

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 753**

21 Número de solicitud: 201500752

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

G01N 1/08 (2006.01)

12

ADICIÓN A LA PATENTE DE INVENCÓN

B1

22 Fecha de presentación:

20.10.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.04.2017

Fecha de concesión:

24.01.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.01.2018

61 Número y fecha presentación solicitud principal:

P 201201020 10.10.2012

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)

**Otri - Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias s/n
41012 Sevilla (Sevilla) ES**

72 Inventor/es:

RISCO DELGADO , Ramón Jesús

54 Título: **Adición a la Patente P201201020 "Procedimiento y dispositivo de vitrificación de material biológico mediante microcapilares de polímeros termoplásticos cerrados utilizando un recalentamiento ultra-rápido".**

57 Resumen:

El dispositivo de vitrificación de material biológico mediante microcapilares de polímeros termoplásticos cerrados utilizando un recalentamiento ultra-rápido, objeto de la presente invención, consiste en un contenedor compuesto por varias partes, fabricado en polímero termoplástico, optimizado como sistema cerrado para los procedimientos de criopreservación, para obtener, junto con el procedimiento reivindicado, velocidades de recalentamiento ultra-altas siendo de especial utilidad para la criopreservación de ovocitos humanos en condiciones de máxima seguridad biológica (dispositivo cerrado) y máxima tasa de supervivencia de los ovocitos, similar a la de los dispositivos abiertos actuales, tras el recalentamiento.

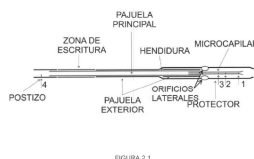


FIGURA 2.1

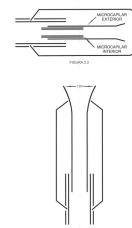


FIGURA 2.2

DESCRIPCIÓN

Adición a la patente P201201020 "Procedimiento y dispositivo de vitrificación de material biológico mediante microcapilares de polímeros termoplásticos cerrados utilizando un recalentamiento ultra-rápido"

5

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención es una adición a la patente P201201020 de título "Procedimiento y dispositivo de vitrificación de material biológico mediante microcapilares de polímeros termoplásticos cerrados utilizando un recalentamiento ultra-rápido" y tiene por objeto un dispositivo que consiste en un contenedor compuesto por varias partes, entre ellos preferentemente dos microcapilares fabricados en polímero termoplástico, optimizado como sistema cerrado para los procedimientos de criopreservación, para obtener, junto con el procedimiento reivindicado, velocidades de recalentamiento ultra-altas.

15

El procedimiento y el dispositivo se encuadran en el sector de la técnica dedicado a la biotecnología y a la biomedicina. Es de aplicación en todos los procesos relacionados con la manipulación y tratamiento de material biológico a nivel celular. Y más en concreto, en los procesos relacionados con la conservación de este material biológico en condiciones que permitan su uso posterior tras un tiempo indefinido de almacenamiento a temperaturas criogénicas. En particular, este procedimiento y dispositivo son de especial utilidad para la criopreservación de ovocitos humanos en condiciones de máxima seguridad biológica (dispositivo cerrado) y máxima tasa de supervivencia de los ovocitos, similar a la de los dispositivos abiertos actuales, tras el recalentamiento (velocidad de recalentamiento ultra-alta).

25

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las principales técnicas empleadas para conseguir la conservación celular se basan en la utilización de bajas temperaturas para ralentizar y detener las reacciones bioquímicas responsables del envejecimiento y deterioro del material biológico. Dentro de estas técnicas, las más ampliamente utilizadas son las llamadas de enfriamiento lento y las de vitrificación, con un gran número de variantes en ambos casos.

30

El enfriamiento lento es hasta ahora el procedimiento más usado [15,17]. Se basa en el control de la velocidad de enfriamiento con el fin de crear un delicado equilibrio entre los distintos factores que causan daño celular, entre los que se encuentran la formación de hielo, fracturas y una excesiva deshidratación. Es sin embargo la otra

35

técnica, la vitrificación, descrita a continuación y desarrollada en detalle a lo largo del resto de este apartado, la tecnología que ahora nos ocupa.

La vitrificación es un proceso mediante el cual un líquido se solidifica en una fase no cristalina (fase vítrea) [6]. Para conseguirla, en el caso de la vitrificación celular, se obliga a: i) un aumento en la viscosidad (mediante la sustitución del agua por agentes vitrificantes) y, sobre todo, ii) usando un rápido descenso de la temperatura de la célula (generalmente sumergiendo la muestra en nitrógeno líquido). Este enfriamiento rápido de la muestra impide que las moléculas de agua tengan tiempo de ordenarse para crear la estructura cristalina del hielo, formando por lo tanto un sólido amorfo. La mayoría de las sustancias que se mantienen en estado líquido en un amplio rango de temperaturas vitrifican al ser enfriadas, y el resto de sustancias también vitrifican si el enfriamiento es suficientemente rápido. La vitrificación elimina completamente la aparición de cristales de hielo, los cuales suponen el mayor obstáculo para la criopreservación de células vivas [34]. Esta técnica ha mejorado en gran medida los resultados obtenidos por el enfriamiento lento, aunque todavía es insuficiente para la criopreservación en contenedores *cerrados* de determinados tipos celulares, como es el caso de los ovocitos [7], o de las células madre [8], en donde la sensibilidad celular exige una mejora de los métodos utilizados en la actualidad.

i) Para aumentar la viscosidad se han probado distintas combinaciones de agentes vitrificantes, también llamados crioprotectores. No es objeto de la presente invención la optimización o propuesta de alguna forma de agente vitrificante en concreto. En general, en el caso de ovocitos, los mejores resultados hasta la fecha parecen obtenerse mediante el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) y el etilenglicol (EG) [24].

ii) Para conseguir una alta velocidad de enfriamiento de la célula, esta se suele sumergir en nitrógeno líquido. Del dispositivo y procedimiento utilizado para enfriar la muestra depende críticamente la velocidad de enfriamiento, habiéndose probado el uso de mezclas criogénicas distintas al nitrógeno líquido [16], la vitrificación sobre superficies sólidas[2, 5], etc... Hay dos grandes grupos de dispositivos y procedimientos: a) los que se basan en contenedores cerrados y b) los que se basan en contenedores abiertos.

a) Los que se basan en contenedores *cerrados* no permiten obtener, hasta la fecha, altas tasas de supervivencia en el caso particular de ovocitos. Sin embargo, sí son empleados con frecuencia para otros tipos celulares, como embriones, donde aquí los resultados sí son satisfactorios. La filosofía tras

estos contenedores es la utilización de altas concentraciones de agentes vitrificantes y la utilización de un enfriamiento rápido de la muestra [3, 35].

