEPES, PBS, o los tampones descritos en la publicación de patente de Estados Unidos n.º US 2005/0003472. Una vez formada, la suspensión de esperma puede combinarse con una fuente de una marca para formar una mezcla de marcado; opcionalmente, la marca puede estar en forma sólida o líquida y, como opción adicional, puede comprender adicionalmente cualquiera de los tampones anteriormente mencionados.

En un ejemplo, la marca puede combinarse con un tampón para formar una suspensión marcada y la suspensión marcada combinarse con una fuente de esperma en la forma de semen puro, un derivado de semen que contiene esperma, o una suspensión de esperma para formar una mezcla de marcado.

Se puede usar tampón que contenga un inhibidor de la motilidad para formar la mezcla de marcado. Por ejemplo, se puede incluir el inhibidor de la motilidad en el tampón usado para formar una suspensión de esperma (que se combina a continuación con la marca) o una suspensión de marcado (que se combina a continuación con una fuente de esperma) para formar la mezcla de marcado. En cualquier caso, el resultado es una dispersión de esperma que contiene un inhibidor de la motilidad y una marca.

Se puede formar la mezcla de marcado utilizando cualquiera de numerosas marcas, tales como por ejemplo, uno o más colorantes excitables por UV o luz visible, colorantes selectivos para el ADN, como se ha descrito previamente en la patente de Estados Unidos n.º 5.135.759 y en el documento WO 02/41906. Los colorantes excitables a la luz UV ilustrativos selectivos para el ADN incluyen Hoechst 33342 y Hoechst 33258, cada uno de los cuales está comercialmente disponible de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Los colorantes excitables a la luz visible ilustrativos incluyen SYBR-14, comercialmente disponible de Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) y el conjugado de bisbenzimidazol-BODIPY<sup>®</sup> 6-[[3-((2Z)-2-[[1-(difluoroboril)-3, 5-dimetil-1H-pirrol-2-il] metileno] -2H-pirrol-5-il) propanoil] amino]-N-[3-(metil {3-[[4-[6-(4-metilpiperazin-1-ilo)-1H, 3'H-2,5'-bibenzimidazol-2'-il]fenoxi[acetil]amino]propil]amino)-propil]hexanamida ("BBC") descrito en el documento WO 02/41906. Cada uno de estos colorantes puede usarse solo o en combinación; como alternativa, se pueden usar otros colorantes excitables al UV y a la luz visible que penetran en las células, solos o combinados con los colorantes anteriormente mencionados, con la condición de que el colorante no afecte negativamente a la viabilidad de las células espermáticas hasta un grado inaceptable cuando se usa en concentraciones que permiten la clasificación como se describe en otra parte.

Como alternativa, la mezcla de marcado se puede formar utilizando poliamidas fluorescentes, y más específicamente poliamidas con una marca fluorescente o un indicador conjugado al anterior. Dichas marcas fluorescerán cuando se unan a los ácidos nucleicos. Los ejemplos de poliamidas con una marca o indicador fluorescente unido al anterior incluyen, por ejemplo, las descritas en Best et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(21): 12063-12068 (2003); Gygi, et al., Nucleic Acids Res., 30(13): 2790-2799 (2002); patente de Estados Unidos n.º 5.998.140; patente de Estados Unidos n.º 6.143.901; y la patente de Estados Unidos n.º 6.090.947.

Se pueden usar también secuencias de nucleótidos fluorescentes para marcar las células espermáticas. Dichas secuencias de nucleótidos fluorescen cuando se hibridan con un ácido nucleico que contiene una diana o una secuencia complementaria, pero sin embargo no son fluorescentes cuando están en un estado no hibridado. Se



describen dichos oligonucleótidos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0113765.

5 Se pueden usar también anticuerpos específicos de sexo para marcar las células espermáticas en una mezcla de marcado. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo específico de sexo con un resto fluorescente (o una molécula indicadora equivalente). Como el anticuerpo se une a los antígenos presentes solamente en una célula que contiene un cromosoma X o, alternativamente, un cromosoma Y, se pueden identificar selectivamente dichas células basándose en su fluorescencia (frente a la no fluorescencia de una célula sin marcar). Además, se puede usar de forma simultánea más de un anticuerpo específico de sexo, teniendo cada anticuerpo un resto fluorescente diferente unido al anterior. Esto permite la diferenciación de las células que contienen un cromosoma X y un cromosoma Y basándose en la fluorescencia diferente de cada uno.

15 Se pueden usar también nanocristales luminiscentes selectivos al color para marcar células espermáticas en una mezcla de marcado. Denominadas también puntos cuánticos, estas partículas son bien conocidas en la materia, como se ha demostrado mediante la patente de Estados Unidos n.º 6.322.901 y la patente de Estados Unidos patente n.º 6.576.291. Estos nanocristales se han conjugado con numerosos materiales biológicos, incluyendo, por ejemplo, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, estreptavidina, y polisacáridos, (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 6.207.392; 6.423.551; 5.990.479, y 6.326.144), y se han usado para detectar dianas biológicas (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 6.207.392 y 6.247.323).