- b) Los que se basan en contenedores *abiertos* sí consiguen una alta tasa de supervivencia de ovocitos. Son los que de hecho se están utilizando en la actualidad para la conservación de óvulos [2, 4, 5, 10, 12, 13, 14, 20, 32, 33, 35]. En estos contenedores el ovocito se coloca sobre una superficie generalmente plana y siempre abierto. El ovocito queda unido a esta plataforma gracias al uso de un medio muy viscoso, usualmente rico en azúcares que, a modo de melaza, lo mantiene físicamente pegado a esta. Tras ello, y para conseguir la máxima velocidad de enfriamiento, se retira todo el medio sobrante que pueda recubrir el ovocito, quedando el ovocito al descubierto; por ello estas técnicas se llaman técnicas de mínimo volumen, pues la filosofía tras ella es la de minimizar el volumen de la muestra a vitrificar. Como es mínimo el volumen de muestra que está en contacto con el nitrógeno líquido, ello hace que la velocidad de enfriamiento sea muy alta. Sin embargo estos contenedores abiertos, que sí permiten la vitrificación de ovocitos, generan un doble problema, por su naturaleza de abiertos: a) Por un lado, al estar abierto, la muestra corre riesgo de pérdida en su manipulación (en la entrada en el nitrógeno líquido, durante el tiempo de almacenamiento en la cántara de almacenaje o durante el recalentamiento posterior cuando se procede a su introducción dentro de una gota de medio de recalentamiento; b) Pero, sobre todo, el mayor problema asociado al uso de contenedores abiertos es el riesgo potencial de contaminación [9, 19] (al entrar la muestra en contacto con el nitrógeno líquido), ya sea contaminación vírica, bacteriana, o de cualquier otro tipo.

Sin embargo, recientemente ha habido un cambio de paradigma en la vitrificación de ovocitos: no es cuestión de mínimo volumen ni de maximizar la velocidad de enfriamiento; se trata, realmente, de maximizar la velocidad de recalentamiento. Se ha probado cómo velocidades de enfriamiento muy bajas (95 °C/min) pueden dar tasas de recuperación de ovocitos muy altas SIEMPRE Y CUANDO la velocidad de RECALENTAMIENTO sea suficientemente alta [18, 28, 29, 30, 31]

La presente invención no está basada en una técnica de mínimo volumen o en una alta velocidad de enfriamiento, sino en una velocidad de recalentamiento ultra-alta. La combinación del dispositivo y procedimiento reivindicados consigue velocidades de recalentamiento por encima de 200.000 °C/min (Fig. 9). Obviamente, la ventaja del uso

de un contenedor cerrado con la misma tasa de recuperación de ovocitos que la de los contenedores abiertos es doble: a) por un lado evita la eventual pérdida del ovocitos, pero, b) sobre todo, elimina la posibilidad de contaminación (vímica, bacteriana o de cualquier otro tipo) de la muestra, al no estar nunca en contacto con el nitrógeno líquido.

Por tanto, y en resumen, la patente de invención objeto de la presente memoria se refiere a un nuevo procedimiento y dispositivo de criopreservación de material biológico en general y de ovocitos en particular, con las siguientes tres particularidades:

- 1) La principal característica de este procedimiento y dispositivo es que, siendo cerrado, garantiza una velocidad de recalentamiento por encima de 200.000 °C/min (Figura 8). Es la velocidad de recalentamiento, y no la velocidad de enfriamiento o el volumen mínimo de la muestra, como ocurre en los dispositivos o procedimientos citados anteriormente, lo que determina el éxito del presente método. Esta es la diferencia fundamental con el resto de sistemas cerrados para la conservación de ovocitos.
- 2) El almacenamiento del ovocito se produce en un contenedor cerrado que consigue la vitrificación de las muestras con unas tasas de recuperación iguales o superiores a las de cualquier dispositivo abierto. El procedimiento se basa en el uso de uno o preferentemente dos microcapilares concéntricos fabricados en polímeros termoplásticos de reducidas dimensiones que almacenan y mantienen a la muestra localizada en todo momento.
- 3) La entrada de la muestra al interior del contenedor se produce preferentemente gracias a un embudo dispuesto en el extremo del microcapilar exterior que facilita y elimina cualquier contacto de la superficie externa del capilar con el medio que contenía la muestra biológica para así garantizar la no contaminación del mismo.

La patente de invención objeto de la presente memoria es una continuación del desarrollo de la técnica del propio autor [11, 21, 22, 23, 25, 26, 27].

DOCUMENTOS RELEVANTES

- 5 1. Arav A, Zeron Y, Ocheretny Y, A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes, *Theriogenology* 53 (2000) 248
- 10 2. Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL, Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods, *Theriogenology* 59 (2003) 1839–1850.
- 15 3. Check JH, Advances in oocyte cryopreservation--part II: rapid cooling using vitrification. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2009;36(1):5-9.
- 20 4. Cowley CW, Timson WJ, Sawdye JA, Ultra rapid cooling techniques in the freezing of biological materials, *Biodynamica* 8 (1961) 317–329.
- 25 5. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X, High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer, *Biol. Reprod.* 63 (2000) 513–518.
- 30 6. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT . *Cryobiology.* 1984 Aug;21(4):407-26. Vitrification as an approach to cryopreservation.
- 35 7. Gardner DK, *In vitro fertilization, a practical approach*, Taylor & Francis; Édition : 1 (29 septembre 2006).
8. Gouk SS, Tan CKF, Hande MP, Poonepalli A, Dawe GS and Kuleshova LL, Protein- and serum-free vitrification of neural stem cells, *Cryobiology*, Volume 53, Issue 3, December 2006, 389.
9. Grout BW, Morris GJ. Contaminated liquid nitrogen vapour as a risk factor in pathogen transfer. *Theriogenology.* 2009 Apr 15;71(7):1079-82.

10. Gutnisky C, Alvarez GM, Cetica PD, Dalvit GC. Evaluation of the Cryotech Vitrification Kit for bovine embryos. *Cryobiology*. 2013 Dec;67(3):391-3.
- 5 11. He X, Elmoazzen HY, Risco R, Doughty M, Park EYH, Fowler A, Yarmush ML, Toner M. Vitrification of mammalian cells by Ultra-fast cooling using a low concentration of cryoprotectants with quartz capillaries *Cryobiology*, Volume 55, Issue 3, 359 (2007).
- 10 12. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. P, Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, *Reprod Biomed Online*, 2005;11;300-308.
- 15 13. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK, Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique, *Fertil Steril*, 1999;72;1073-1078.
- 20 14. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT, Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos, *Nat. Biotechnol.* 17 (1999) 1234–1236.
- 25 15. Mazur P, *Cryobiology: the freezing of biological systems*, *Science* 168 (1970) 939–949.
- 30 16. Mazur P, Cole KW, Schreuders PD, Mahowald AP, Contributions of cooling and warming rate and developmental stage to the survival of *Drosophila* embryos cooled to -205 °C, *Cryobiology* 30 (1993) 45–73.
- 35 17. Mazur P, Leibo S, Chu EH, A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells, *Exp. Cell Res.* 71 (1972) 345–355.
18. Mazur P, Seki S. Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196 °C at 95° to 70,000°C/min and warmed at 610° to 118,000°C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*. 2011 Feb;62(1):1-7.

19. Morris GJ. A simple assay system to monitor the potential for contamination during different stages of cryopreservation. *Cryo Letters*. 2009 Jan-Feb;30(1):13-8.
- 5 20. Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M and Takahashi K, Succesful birth after transfer of vitrified human blastocysts with us of a cryoloop containerless technique, *Fertil. Steril*. 76 (2001) 618-620.
- 10 21. Olmo A, Baena R, Risco R. Use of a droplet nucleation analyzer in the study of water freezing kinetics under the influence of ultrasound waves. *International J of Refrigeration* 31, 262 (2008).
- 15 22. Olmo A, Buzon B, Yufera A, Risco R. Bioimpedance Monitoring for Cryopreservation Process Control. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS* 6555 (2010).
- 20 23. Olmo A, Risco R. Cryopreservation and ultrasounds: Why dig up the past? *Cryobiology*, Volume 61, Issue 3, 360 (2010).
24. Rall WF, Fahy GM: Ice-free cryopreservation of mouse. embryos at -196 by vitrification. *Nature* 1985;313:573-. 575.
- 25 25. Risco R, Elmoazzen HY, Doughty M, He X, Toner M. Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. *Cryobiology*, Volume 55, Issue 3, 222 (2007)
- 30 26. Risco R, Olmo A, Sáenz J, Procedimiento de criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector mediante transferencia térmica por convección forzada. P200702565. WO/2009/040457 Universidad de Sevilla, 2008.
- 35 27. Saenz J, Toner M, and Risco R. Comparison between Ideal and Nonideal Solution Models for Single-Cell Cryopreservation Protocols. *J. Phys. Chem. B* Vol 113, 14, 4853 (2009).
28. Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biol Reprod*. 2008 Oct;79(4):727-37.

29. Seki S, Mazur P. Ultra-Rapid Warming Yields High Survival of Mouse Oocytes Cooled to -196 °C in Dilutions of a Standard Vitrification Solution, April 2012, PLoS ONE;Apr2012, Vol. 7 Issue 4, 1.

5

30. Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. Cryobiology. 2009 Aug;59(1):75-82.

10

31. Suki S, Jin B, Mazur P. Extreme rapid warming yields high functional survivals of vitrified 8-cell mouse embryos even when suspended in a half-strength vitrification solution and cooled at moderate rates to -196 °C Cryobiology (Article in press, 13 Dec 2013).

15

32. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H, Succesful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method, Cryo-Letters 1997;18;191-195.

20

33. Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H, Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method, Acta Vet.Scand. 38 (1997) 349-352.

34. Vajta G, Kuwayama M, Improving cryopreservation systems, Theriogenology 65 (2006), 236-244.

25

35. Valbuena D, Póo ME, Aguilar-Gallardo C, Martinez S, Cobo AC, Pellicer A, Simón C
Comparison of Cryotip vs. Cryotop for mouse and human blastomere vitrification. Fertil Steril. 2012 Jan;97(1):209-17

30

35

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1) Esquema representativo general del dispositivo. En la figura se aprecian sus tres partes principales: A) Zona de almacenamiento (microcapilares); B) La pajuela de conexión al sistema de aspiración; C) El protector del microcapilar.

Figura 2) Representación del dispositivo. Sin y con extensiones.

Figura 2.1) Dispositivo básico sin extensiones. En la figura se aprecian sus distintas partes: el microcapilar, la pajuela principal, la pajuela exterior, el protector, la hendidura, la zona de escritura y el postizo. El microcapilar tiene un acabado cónico en su extremo para facilitar la entrada de la muestra biológica. El protector también tiene acabado cónico, en este caso para impedir el desplazamiento del mismo cuando son alcanzadas sus posiciones extremas.

15

Figura 2.2) Dispositivo con una de las extensiones. Incluye los dos microcapilares, en la que el microcapilar interior actúa de barrera, facilitando el posicionamiento de la muestra biológica dentro del microcapilar mediante un tope. Esta barrera consiste en cualquier sistema que permita el paso de los fluidos pero no de la muestra biológica. Éste puede ser implementado si se le añaden multiorificios. Al capilar más externo, que alberga el ovocito/embrión, lo llamaremos microcapilar exterior; al microcapilar más interno, que sirve de tope, lo llamaremos microcapilar interior.

20

Figura 2.3) Dispositivo con una de las extensiones. Incluye el embudo, con un doble fin: 1) facilitar la carga de la muestra dentro del dispositivo, efectuándose por deposición), y 2) evitar el contacto de la zona exterior del microcapilar con el medio que contiene la muestra biológica (eliminando cualquier posibilidad de transportar con este cualquier agente contaminante). Una posibilidad para evitar que el peso del embudo dañe o doble el microcapilar, es sujetar aquel con el propio protector de este. Previamente al sellado del microcapilar, el peso del embudo conviene soportarlo por un agente exterior al dispositivo.

25

30

Figura 2.4) Dispositivo con ambas extensiones, tanto el embudo como el sistema de los dos microcapilares. Por ello, aúna las ventajas de ambos.

35

Figura 3) Procedimiento de carga del agente vitrificante dentro del ovocito. Este paso puede ser dado o no, dependiendo del protocolo de carga utilizado o de si el dispositivo está precargado de crioprotector. En general, el protocolo está basado en dos pasos: El primero consiste en el paso del ovocito desde el medio de cultivo hasta la primera solución de vitrificación (baja concentración de crioprotectores). El segundo consiste en el paso desde la primera solución de vitrificación hasta la segunda solución de vitrificación (alta concentración de crioprotectores). Estos dos pasos pueden ser reducidos a uno solo con el uso de ciertos crioprotectores.

Figura 4) Procedimiento de introducción y protección del ovocito/embrión dentro del dispositivo. Este procedimiento está dividido en cuatro pasos, A, B, C y D, a los que hacen referencia las figuras explicadas a continuación.

Figura 4.1) Procedimiento de introducción y protección del ovocito en el dispositivo con un solo microcapilar.

Figura 4.1 A) El dispositivo se conecta al sistema de aspiración. Este sistema de aspiración actuará haciendo un vacío (presión negativa) obligando a la entrada del ovocito dentro del microcapilar. Para esta conexión se hace necesario un adaptador flexible (pieza hueca de goma abierta por sus bases y con interiores cónicos en sus extremos) que deje estancas las uniones del dispositivo con el adaptador y del adaptador con el sistema de aspiración.