20 La concentración preferida de la marca en la mezcla de marcado es función de diferentes variables entre las que se incluyen, por ejemplo, si la marca se une al exterior de la célula o si debe cruzar la membrana celular; si debe cruzar la membrana celular, la permeabilidad de las células a la marca seleccionada; la temperatura de la mezcla de marcado; el lapso de tiempo que se deja para que se produzca la mezcla; y el grado de selectividad deseado. Por lo general, la concentración de la marca es preferentemente suficiente para conseguir el grado deseado de marcado de las células en un periodo de tiempo razonablemente corto sin afectar sustancialmente de forma perjudicial la viabilidad del esperma. Por ejemplo, la concentración de Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYBR-14, o BBC, en la mezcla de marcado estará generalmente entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 1,0 M, preferentemente de aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 700  $\mu\text{M}$ , y más preferentemente de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ . La concentración de Hoechst 33342, Hoechst 33258, SYBR-14, o BBC, en la mezcla de tinción puede ser generalmente de aproximadamente 400  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , y lo más preferente aproximadamente 450  $\mu\text{M}$ . De acuerdo con ello, para un conjunto de condiciones de marcado, la concentración de Hoechst 33342 es preferentemente de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ . En otro conjunto de condiciones de marcado, la concentración de Hoechst 33342 es aproximadamente 150  $\mu\text{M}$ . En otro conjunto adicional de condiciones de marcado, la concentración es preferentemente de aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ . En otro conjunto más de condiciones de marcado, la concentración de Hoechst 33342 es lo más preferente de aproximadamente 450  $\mu\text{M}$ .

40 Como ejemplo adicional, la concentración de una poliamida fluorescente, tales como por ejemplo, las descritas en la publicación de aplicación de Estados Unidos n.º 2001/0002314, estará generalmente entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{M}$  y aproximadamente 1 mM, preferentemente entre aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM, más preferentemente de aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ , incluso más preferentemente aproximadamente 10  $\mu\text{M}$ .

45 Una vez formada, la mezcla de marcado se puede mantener en cualquiera de un intervalo de temperaturas. Por ejemplo, el marcado con Hoechst 33342 o Hoechst 33258 se llevará a cabo normalmente en un intervalo de aproximadamente 4°C a aproximadamente 50°C. Por ejemplo, la mezcla de marcado puede mantenerse a una temperatura "relativamente baja", es decir, una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 30°C; preferentemente de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, y lo más preferente a aproximadamente 28 °C. Como alternativa, y de acuerdo con la presente invención, la mezcla de marcado puede mantenerse en un intervalo de temperatura "intermedio", es decir, una temperatura de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 39°C. En otro ejemplo, la mezcla de marcado puede mantenerse en un intervalo de temperatura "relativamente alto", es decir, una temperatura de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50°C; preferentemente de aproximadamente 40°C a aproximadamente 45°C, más preferentemente de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 43 °C, lo más preferente a aproximadamente 41°C. La selección de una temperatura preferida depende generalmente de una gama de variables, incluyendo, por ejemplo, si la marca se une al exterior de la célula o si debe cruzar la membrana celular; si debe cruzar la membrana celular, la permeabilidad de las células a la marca seleccionada; la concentración de la(s) marca(s) en la mezcla de marcado; el lapso de tiempo que se deja para que se produzca la mezcla; y el grado de selectividad deseado.

60 El pH de la mezcla de marcado puede mantenerse a cualquiera de un intervalo de pH. Por ejemplo, el marcado con Hoechst 33342 o Hoechst 33258 se llevará a cabo normalmente en un intervalo de pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 9,0. Por ejemplo, la mezcla de marcado puede mantenerse a un pH "ligeramente ácido", es decir, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0. En un ejemplo, el pH puede ser preferentemente de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 7,0, más preferentemente de aproximadamente 6,0 a aproximadamente

6,5, y lo más preferente a aproximadamente 6,2. En un ejemplo alternativo, la mezcla de marcado puede mantenerse a un pH "ligeramente básico", es decir, de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 9,0. El pH puede ser preferentemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,0, más preferentemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5, y lo más preferente a aproximadamente 7,3. En general, sin embargo, si el marcado se lleva a cabo a un pH diferente de aproximadamente 7,0, una vez durante un periodo de tiempo suficiente para obtener que se produzca el grado deseado de marcado, la mezcla de marcado se ajustará a un pH de aproximadamente 7,0.

Opcionalmente, la mezcla de marcado puede contener también aditivos para potenciar la viabilidad del esperma. Los aditivos ilustrativos incluyen un antibiótico, un factor de crecimiento, o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente como se ha descrito anteriormente a la recogida de muestras celulares. Estos aditivos pueden añadirse a la mezcla de marcado de acuerdo con lo anteriormente expuesto.

Se deja que la captación de la marca por o la unión de la marca a las células espermáticas en la mezcla de marcado transcurra durante un periodo de tiempo suficiente para obtener una dispersión de células espermáticas marcada en el grado deseado. Este periodo es normalmente un periodo suficiente para que la marca se una a las células espermáticas o al ADN de las células espermáticas de tal manera que un miembro de una subpoblación de células puede identificarse en su posición en la dispersión determinada. La selección de un periodo preferido depende generalmente de un intervalo de variables, incluyendo, por ejemplo, si la marca se une al exterior de la célula o si debe cruzar la membrana celular; si debe cruzar la membrana celular, la permeabilidad de las células a la marca seleccionada; la concentración de la(s) marca(s) en la mezcla de marcado; la temperatura de la mezcla de marcado; y el grado de selectividad deseado. Por ejemplo, el periodo puede ser un periodo suficiente para que un colorante fluorescente selectivo al ADN se una al ADN de las células espermáticas que contienen el cromosoma X y el cromosoma Y de tal manera que se puedan seleccionar basándose en la diferenciación y en la intensidad de la fluorescencia medibles entre las dos. Cuando, se realiza el marcado con Hoechst 33342 o Hoechst 33258, por ejemplo, normalmente, este periodo no será superior a aproximadamente 160 minutos, preferentemente no superior a aproximadamente 90 minutos, de forma aún más preferente no superior a aproximadamente 60 minutos, y lo más preferente no superior a aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 40 minutos.