Figura 4.1 B) Una vez conectado el sistema de aspiración, el microcapilar es dejado al descubierto. Para ello se desliza el protector (descrito en la figura 2.1) a lo largo del dispositivo, exponiendo el microcapilar.

Figura 4.1 C) Con el microcapilar al descubierto, se posiciona la punta del microcapilar sobre el ovocito, introduciendo dicha punta a través de la gota de la segunda solución de vitrificación en el que está contenido. Seguidamente se aspira suavemente el ovocito. Para facilitar dicha entrada el microcapilar tiene su extremo distal más ancho que el resto (forma de cono, tal como se explica en la figura 2.1). Finalmente el ovocito se posiciona, siguiendo la aspiración, entre las marcas 2 y 3 del microcapilar.

Figura 4.1 D) En último lugar se procede al sellado de ambos extremos del dispositivo. Conviene, aunque no es imprescindible, seguir el siguiente orden. Primero sellar el microcapilar. Después se desconecta el sistema de aspiración. Finalmente

sellar la parte trasera del dispositivo (postizo). El ovocito/embrión queda así totalmente aislado del medio exterior, encerrado en un contenedor estanco y libre de las eventuales contaminaciones a las que puede estar sujeto en caso de usar contenedores abiertos.

5

Figura 4.2) Procedimiento de introducción y protección del ovocito en el dispositivo formado por los dos microcapilares (tope).

Figura 4.2 A) Este paso es idéntico al descrito para la figura 4.1 A.

10

Figura 4.2 B) Este paso es idéntico al descrito en la figura 4.1 B.

Figura 4.2 C) Con el microcapilar exterior descubierto, se posiciona la punta del microcapilar exterior sobre el ovocito, introduciendo dicha punta a través de la gota de la segunda solución de vitrificación en el que está contenido. Seguidamente se aspira suavemente el ovocito/embrión. Para facilitar dicha entrada el microcapilar tiene su extremo distal más ancho que el resto (forma de cono, tal como se explica en la figura 2.1). Finalmente el ovocito/embrión se posiciona, continuando con la aspiración, de forma automática, en la zona correcta para su vitrificación: el ovocito/embrión se detiene al encontrarse con el microcapilar interior, que hace las veces de tope. En este caso no hace falta estar pendiente de colocarlo entre ninguna pareja de marcas del microcapilar exterior. Ésta es la diferencia fundamental respecto a la versión sin extensiones.

15

20

25

Figura 4.2 D) En último lugar se procede al sellado de ambos extremos del dispositivo. Conviene, aunque no es imprescindible, seguir el siguiente orden. Primero conviene sellar el microcapilar exterior. Después se desconecta el sistema de aspiración. Finalmente se sella la parte trasera del dispositivo (postizo). El ovocito queda así totalmente aislado del medio exterior, encerrado en un contenedor estanco y libre de las eventuales contaminaciones a las que pueden estar sujetos en caso de usar contenedores abiertos.

30

Figura 4.3) Procedimiento de introducción y protección del ovocito en el dispositivo con embudo.

35

Figura 4.3 A) La diferencia fundamental con respecto al dispositivo sin extensiones es que el presente dispositivo es de carga superior y por deposición. Esto se traduce en

que la posición de trabajo habitual de este dispositivo es vertical y con el embudo en la posición más alta y el postizo en la posición más baja. El resto, se mantiene idéntico a lo descrito en la Fig. 4.1 A.

- 5 Figura 4.3 B) Este paso también es distinto. Una vez conectado el sistema de aspiración, se procede al cargado de solución vitrificante del dispositivo. Para ello, con una pipeta se deposita en el interior del embudo la cantidad de solución vitrificante deseada. Posteriormente, se actúa sobre el sistema de aspiración, ejerciendo una presión negativa y cargando todo el microcapilar con solución crioprotectora. Si el
10 dispositivo viene pre-cargado con solución crioprotectora, este paso no hay que realizarlo.

- Figura 4.3 C) Este paso consiste en la carga del ovocito/embrión dentro del dispositivo. Para ello el ovocito se coloca por deposición, con una pipeta, en el interior de embudo
15 (que contiene la solución crioprotectora introducida en el paso anterior). Seguidamente se conecta el sistema aspiración (si no está conectado previamente). Por último el sistema de aspiración aplica una presión negativa sobre el dispositivo, de manera que material biológico baja hasta que consigue emplazarse entre las marcas 2 y 3 (zona de vitrificación).

- 20 Figura 4.3 D) En último lugar se procede al sellado de ambos extremos del dispositivo. En primer lugar se procede al sellado del postizo. Seguidamente se efectúa la bajada del protector del microcapilar. Por último se pasa sellar el microcapilar. El ovocito queda así totalmente aislado del medio exterior, encerrado en
25 un contenedor estanco y libre de las eventuales contaminaciones a las que puede estar sujeto en caso de usar contenedores abiertos. En este caso, además, tampoco hay contacto de la superficie exterior del dispositivo con el medio que contiene la muestra biológica, con lo cual esta superficie exterior nunca se puede convertir en portadora de agentes patógenos.

- 30 Figura 4.4) Procedimiento de introducción y protección del ovocito en el dispositivo con tope y embudo.

- Figura 4.4 A) Idéntico a figura 4.3 A.

- 35 Figura 4.4 B) Idéntico a figura 4.3 B

Figura 4.4 C) Este paso consiste en la carga del ovocito/embrión dentro del dispositivo. Difiere de la figura 4.3 C en el hecho de que las marcas 2 y 3 han sido sustituidas por un tope, de manera que el posicionamiento del material biológico se hace de forma automática al llegar al tope. La forma de proceder es la siguiente: Primero, el ovocito/embrión se coloca por deposición, con una pipeta, en el interior de embudo (que contiene la solución crioprotectora introducida en el paso anterior). Seguidamente se conecta el sistema aspiración (si no está conectado previamente). Por último el sistema de aspiración aplica una presión negativa sobre el dispositivo, de manera que material biológico baja hasta que llega al tope, deteniéndose en la zona adecuada para su vitrificación.

Figura 4.4 D) Idéntico a 4.3 D.

Figura 5) Procedimiento de introducción y manipulación del dispositivo en nitrógeno líquido.

Figura 5 A) El microcapilar es introducido en un recipiente con nitrógeno líquido. Una vez dentro, el ovocito estará vitrificado.

Figura 5 B) Para evitar un eventual daño del microcapilar en su manipulación posterior, dado la fragilidad de este, se procede seguidamente a deslizar el protector sobre el microcapilar, quedando finalmente el dispositivo (con el ovocito en su interior) listo para su almacenamiento indefinido.