Determinadas marcas, y en particular determinados colorantes, son capaces de penetrar en las células espermáticas y unirse específicamente al ADN sin intervención adicional para aumentar la permeabilidad de las células. Con otras marcas, sin embargo, puede ser deseable tratar las células espermáticas antes del marcado para aumentar la velocidad de permeación sin reducir de forma inaceptable la viabilidad o la motilidad. Se puede usar cualquier método conocido por los expertos en la materia. Dichos métodos incluyen la electroporación, el uso de soluciones potenciadoras de la permeación celular, por ejemplo, tensioactivos suaves, o choque químico. Cuando se desea o es ventajoso utilizar otras técnicas más rigurosas, dichos tratamientos pueden incluir el uso de liposomas o muchas de las técnicas que usan los expertos en la materia para colorantes, tintes, genes, o vectores en células vivas. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a microinyección tal como se ha utilizado por Gordon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77(12): 7380-4 (1980)) y desde entonces se ha extendido a conejos, ovejas, ganado y cerdos; transferencia mediada por DEAE-dextrano; coprecipitación con fosfato de calcio; y otras técnicas, todas las cuales son conocidas por un experto en la materia. En otros casos, puede ser deseable centrifugar el esperma y volver a suspender el esperma centrifugado en otro medio, basándose prácticamente en el mismo o sustancialmente el mismo sistema tampón, para eliminar determinados componentes (que se habían añadido previamente a la dispersión de esperma) que pueden interferir con etapas de procesamiento posteriores.

Un método particularmente preferido de aumentar la permeabilidad de una célula espermática a una marca es el método bien conocido de optoinyección que se describe en la patente de Estados Unidos n.º 6.753.161. En general, la optoinyección es un método de permeabilizar transitoriamente una célula poniendo en contacto la célula con un pulso de radiación. Se ilumina una célula, se identifica y se localiza basándose en la detección de la iluminación de la célula, y se irradia con un pulso de radiación suficiente para permeabilizar transitoriamente la célula. Por ejemplo, se puede usar la optoinyección para permeabilizar transitoriamente células espermáticas y permitir por tanto que se unan marcas al contenido interno de una célula (tal como, por ejemplo, marcas que se unen a ADN o ARN) para penetrar más fácil y eficazmente en las células. Por tanto, se puede usar la optoinyección, por ejemplo, para disminuir el tiempo necesario para marcar suficientemente las células espermáticas con un colorante fluorescente selectivo al ADN, tal como Hoechst 33342, Hoechst 33258, o con una poliamida fluorescente.

Se puede usar también la optoinyección para marcar células a temperaturas reducidas. Anteriormente, las células espermáticas se marcaban generalmente con, por ejemplo, colorantes fluorescentes selectivos al ADN, a temperaturas superiores a 30 °C e incluso 40 °C, ya que las temperaturas más elevadas ayudaban a aumentar la captación de colorante. Aunque el marcado a dichas temperaturas es ciertamente factible, puede ser beneficioso evitar la exposición de las células espermáticas a mayores temperaturas, especialmente durante un periodo de tiempo prolongado. Por tanto, se puede usar la optoinyección para permeabilizar las células espermáticas, permitiendo de esta forma el marcado de las células a una temperatura menor, manteniendo o excediendo además a la vez la eficacia de la tinción y la velocidad típicamente asociada con el marcado a temperaturas mayores.

Por ejemplo, la mezcla de marcado se puede formar utilizando comprendiendo células espermáticas, un inhibidor de la motilidad, y un colorante en una concentración de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{M}$ , y la mezcla de tinción se mantiene durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 41 °C. En otro ejemplo, el inhibidor de la motilidad comprende 0,204 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,433 g de  $\text{KHCO}_3$ , y 0,473 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,173 moles/l de  $\text{KHCO}_3$ , 0,090 moles/l  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  en agua).

En un ejemplo, la mezcla de marcado se puede formar utilizando comprendiendo células espermáticas, un inhibidor de la motilidad, y un colorante en una concentración de aproximadamente 400  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , y la mezcla de tinción se mantiene durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 41 °C. En otro ejemplo, la concentración del colorante puede ser de 450  $\mu\text{M}$ . En otro ejemplo, el inhibidor de la motilidad comprende 0,204 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,433 g de  $\text{KHCO}_3$ , y 0,473 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,173 moles/l de  $\text{KHCO}_3$ , 0,090 moles/l  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  en agua).

En otro ejemplo más, la mezcla de marcado se puede formar utilizando comprendiendo células espermáticas, un inhibidor de la motilidad, y un colorante en una concentración de aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 200  $\mu\text{M}$  y la mezcla de tinción se mantiene durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 28 °C. En otro ejemplo, el inhibidor de la motilidad comprende 0,204 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,433 g de  $\text{KHCO}_3$ , y 0,473 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,173 moles/l de  $\text{KHCO}_3$ , 0,090 moles/l  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  en agua).

En otro ejemplo más, la mezcla de marcado se puede formar utilizando comprendiendo células espermáticas, un inhibidor de la motilidad, y un colorante en una concentración de aproximadamente 400  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{M}$ , y la mezcla de tinción se mantiene durante un periodo de tiempo a una temperatura de aproximadamente 28 °C. En otro ejemplo, la concentración del colorante puede ser de 450  $\mu\text{M}$ . En otra realización, el inhibidor de la motilidad comprende 0,204 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,433 g de  $\text{KHCO}_3$ , y 0,473 g de  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  por 25 ml de agua purificada (0,097 moles/l de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,173 moles/l de  $\text{KHCO}_3$ , 0,090 moles/l  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{-H}_2\text{O}$  en agua).

Formación de una dispersión de células marcadas

Una vez que se forma una mezcla de marcado, la mezcla de marcado se usa para formar una dispersión de células marcadas, que posteriormente se inspecciona y dosifica. Dicha dispersión comprende células espermáticas marcadas y un agente químico que induce la inmovilidad del esperma. Como alternativa, o además de, la dispersión puede comprender un líquido, tal como un tampón como se ha descrito anteriormente, además de las células espermáticas marcadas, y en el que la temperatura de las células o el líquido induce la inmovilidad del esperma.

Las células espermáticas marcadas pueden estar en cualquiera de numerosas formas. Por ejemplo, las células marcadas pueden además ser parte de la mezcla de marcado. De este modo, las células marcadas pueden estar además en exceso o en una marca sin unir. Como alternativa, las células marcadas pueden haber sido separadas de cualquier exceso o en una marca sin unir, tal como por ejemplo lavando las células o centrifugando las células, tal como mediante centrifugación, y a continuación separando las células de la marca sin unir. En tal caso, las células marcadas se combinarán posteriormente con un tampón como se ha descrito anteriormente con respecto a la recogida de una muestra de células. En cualquier caso, las células espermáticas de la dispersión se marcan de tal manera que la ausencia o la cantidad de la marca asociada con una o más de las células espermáticas permite la identificación de una característica genética, proteómica, estructural, o funcional de una subpoblación de células espermáticas en la dispersión. Las células espermáticas pueden mantenerse a una temperatura que induce o aumenta la inmovilidad del esperma.

La dispersión de las células marcadas puede contener también un agente químico que induce la inmovilidad del esperma, tal como, por ejemplo, un inhibidor de la motilidad como se ha descrito anteriormente. Se puede añadir el agente químico a la mezcla de marcado o a las células marcadas en cualquier momento antes de la inspección óptica de la dispersión, tales como por ejemplo, antes, durante, o después del marcado de las células espermáticas. El agente químico puede combinarse con células marcadas, estando las células marcadas en cualquiera de las numerosas formas descritas anteriormente (es decir, aún en la mezcla de marcado o extraídas de la misma). En un ejemplo concreto, puede formarse una mezcla de marcado que comprende células espermáticas y una marca, y a continuación se puede combinar la mezcla de marcado con el agente químico que induce la inmovilidad del esperma. Como alternativa, o además del agente químico, se puede reducir la temperatura de la mezcla de marcado como se ha descrito anteriormente para inducir o aumentar la inmovilidad del esperma.

Inspección, determinación, y dosificación de las células

Una vez que se ha formado una dispersión de células marcadas, la dispersión se examina ópticamente para identificar las células espermáticas individuales como miembros de la subpoblación, se determinan las posiciones de los miembros de la subpoblación en la dispersión, y se suministra un haz de energía en diferentes posiciones en la dispersión para dosificar selectivamente a los miembros de la subpoblación con una fuente de energía,

disminuyendo por tanto la viabilidad de las células dosificadas, o al menos su capacidad para fertilizar un óvulo, sin afectar de forma similar a las células espermáticas en otras posiciones en la dispersión.

5 Estas etapas se llevan a cabo normalmente mediante un dispositivo que se denomina de forma comercial  
 Plataforma Tecnológica LEAP<sup>®</sup> (análisis y procesamiento conseguido por láser) (Cyntellect, Inc., San Diego, CA). En  
 general, este proceso requiere que las células se marquen con un marcador para identificar y localizar células  
 individuales de una subpoblación de células en una mezcla o una población más grande de células. A continuación  
 se ilumina la población de células, permitiendo identificar la posición de las células individuales de la subpoblación. A  
 10 continuación se sitúa un tratamiento con láser de tal manera que pueda emitir un haz de energía para inducir un  
 cambio en las células identificadas de la subpoblación. El cambio inducido es usualmente la muerte celular. Estos  
 procesos y dispositivos se describen adicionalmente en las patentes de Estados Unidos con números 6.534.308;  
 6.514.722; 6.753.161; y 6.642.018.