Figura 6) Procedimiento de traslado y almacenamiento indefinido del dispositivo. Para llevar el ovocito vitrificado al lugar de almacenamiento definitivo, el dispositivo es trasladado, siempre dentro del recipiente con nitrógeno líquido, hasta una posición donde previamente se ha colocado un cáliz de transporte (visotubo), también relleno con nitrógeno líquido. El dispositivo es introducido en el visotubo. Seguidamente el visotubo, lleno de nitrógeno líquido y conteniendo el dispositivo, se transporta hasta el lugar donde se encuentre la cántara definitiva de almacenamiento, introduciendo el visotubo, con el dispositivo en su interior, dentro de dicha cántara.

Figura 7) Procedimiento de recalentamiento.

Figura 7 A) Para el recalentamiento de la muestra, el primer paso es la preparación de la taza. Esta es un recipiente de material térmicamente aislante (poliestireno

expandido, por ejemplo) con dos depósitos separados no más de 2 cm. Uno de ellos estará relleno de nitrógeno líquido y será destinado a la recepción del visotubo conteniendo el dispositivo con el óvulo en su interior. El otro contiene un vaso con agua (o cualquier fluido con alta capacidad calorífica) a 37°C. La profundidad de este
 5 segundo recipiente debe de ser tal que si el dispositivo está sujeto por su parte superior, este no pueda tocar el fondo. Ello evitará un eventual contacto del microcapilar con el fondo del recipiente que contiene el agua a 37°C en el proceso de recalentamiento.

10 Figura 7 B) Para el recalentamiento de la muestra se ha de seguir un proceso inverso al de vitrificación. Tras la preparación de la taza, se pasa a la extracción de la cántara de almacenamiento del visotubo conteniendo el dispositivo que encierra el óvulo seleccionado. Seguidamente el conjunto es introducido en el depósito de la taza que
 15 contiene nitrógeno líquido. Seguidamente el dispositivo es sacado del visotubo sin que el microcapilar pierda nunca el contacto con el nitrógeno líquido. Finalmente se desliza el protector del microcapilar hacia arriba, dejando dicho microcapilar en contacto directo con el nitrógeno líquido. Ello permitirá que la futura velocidad de recalentamiento aumente sensiblemente (en comparación con el caso en el que el protector no hubiera sido desplazado para dejar el microcapilar libre).

20

Figura 7 C) La parte superior sellada del dispositivo (postizo) es cortada, dejando abierto el dispositivo por la parte superior. El realizar el corte del postizo en este paso del procedimiento hace ganar tiempo en las etapas posteriores, lo que evitará una sobreexposición del ovocito a la solución segunda de vitrificación cuando pase al baño
 25 de agua a 37°C en el recalentamiento.

Figura 7 D) El dispositivo es trasladado, en posición vertical y sujeto por su parte superior, desde el baño de nitrógeno líquido hasta al baño de agua, entrando el microcapilar rápidamente en contacto con el baño caliente. La proximidad de las tazas,
 30 menos de 2 cm, el paso rápido, y el tener el microcapilar descubierto, hace que la velocidad de recalentamiento sea altísima: en torno a 250.000 °C/min.

Figura 8) Representación de la velocidad de recalentamiento. (eje vertical, en °C/min) En función del tiempo de vuelo, o sea, el tiempo transcurrido desde que sale el
 35 microcapilar del nitrógeno líquido hasta que entra en el baño a 37°C (eje horizontal, en segundos). Se ve cómo claramente hay una dependencia exponencial de la velocidad de recalentamiento con la inversa del tiempo de vuelo entre las tazas. Por ello es

crítico seguir este procedimiento: sólo una velocidad de recalentamiento ultra-alta garantiza una tasa cercana al 100% en la recuperación de los ovocitos tras la criopreservación (descrito en el texto principal).

5 Figura 9) Expulsión y deposición de la muestra recalentada.

Figura 9 A) Una vez recalentado el ovocito dentro del microcapilar se procede a la conexión del sistema de aspiración al dispositivo. Este sistema de aspiración servirá en este caso para expulsar el ovocito y depositarlo sobre la solución de
10 recalentamiento. Para establecer dicha conexión se utiliza de nuevo el sistema conector de goma.

Figura 9 B) Tras la conexión del sistema de aspiración/expulsión al dispositivo se procede a cortar la punta del microcapilar, dejando el extremo libre y permitiendo la
15 posterior salida del ovocito.

Figura 10) El ovocito es empujado hacia fuera usando el sistema de aspiración/expulsión y es depositado sobre una gota de la primera solución de recalentamiento. Posteriormente el ovocito se pasa a la segunda solución de
20 recalentamiento y de allí al medio de cultivo. El ovocito está listo para ser introducido en la incubadora de CO₂ donde permanecerá dos horas antes de su uso.

25

30

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

El dispositivo objeto de la presente invención consiste en un contenedor compuesto por varias partes, fabricado en polímero termoplástico, optimizado como sistema cerrado para los procedimientos de criopreservación, para obtener, junto con el procedimiento reivindicado, velocidades de recalentamiento ultra-altas.

En primer lugar explicaremos los tres componentes fundamentales que constituyen el dispositivo. En segundo lugar describiremos en detalle cada una de las sub-partes en las que se divide el mismo, que permiten, de una forma práctica, su implementación y uso en el laboratorio. En tercer lugar describiremos las dos posibles extensiones que también queremos proteger. Estas dos posibles extensiones dan lugar a cuatro posibles dispositivos similares, dependiendo de si contienen o no dichas extensiones. Todos ellos contienen la misma idea fundamental de contenedor cerrado con ultra-altas velocidades de RECALENTAMIENTO, Lo único que varía es la manejabilidad, que es diferente dependiendo de si contienen o no dichas extensiones, y el grado de seguridad biológica que ofrecen.

Componentes fundamentales:

Los componentes fundamentales son tres (Figura 1):

- Un microcapilar de polímero termoplástico con un diámetro interior del orden o inferior a los 200 micrómetros y una pared del orden o inferior a los 15 micrómetros.
- Una pajuela termoplástica unida al microcapilar con un diámetro interior del orden o superior a los 230 micrómetros y un diámetro exterior tal que permita un fácil manejo con las manos y su conexión a un sistema de aspiración/expulsión. Esta pajuela va unida al microcapilar mediante un pegamento capaz de soportar temperaturas criogénicas (epoxy, por ejemplo).
- Un protector del microcapilar que desliza sobre la pajuela y que se usa para cubrir (o descubrir) el microcapilar.

El papel de cada uno de estos tres componentes es imprescindible y bien diferenciado:

-El microcapilar es el sitio donde se albergará el ovocito. Sus dimensiones específicas y el material del que está constituido (preferentemente policarbonato, aunque puede ser cualquier otro material termoplástico con una conductividad térmica similar o superior) permitirán, *junto con el procedimiento reivindicado*, conseguir las velocidades

de recalentamiento ultra-altas, conducentes a una alta recuperación de los ovocitos tras su almacenamiento criogénico. Por otra parte, al estar fabricado con material termofusible, permite un sellado fácil mediante la aplicación de un pulso de calor en su extremo.

- 5 -La pajuela unida al microcapilar tiene por misión capacitar el manejo manual del microcapilar y permitir la conexión del microcapilar a un sistema de aspiración/expulsión. Al ser, tanto el microcapilar como la pajuela, materiales termoplásticos, esto posibilita el cierre del dispositivo por ambos extremos, quedando el ovocito aislado del exterior y no entrando nunca en contacto con el nitrógeno líquido.
- 10 -El protector del microcapilar permite el almacenamiento de la muestra sin que el microcapilar corra riesgo de rotura o deformación, ya que dadas las reducidas dimensiones de éste (diámetro ligeramente superior al del ovocito que contendrá), dicho riesgo sería muy alto sin la existencia de este protector.

15 Detalle de cada una de las partes del dispositivo (Figura 2.1):

El dispositivo está formado por una serie de elementos (sub-partes) que permiten el desarrollo y la implementación de las ideas contenidas en los tres componentes anteriores de manera práctica en el laboratorio.

20 El dispositivo reivindicado consta de las siguientes sub-partes (Figura 2.1):

- Un microcapilar de plástico (del orden o inferior a los 200 micrómetros de diámetro interior y de unos 15 micrómetros de pared) que albergará en su interior la(s) muestra(s) biológica(s) en general, y los ovocitos en particular. La longitud de este microcapilar esta acotada inferiormente por el número de ovocitos que se deseen almacenar en él (generalmente no más de cuatro) y sobretodo porque debe de dejar un espacio de al menos 1 cm entre la posición final de los ovocitos dentro del microcapilar y la punta del microcapilar, lugar que se ha de sellar (cerrar): como unas de las opciones preferible de sellado es un pulso de calor (termosellado) y este pulso de calor no debe de afectar al ovocito, de aquí este centímetro de seguridad. En principio no existe cota superior para la longitud del capilar. Dado que por su material y diámetro es extremadamente flexible, admite no sólo la posibilidad de una geometría recta, sino que puede ser enrollado, por ejemplo en espiral, pudiendo compactarse y así contener un número mucho mayor de muestras (distintas de ovocitos, que como decimos, no suelen almacenarse más de cuatro en el mismo dispositivo); por ello este dispositivo no está basado en técnicas de mínimo volumen, como otros dispositivos. En el caso de la aplicación para ovocitos, y reivindicado de

forma especial en esta patente, la geometría preferible es la recta y el tamaño preferible del microcapilar es de aproximadamente 5 cm. La geometría recta permitirá una colocación fácil de un protector (descrito a continuación) sobre este. 5 cm es un tamaño que permite posicionar los ovocitos suficientemente lejos de la punta termosellable del microcapilar y, por otro lado, no es tan largo como para dificultar su manejo. El microcapilar tiene tres marcas sobre su superficie: 1) zona de sellado, 2) y 3) marcas entre las cuales se colocarán los ovocitos. La punta del microcapilar tiene forma de cono para facilitar la entrada de los ovocitos y evitar un eventual daño de estos por roce con dicha punta.

- Una pajuela principal conectada al microcapilar, que aporta rigidez y permite que la muestra pueda fluir dentro del microcapilar mediante la succión por la parte trasera (parte de esta no unida al microcapilar). Esta pajuela principal tiene un diámetro interior ligeramente superior al del microcapilar, de manera que este puede insertarse dentro de aquella con facilidad, y una pared (y por tanto un diámetro exterior) suficientemente grande como para aportarle rigidez al dispositivo, vertebrándolo hasta su extremo superior. El material plástico del que está fabricado debe también ser tal que le confiera esta rigidez. Este material no necesita ser termofungible, sino rígido y de pared gruesa, dado que su objetivo es vertebrar el dispositivo. Esta pajuela principal va unida en su parte trasera a lo que hemos llamado postizo (descrito a continuación), que sí es delgado y termofungible, lo que permite el cierre trasero del dispositivo. El diámetro exterior, a su vez, debe de ser lo suficientemente pequeño como para maximizar el número de dispositivos que pueden ser almacenados en una cántara de almacenamiento de nitrógeno líquido. Un diámetro exterior típico de la pajuela principal está en torno a 1 mm.
- Una pajuela exterior, que recubre parte de la pajuela principal. Su misión es de nuevo aportarle la rigidez definitiva al dispositivo, facilitar su manipulación, y sobretodo permitir el deslizamiento sobre esta pajuela exterior del protector del microcapilar, descrito a continuación.
- Un tramo de pajuela plana por su cara exterior, que también recubre parte de la pajuela principal (al ser plana, el protector no puede deslizarse sobre ella) que permite anotar los datos identificativos de cada paciente (nombre, código, etc...).
- Un tramo final (postizo) trasero de pajuela de pared delgada y de material termoplástico de pared delgada. Parte de este postizo recubre el último tramo de la pajuela principal (para así poder hacer unión entre ambos elementos),

pero la otra parte no recubre la pajuela principal, sino que al ser de material termoplástico y de pared delgada, este postizo puede ser termosellado con facilidad, garantizando que todo el dispositivo queda cerrado y estanco. El postizo es también la parte del dispositivo que permite su conexión a un sistema de aspiración/expulsión estándar. Lleva una cuarta marca (4)) en la zona donde ha de realizarse el termosellado de esta parte trasera del dispositivo.

- Un protector del microcapilar, de plástico, que desliza sobre la pajuela exterior, con dos posiciones de uso. Una primera posición, que permite dejar al descubierto el microcapilar para el momento de la aspiración/expulsión de la muestra biológica y para la introducción en nitrógeno líquido. Una segunda posición, en la que recubre el microcapilar y así impide que éste colisione con otros objetos y pudiera dañarse el ovocito, y que garantiza el almacenamiento sin estos riesgos una vez que la muestra se encuentra vitrificada. Uno de los extremos de este protector (el más cercano al microcapilar) acaba en forma de tronco de cono, lo le permite entrar en la hendidura (descrita a continuación), y evitar el deslizamiento del capilar mediante un click de bloqueo. El otro extremo (delantero) también acaba en forma de cono, de manera que esta geometría le sirve de tope cuando en su posición de descubierto alcanza la pajuela exterior.
- Una hendidura a lo largo del dispositivo, que consigue un click de bloqueo del protector del microcapilar y evita la salida de dicho protector del dispositivo. Esta hendidura se implementa de forma práctica mediante una separación cercana a un milímetro, entre las dos partes de la pajuela exterior. El click se consigue mediante un acabado en forma de tronco de cono del extremo del protector más cercano al microcapilar, como indicamos anteriormente.

La longitud total del dispositivo completo será de unos 80-140 mm, lo que se adapta a los estándares de almacenamiento, ajustándose a las prácticas al uso en reproducción asistida, permitiendo una cómoda manipulación y minimización del espacio que ocupan en los stocks.