15 La fuente de energía utilizada puede ser cualquier fuente que, cuando se aplica en una determinada dosis a las  
 células espermáticas, disminuye la viabilidad de las células dosificadas, o al menos su capacidad para fertilizar un  
 óvulo, con efecto mínimo o sin efecto similar para las células espermáticas situadas en otras posiciones de la  
 dispersión. Normalmente, la fuente de energía estará en la forma de un haz de energía. Los ejemplos de fuentes de  
 energía adecuadas que incluyen láseres, luz no de láser colimada o focalizada, energía RF, partículas aceleradas,  
 20 energía ultrasónica focalizada, haces de electrones, u otros haces de radiación. Preferentemente, sin embargo, la  
 fuente de energía es un láser, ya que un láser proporciona las ventajas de una elevada intensidad y un uso  
 relativamente eficaz de la energía en un tamaño compacto con mínima generación de calor, permitiendo por tanto la  
 dosificación de una célula individual sin afectar significativamente de forma adversa las células que los rodean.

25 Las células se pueden colocar en cualquier superficie adecuada para la inspección óptica y la dosificación de las  
 células. En general, dichas superficies tendrán una superficie horizontal (tanto la parte superior, la parte inferior, o  
 ambas), que es ópticamente transparente para la fuente de energía utilizada para inspeccionar ópticamente las  
 células, así como la fuente de energía utilizada para dosificar los miembros de la subpoblación. Dichas superficies  
 adecuadas incluyen, por ejemplo, vidrio, plásticos u otros polímeros relacionados, y Pyrex<sup>®</sup>, y pueden estar en la  
 30 forma de un porta plano, una placa Petri, una placa de un único pocillo, o una placa de muchos pocillos. Se  
 describen ejemplos en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 6.534.308 y 6.514. 722.

Se puede dividir una muestra de células espermáticas en varias muestras individuales más pequeñas, tales como  
 por ejemplo, dividiéndose en varias muestras individuales para su uso con una placa de muchos pocillos. Cada  
 35 muestra (por ejemplo, en cada pocillo) puede enriquecerse para la misma característica, produciendo por tanto  
 múltiples muestras, cada una de las cuales está enriquecida una única característica. De manera ventajosa, sin  
 embargo, cada una de las muestras puede enriquecerse para una característica diferente. A modo de ejemplo, una  
 muestra de células espermáticas puede dividirse en muestras individuales más pequeñas, y cada muestra individual  
 colocarse en un pocillo de una placa de 96 pocillos. La muestra individual de cada pocillo puede a continuación  
 40 enriquecerse con respecto a una única característica diferente de la de las muestras en cada uno de los otros  
 pocillos, dando como resultado 96 muestras individuales, cada una enriquecida con respecto a una característica  
 diferente.

Una vez que las células miembros de la subpoblación se han dosificado con una fuente de energía, la población de  
 45 células se puede enriquecer purificando las células no dosificadas (es decir, las células espermáticas que no se  
 dosificaron con energía). Se puede producir la purificación de las células no dosificadas mediante la eliminación  
 tanto de las células dosificadas como de las células no dosificadas de la dispersión, dando como resultado una  
 subpoblación que comprende células no dosificadas que están enriquecidas para una característica concreta. Por  
 ejemplo, si la característica concreta son las células espermáticas que contienen el cromosoma Y, las células no  
 50 dosificadas pueden purificarse de tal manera que comprendan al menos aproximadamente un 85 % de células  
 espermáticas que contienen el cromosoma Y; preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de células  
 espermáticas que contienen el cromosoma Y; más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de células  
 espermáticas que contienen el cromosoma Y; incluso de forma más preferente al menos un 97 % de células  
 espermáticas que contienen el cromosoma Y, - y lo más preferido al menos un 99 % de células espermáticas que  
 55 contienen el cromosoma Y. Como alternativa, si la característica concreta deseada son las células espermáticas que  
 contienen el cromosoma X, las células no dosificadas pueden purificarse de tal manera que comprendan al menos  
 aproximadamente un 85 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X; preferentemente al menos  
 aproximadamente un 90 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X; más preferentemente al menos  
 60 aproximadamente un 95 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X; incluso de forma más preferente  
 al menos un 97 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X; y lo más preferente al menos  
 aproximadamente un 99 % de células que contienen el cromosoma X.

La eliminación tanto de las células dosificadas como de las células no dosificadas procedentes de la dispersión  
 dosificada (es decir, procedente de la población más grande de células espermáticas que comprenden las células  
 65 dosificadas y las no dosificadas) puede conseguirse mediante cualquiera de numerosos medios conocidos en la  
 materia. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, centrifugando la dispersión completa, tal como mediante  
 centrifugación, y a continuación retirando o absorbiendo el sobrenadante que contiene las células dosificadas. Otro

método incluye la adición de medio de alta densidad a la dispersión. Los medios de alta densidad que se pueden añadir a la dispersión incluyen, por ejemplo, Percoll<sup>®</sup> e Isolate<sup>®</sup>. En general, en una separación de alta densidad, células viables (es decir, células no dosificadas con respecto a la presente solicitud) son capaces de flotar hacia la parte superior del medio de alta densidad y pueden por tanto separarse de la parte superior del medio, mientras que las células dañadas o muertas (es decir, las células dosificadas) seguirán dispersas en el medio de alta densidad, generalmente en la fase voluminosa. Son bien conocidos en la materia los métodos para utilizar dichos medios.

De manera ventajosa, una dispersión de células marcadas puede contener una subpoblación de células marcadas con diferentes marcas. Cada marca puede identificar una característica diferente, proteómica, estructural, o funcional de una subpoblación de células espermáticas en la dispersión. Además, cada marca puede ser detectable individualmente cuando se une a una célula espermática; es decir, es posible detectar por separado las diferentes marcas. Por ejemplo, cada una de las marcas puede fluorecer a diferentes longitudes de onda.

Se puede añadir una marca diferente a la mezcla de marcado o a la dispersión de las células marcadas. Como alternativa, una marca diferente puede añadirse posteriormente a cualquiera de las etapas de inspección, determinación, o dosificación de las células. Preferentemente, sin embargo, se añadirá posteriormente una marca diferente a la dosificación de la dispersión. Por ejemplo, una vez que se han dosificado los miembros de una subpoblación de células espermáticas, la dispersión dosificada (incluyendo las células dosificadas y las células no dosificadas) o una dispersión dosificada purificada (incluyendo solo las células no dosificadas) puede marcarse de nuevo, pero con una marca diferente, y se puede repetir el proceso de inspección, determinación, y dosificación de las células, generalmente como se ha descrito anteriormente, basándose en la ausencia o en la cantidad de las diferentes marcas asociadas con una célula espermática.

En general, se puede utilizar la marca diferente para identificar una característica genética adicional, proteómica, estructural, o funcional de las células no dosificadas que pueden ser diferentes de la característica usada para identificar previamente los miembros de una subpoblación a los cuales se administró una dosis de energía (es decir, que es diferente de la característica usada para determinar previamente las células que se van a dosificar o que no se van a dosificar). Esto proporciona una manera de enriquecer adicionalmente una población de células ya enriquecida.

A modo de ejemplo, la dispersión de células marcadas puede formarse utilizando colorante fluorescente selectivo para ADN. A continuación, la dispersión puede inspeccionarse ópticamente para identificar células espermáticas individuales que contienen un cromosoma X. La posición de las células que contienen el cromosoma X puede determinarse posteriormente, y a continuación se puede suministrar una dosis de energía a una o más de las células que contienen el cromosoma X, consiguiendo por tanto una población de células viables que contienen el cromosoma Y enriquecido. A continuación, la dispersión dosificada (que incluye tanto células dosificadas (que contienen el cromosoma X) y como no dosificadas (que contienen el cromosoma Y)) o una dispersión dosificada purificada (que incluye solo las células no dosificadas) puede marcarse con otra marca que indique la integridad acrosómica, tales como por ejemplo, aglutinina de cacahuete conjugada con ficoeritrina (PE-PNA) que induce la fluorescencia de la célula, y en particular la fluorescencia acrosómica, cuando se pone en contacto con una célula que tiene un acrosoma que se ha hecho reaccionar o dañado. Se pueden llevar a cabo a continuación las etapas de identificación y determinación óptica de la posición de las células fluorescentes con PE-PNA, y dosificar dichas aquellas células con energía. El resultado es una subpoblación de células no dosificadas que contienen el cromosoma Y y que tienen acrosomas que no han reaccionado y no están dañados (es decir, están intactos). Véase, por ejemplo, Nagy y col., *Biol Reprod*, 68: 1828-1835 (2003).

#### Crioextensión de las células

Una vez que las células miembros de la subpoblación se han dosificado con una fuente de energía, la población completa de células espermáticas (células dosificadas y células no dosificadas) o un subconjunto de la población (las células no dosificadas solo) puede enfriarse o congelarse para su uso en una fecha posterior, por ejemplo, en procedimientos de fertilización. En dichos casos, las células espermáticas no dosificadas pueden beneficiarse de la adición de un crioextensor para minimizar el impacto tras la viabilidad o la motilidad posterior a la congelación como resultado del enfriamiento y la congelación.

En general, un crioextensor puede comprender una fuente de proteína, un crioprotector, y un inhibidor de la motilidad. Si se incluye, se puede añadir una fuente de proteínas para proporcionar soporte a las células. La fuente de proteínas puede ser cualquier fuente de proteínas que no interfiera con la viabilidad de las células espermáticas no dosificadas y sea compatible con el inhibidor de la motilidad. Los ejemplos de fuentes de proteínas comunes incluyen leche (incluyendo leche homogeneizada y desnatada tratada térmicamente), extracto lácteo, yema de huevo, extracto de yema de huevo, proteína de soja y extracto de proteína de soja. Dichas proteínas pueden encontrarse en una concentración de aproximadamente 10 % (v/v) a aproximadamente 30 % (v/v), preferentemente de aproximadamente 10 % (v/v) a aproximadamente 20 % (v/v), y más preferentemente aproximadamente un 20 % (v/v).

Se puede incluir preferentemente un crioprotector en el criextensor para disminuir o evitar el choque frío o para mantener la fertilidad de las células espermáticas no dosificadas. Se conocen en la materia numerosos crioprotectores. Puede variar la selección de un crioprotector adecuado para su uso con un extensor dado, y depende de las especies a partir de las cuales se obtuvieron los espermias que se iban a congelar. Los ejemplos de crioprotectores adecuados incluyen, por ejemplo, glicerol, dimetil sulfóxido, etilenglicol, propilenglicol, trehalosa, Triladyl<sup>®</sup>, y combinaciones de los mismos. Si se incluye, en general, estos crioprotectores están presente en el criextensor en una cantidad de aproximadamente 1 % (v/v) a aproximadamente 15 % (v/v), preferentemente en una cantidad de aproximadamente 5 % (v/v) a aproximadamente 10 % (v/v), más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 7 % (v/v), y lo más preferente en una cantidad de aproximadamente 6 % (v/v).