Detalle de cada una de las partes del dispositivo con una de las extensiones (doble capilar) (Figura 2.2):

El dispositivo con dos microcapilares es una extensión del dispositivo descrito en detalle en el párrafo inmediatamente anterior. La extensión consiste en la introducción dentro del microcapilar de un segundo microcapilar que sirva de tope a la muestra biológica. A este segundo capilar lo denotaremos por microcapilar interior, de manera que el capilar descrito en apartado anterior dentro del cual se albergará el ovocito/embrión, lo llamaremos, microcapilar exterior para facilitar su identificación. El diámetro exterior del microcapilar interior es ligeramente inferior al diámetro interior del microcapilar exterior, para permitir su introducción y montaje. El diámetro interior del microcapilar interior ha de ser lo suficientemente pequeño como para impedir el paso de la muestra biológica pero lo suficientemente grande como para permitir el paso de los fluidos que la bañan. Unos 20 micrometros es un tamaño adecuado. También existe la posibilidad de un microcapilar interior multiorificios, para conseguir el compromiso antes señalado. Otras formas de implementar esta idea y conseguir este compromiso es dejando una diferencia concreta que consiga tal propósito entre el diámetro interior del microcapilar exterior y el diámetro exterior del microcapilar interior, o utilizando un material poroso que permita el paso del fluido pero no de la muestra biológica. Cuando el embrión/ovocito es aspirado, el fluido se moverá libremente por el dispositivo, pero la muestra biológica encontrará un tope en la punta del microcapilar interior, deteniendo su movimiento y posicionándolo adecuadamente en la zona donde se producirá la vitrificación.

Detalle de cada una de las partes del dispositivo con una de las extensiones (embudo) (Figura 2.3):

El dispositivo con embudo es otra extensión del dispositivo original. En este caso la punta del microcapilar, en lugar de acabar en un pequeño cono de 200-300 micrómetros de diámetro (para facilitar la entrada de la muestra biológica por aspiración), acaba en un embudo de unos 10 milímetros de diámetro. En este caso la entrada de la muestra biológica no se realiza por aspiración, sino de la siguiente manera. El dispositivo es colocado verticalmente, con el embudo hacia arriba (posición contraria al uso común del dispositivo). Para que el peso del embudo no sea un problema a la hora de mantener el microcapilar en esta posición, éste es sujetado por el propio protector del microcapilar. Tanto las soluciones como las muestras biológicas son depositadas en el interior del cono con una pipeta. De esta manera nunca hay un contacto entre la superficie exterior del microcapilar y el medio que contiene la muestra biológica. Una vez depositado el material deseado dentro del embudo, se procede a su

interiorización y posicionamiento correcto mediante la aspiración por la zona del postizo.

5 Detalle de cada una de las partes del dispositivo con las dos extensiones (Figura 2.4):

El dispositivo objeto contiene las dos extensiones descritas en los párrafos anteriores: el tope y el embudo. Agrupa todas las ventajas:

- Contenedor cerrado
- 10 - Velocidades de recalentamiento ultra-altas.
- Tope interior que permite el paso de los fluidos pero no de la muestra biológica y que permite identificar en todo momento la posición de la muestra.
- Embudo en la boca del microcapilar con un doble objetivo: facilitar la carga del dispositivo, que aquí se hace por deposición, y garantizar que no hay ningún contacto
- 15 entre la superficie exterior del capilar y el medio en el que se encuentra la muestra biológica, evitando todo riesgo por contaminación.

PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACION y RECALENTAMIENTO

20 • Para la vitrificación

Preparar la(s) célula(s) en el medio de enfriamiento de vitrificación elegido (Figura 3) (agentes crioprotectores). Como comentamos anteriormente, los agentes crioprotectores no son objeto de esta invención. Los más recomendables, a fecha de

25 hoy, están basados en etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO).

Los dos siguientes pasos hacen referencia a la carga de la muestra biológica y el cierre estanco del dispositivo por ambos extremos. Estos pasos serán descritos en cuatro apartados distintos según se trate del dispositivo original o de los dispositivos

30 con extensiones. El resto de la descripción del procedimiento permanece siendo el mismo para los cuatro casos.

- DISPOSITIVO SIN EXTENSIONES: Fijar el extremo ancho (postizo) de la
- 35 pajuela a un dispositivo de aspiración (por ejemplo, una jeringa Hamilton, una pipeta automática, un stripper, una pipeta de boca o cualquier otro sistema de aspiración y manipulación de ovocitos), bien directamente o bien con un

conector-acoplador adecuado (Figura 4.1 A). Cuando las muestras están listas para ser almacenadas en el dispositivo, deslizar la funda plástica protectora a lo largo de la pajuela hasta exponer el microcapilar (Figura 4.1 B). Para esta versión, con ayuda del microscopio o la lupa binocular, cargar suavemente las muestras en el dispositivo y ubicarlas entre la 2ª y 3ª marca del microcapilar por aspiración (Figura 4.1 C), controlando la absorción de las muestras y medio. Esta zona entre la 2ª y 3ª marca es la posición correcta para la vitrificación, y ha sido calculada al efecto de manera que la velocidad de recalentamiento en dicho área sea óptima. Este detalle es crítico. Confirmar que la/s muestra/s está/n situada/s entre la 2ª y 3ª marca. Precaución: El fallo en la confirmación de la ubicación de la muestra podría dañarla. Sellar térmicamente el microcapilar por debajo de la marca 1ª. A continuación, la parte trasera del dispositivo (postizo) se sella también con el mismo termosellador en la marca 4ª, de manera que la muestra se encuentra aislada completamente dentro del dispositivo (Figura 4.1 D).

- **DISPOSITIVO CON DOBLE CAPILAR (EXTENSIÓN):** Fijar el extremo ancho (parte trasera) de la pajuela un dispositivo de aspiración (por ejemplo, una jeringa Hamilton, una pipeta automática, un stripper, una pipeta de boca o cualquier otro sistema de aspiración y manipulación de ovocitos), bien directamente o bien con un conector-acoplador adecuado (Figura 4.2 A). Cuando las muestras están listas para ser introducidas en el contenedor, deslizar la funda plástica protectora a lo largo de la pajuela hasta exponer el microcapilar (Figura 4.2 B). Para esta versión, aspirar suavemente la muestra hasta que ésta llega al tope (Figura 4.2 C). En este momento la muestra ascenderá por el microcapilar exterior, chocará con el interior y por tanto se detendrá automáticamente y cesaremos con el proceso de aspiración. Así no habrá necesidad de tener que acudir a la habilidad para ubicarla en la posición correcta para la vitrificación. Seguidamente se pasa al sellado en la forma descrita anteriormente. (Figura 4.2 D).