Además, el criextensor puede contener un inhibidor de la motilidad como se ha descrito anteriormente con respecto a la recogida de muestras celulares. El (los) inhibidor (es) de la motilidad pueden añadirse al criextensor de acuerdo con lo anterior.

En un ejemplo, el criextensor comprende un inhibidor de la motilidad, agua, Triladyl<sup>®</sup>, yema de huevo, y ácido pirúvico. En otro ejemplo más, el criextensor comprende 0,097 moles/l de NaHCO<sub>3</sub>, 0,173 moles/l de KHCO<sub>3</sub>, 0,090 moles/l de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O en agua, y 25 g de Triladyl<sup>®</sup>, 25 g de yema de huevo, y ácido pirúvico 10 mM por 75 ml de agua.

En otro ejemplo concreto, el criextensor comprende un inhibidor de la motilidad, agua, Triladyl<sup>®</sup>, y yema de huevo. En otro ejemplo más, el criextensor comprende 0,097 moles/l de NaHCO<sub>3</sub>, 0,173 moles/l de KHCO<sub>3</sub>, 0,090 moles/l de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>-H<sub>2</sub>O en agua, y 25 g de Triladyl<sup>®</sup>, y 25 g de yema de huevo por 75 ml de agua.

Opcionalmente, el criextensor puede contener también un antibiótico o una composición que regula las reacciones de oxidación/reducción intracelular y/o extracelularmente como se ha descrito anteriormente con respecto a la recogida de muestras celulares. Se puede añadir cada uno de estos aditivos al criextensor de acuerdo con lo anterior.

La crioconservación de la población completa de esperma (es decir, la crioconservación de la dispersión dosificada) da como resultado la formación de una dispersión congelada que tiene dos subpoblaciones, siendo cada una de estas dos subpoblaciones sustancialmente diferente de la otra. Sin embargo, cada subpoblación se compone de células sustancialmente homogéneas. Es decir, cada subpoblación está comprendida por células, cada una de las células individuales de una subpoblación individual tiene una característica común a cada una de las otras células en la misma subpoblación. En el ejemplo, la dispersión puede enriquecerse además antes de la crioconservación purificando la dispersión, en función de la presencia o la ausencia de la(s) característica(s) común(es), de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Por tanto, por ejemplo, el presente proceso podría utilizarse para formar una dispersión de esperma congelado, comprendiendo la dispersión una subpoblación dosificada de células, en la que todas las células de la subpoblación dosificada son células que contienen el cromosoma X, y una subpoblación no dosificada de células, en la que todas las células de la subpoblación no dosificada son células que contienen el cromosoma Y. De acuerdo con este ejemplo, las células que no reciben una dosis de energía (es decir, las células no dosificadas que contienen el cromosoma Y) comprenderán al menos aproximadamente un 85 % de células espermáticas que contienen el cromosoma Y; preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de células espermáticas que contienen el cromosoma Y; más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de células espermáticas que contienen el cromosoma Y; incluso de forma más preferente al menos aproximadamente un 97 % de células espermáticas que contienen el cromosoma Y; y lo más preferente al menos aproximadamente un 99 % de células que contienen el cromosoma Y.

Como alternativa, el presente proceso podría utilizarse para formar una dispersión de esperma congelado, comprendiendo la dispersión una subpoblación dosificada de células, en el que todas las células de la subpoblación dosificada son células que contienen el cromosoma Y, y una subpoblación no dosificada de células, en la que todas las células de la subpoblación no dosificada son células que contienen el cromosoma X. De acuerdo con este ejemplo, las células no dosificadas que contienen el cromosoma X comprenderán al menos aproximadamente un 85 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X; preferentemente al menos aproximadamente un 90 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X; más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X, incluso de forma más preferente al menos un 97 % de células espermáticas que contienen el cromosoma X; y lo más preferente al menos aproximadamente un 99 % de células que contienen el cromosoma X.

#### Fertilización

Se puede usar un novedoso proceso para fertilizar un óvulo o un mamífero hembra para disminuir selectivamente la viabilidad de una subpoblación de células espermáticas en una dispersión celular como se ha descrito anteriormente.

Una vez que se ha producido la dosificación de la dispersión de las células marcadas, se puede usar la dispersión dosificada (que comprende tanto las células dosificadas como no dosificadas) para fertilizar un mamífero hembra. La fertilización se puede llevar a cabo de acuerdo con cualquiera de los numerosos métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Estos métodos incluyen, por ejemplo, microinyección, inseminación artificial, y otros métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, una dispersión dosificada que comprende las células dosificadas y no dosificadas, dispersión purificada que comprende solo las células no dosificadas, o un derivado de cualquiera de las anteriores, se puede usar para inseminar un mamífero hembra, tales como por ejemplo, mediante inseminación artificial.

- 5
- 10 Como alternativa, una vez que se ha producido la dosificación de la dispersión de las células marcadas, la dispersión puede utilizarse para fertilizar un óvulo, y más especialmente, un óvulo in vitro. El óvulo fertilizado puede introducirse posteriormente en el útero de un mamífero hembra mediante cualquiera de numerosos medios bien conocidos por los expertos en la materia, tales como por ejemplo el trasplante de embriones. Por ejemplo, se puede utilizar una dispersión dosificada, una dispersión purificada, o un derivado de cualquiera para fertilizar un óvulo in vitro. Posteriormente, el óvulo fertilizado puede introducirse en el útero de un mamífero hembra.
- 15

Se puede producir la fertilización de un mamífero hembra o de un óvulo in vitro usando cualquiera de las dispersiones anteriormente mencionadas dosificando poco después que se ha completado la dispersión, tales como por ejemplo, en aproximadamente 7 días, preferentemente en aproximadamente 5 días, más preferentemente en aproximadamente 3 días, aún más preferentemente en aproximadamente 2 días, y en un ejemplo, en aproximadamente 1 día después que se ha completado la dispersión. En tal caso, la dispersión, en general, puede no haberse criopreservado antes de la fertilización de un mamífero hembra o de un óvulo in vitro (es decir, la dispersión es reciente o comprende células espermáticas recientes); en vez de esto, puede haberse mantenido en un inhibidor de la motilidad y/o puede haberse refrigerado a temperaturas de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 7 °C, más preferentemente de aproximadamente 3 °C a aproximadamente 5 °C, y lo más preferente a aproximadamente 4°C. Como alternativa, la dispersión puede criopreservarse y a continuación descongelarse antes de la fertilización de un mamífero hembra o de un óvulo in vitro (es decir, la dispersión se congela/descongela o comprende células espermáticas congeladas/descongeladas). Normalmente, en dicho caso, la dispersión criopreservada se descongelará inmediatamente antes de la fertilización de un mamífero hembra o de un óvulo in vitro.

20

25

30

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para disminuir selectivamente la capacidad de una subpoblación de células espermáticas no humanas en una dispersión de células espermáticas comprendiendo el proceso:
- 10 a) marcar una muestra de células espermáticas con una mezcla de marcado que incluye un agente químico que induce la inmovilidad del esperma y un colorante selectivo al ADN a una temperatura entre 30 °C y 39 °C para formar una dispersión de células espermáticas marcadas en un líquido, en el que la cantidad de marca asociada con una célula espermática indica una característica genética, estructural proteómica, o funcional de una subpoblación de células espermáticas en la dispersión;
- 15 b) inspeccionar ópticamente la dispersión para identificar células espermáticas individuales como miembros de la subpoblación;
- c) determinar la posición de los miembros de la subpoblación en la dispersión; y
- d) suministrar una dosis de energía a diferentes posiciones dentro de la dispersión para disminuir selectivamente la capacidad de los miembros de la subpoblación para fertilizar un óvulo sin afectar de forma similar las células espermáticas en otras posiciones en la dispersión para producir una población de células espermáticas enriquecidas.
- 20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la cantidad de la marca asociada con la célula espermática indica que la célula espermática es una célula espermática que contiene un cromosoma X o una célula espermática que contiene un cromosoma Y.
- 25 3. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la marca se selecciona entre el grupo que consiste en colorantes fluorescentes, colorantes selectivos para el ADN, poliamidas, oligonucleótidos, y un polipéptido que se une a una característica específica superficial de una célula espermática.
- 30 4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por que la marca es un colorante fluorescente selectivo para ADN.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado por que la marca es Hoechst 33342, Hoechst 33258 o SYBR-14.
- 35 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la dosis de energía se selecciona entre el grupo que consiste en haces de radiación, haces láser, luz no de láser colimada, luz no de láser focalizada, y energía ultrasónica focalizada.
7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el proceso comprende además purificar las células espermáticas que no reciben una dosis de energía, las células no dosificadas.
- 40 8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que purificar las células no dosificadas comprende centrifugar la dispersión y retirar las células dosificadas.
9. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que inspeccionar ópticamente la dispersión para identificar células espermáticas individuales como miembros de la subpoblación comprende inspeccionar ópticamente una imagen capturada de las células.
- 45 10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que antes de inspeccionar ópticamente la dispersión, la dispersión se distribuye en una placa con muchos pocillos.
- 50 11. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la dosis de energía es suficiente para disminuir la viabilidad y/o producir la muerte de los miembros de la subpoblación en comparación con la viabilidad de las células espermáticas que no reciben una dosis de energía.
- 55 12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el proceso comprende además crioconservar la dispersión posterior para suministrar la dosis de energía.
13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado por que el mamífero hembra es un bovino, equino, porcino, o cerdo.
- 60 14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, caracterizado por que la dispersión se crioconserva.
- 65 15. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que el proceso comprende además:



- 5
- a) marcar la dispersión dosificada con una marca adicional, en la que la presencia, ausencia o cantidad de marca asociada con una célula espermática indica una característica genética, proteómica, estructural, o funcional de una subpoblación de células espermáticas en la dispersión dosificada;
  - b) inspeccionar ópticamente la dispersión dosificada para identificar las células espermáticas individuales con la marca adicional;
  - c) determinar la posición de las células espermáticas asociadas con la marca adicional en la dispersión dosificada; y
  - d) suministrar una dosis de energía en diferentes posiciones en la dispersión.