- **DISPOSITIVO CON EMBUDO (EXTENSIÓN):** En este caso, se coloca el dispositivo en posición vertical, con el embudo en la parte más alta y el postizo en la parte más baja (Figura 4.4 A). Se conecta el sistema de aspiración al postizo y se procede a la carga del crioprotector dentro del dispositivo, si este no viene precargado. Para ello, con ayuda de una pipeta, se rellena el embudo

con la cantidad de crioprotector deseada. Después se actúa sobre el sistema de aspiración, aspirando el crioprotector dentro del capilar (Figura 4.4 B). Seguidamente se procede al cargado de la muestra biológica. Para ello se procede de forma similar a como se acaba de realizar para el crioprotector: con ayuda de una pipeta se recoge el ovocito/embión desde el medio donde esté y se deposita en el interior del embudo. Seguidamente se actúa sobre el sistema de aspiración, interiorizando la muestra biológica y colocándola, con ayuda de una lupa binocular correctamente orientada, entre las marcas 2ª y 3ª (Figura 4.3 C). Para el sellado, se puede sellar primero el postizo. Seguidamente se desliza el protector, exponiendo el capilar, y se procede al sellado del mismo en la primera marca (Figura 4.3 D).

- **DISPOSITIVO CON AMBAS EXTENSIONES:** Este dispositivo recoge en uno todas las ideas anteriores. Todo permanece igual que para el protocolo recién descrito (Figura 4.4 A y Figura 4.4 B), salvo la cuestión relativa al posicionamiento de la muestra biológica entre las marcas 2ª y 3ª. Para el presente dispositivo no existen estas marcas, sino un tope, de manera que basta con aspirar hasta que el ovocito/embrión llegue al tope para garantizar su posicionamiento en la zona correcta para la vitrificación (Figura 4.4 C). En lo relativo al sellado es igual que para el dispositivo con embudo (Figura 4.4 D).

A partir de este punto, todos los pasos siguientes son comunes a las cuatro versiones del dispositivo y se describen a continuación.

- 25 Sujetando el dispositivo por la parte trasera, sumergir verticalmente el microcapilar (descubierto) en el depósito de nitrógeno líquido (LN₂), o cualquier otro medio que permita un enfriamiento rápido (Figura 5 A).

- 30 Deslizar la funda protectora de plástico cuidadosamente a lo largo de la pajuela hacia abajo para proteger el microcapilar (Figura 5 B). Asegurarse de que durante este movimiento el microcapilar está siempre completamente cubierto por el nitrógeno líquido.

- 35 Para el transporte, guardar el dispositivo en un visotubo (cáliz, canister o cryocane: tubo de ensayo metálico o de plástico, que podrá adaptarse a los estándares utilizados

en las clínicas) y llevar al tanque de nitrógeno líquido donde será finalmente almacenado (Figura 6).

- Para el recalentamiento

5

Es un paso crítico del procedimiento, donde se obtiene una velocidad de recalentamiento ultra-alta. Para ello se hace necesario la disposición de un baño con nitrógeno líquido y un baño con agua a 37 °C a una distancia entre ellos de orden de 1 cm y unas dimensiones recomendables de las que se hablará seguidamente. Esta configuración se consigue fácilmente con el uso del dispositivo al que hemos llamado taza, y que facilita la puesta en práctica y consecución de este paso del procedimiento. Describimos la taza a continuación:

10

15

La taza (Figura 7 A), conveniente para el recalentamiento, se compone de un material aislante térmico (poliestireno expandido, por ejemplo), con dos orificios: Uno estará dedicado al nitrógeno líquido; el otro, a agua a 37 °C. Estos orificios han de ser lo suficientemente grandes, en diámetro y profundidad, como para minimizar la probabilidad de colisión del microcapilar con sus paredes o fondo cuando el dispositivo es introducido en ellos. El recipiente para nitrógeno líquido albergará un soporte que permite la colocación del visotubo que contiene las pajuelas. El recipiente para agua a 37 °C consiste sólo en un orificio que permite meter y sacar un vaso con agua a 37 °C.

20

25

El uso de esta taza y el dispositivo reivindicado, junto con el procedimiento, garantiza una velocidad de recalentamiento ultra-alta. Para estudiar, usando nuestro dispositivo y una solución de vitrificación típica (15% EG, 15% DMSO, 1 M sacarosa), la dependencia de la velocidad de recalentamiento respecto al tiempo transcurrido entre la salida del dispositivo del orificio de la taza que contiene nitrógeno líquido y la entrada en el orificio de la taza que contiene el vaso con agua a 37 °C, se procedió de la siguiente forma. Se emplazó un termopar tipo T (Omega) con la unión entre el cobre y el constantan justo en la posición que ocuparía el ovocito dentro del dispositivo (entre las marcas 2 y 3). Este termopar se conectó a un amplificador operacional (OP741), y su salida a un conversor analógico-digital (Measurement Computing 1208LS) unido a un PC mediante el puerto USB. Con un software de adquisición (Labview 6.1) se midió la temperatura entre las marcas en todo instante, obteniendo de esta forma la velocidad de recalentamiento de la muestra (eje vertical de la Figura 8). Para medir el tiempo transcurrido entre la salida del nitrógeno líquido y la entrada

30

35

en el agua a 37 °C se uso una cámara ultrarrápida (Casio EX –F1 a 1200 frames/segundo; eje horizontal de la Figura 8).

Los pasos a seguir en el recalentamiento son los siguientes:

5

Preparar una placa de Petri medio de calentamiento preferido de recalentamiento (agente eliminador de crioprotector; no es objeto la presente invención el uso de uno concreto; generalmente se trata de poner concentraciones decreciente del mismo medio que se utilizó para la vitrificación).

10

Meter un vaso con agua a 37 °C en la taza. Llenar el otro depósito de la taza con nitrógeno líquido (Figura 7 A).

15

Sacar el visotubo, con el dispositivo que contiene los ovocitos, del tanque de almacenamiento y colocarlo en la taza, sumergiéndolo en la zona que contiene nitrógeno líquido.

20

Deslizar cuidadosamente la funda protectora de plástico a lo largo y hacia arriba de la pajuela asegurando que en todo momento el microcapilar está completamente sumergido en el nitrógeno líquido, quedando así el microcapilar al descubierto. Cortar el postizo, dejando abierto este extremo (parte trasera) del dispositivo (Figura 7 C).

25

Aproximar el dispositivo, siempre con el microcapilar dentro del nitrógeno líquido, al borde más cercano al vaso con agua a 37° C. Extremadamente rápido (menos de 1 segundo), sumergir verticalmente cara abajo el microcapilar sellado, en el recipiente de agua, agitando a mano durante dos segundos para una mejor transferencia de calor (Figura 7 D).

30

Inmediatamente después, sacarlo del agua y secar suavemente su exterior (con papel absorbente estéril, por ejemplo). Conectar el dispositivo de aspiración/expulsión (convenientemente acoplado) al extremo ancho de SafeSpeed (Figura 9 A). Cortar el microcapilar justo por encima de la 1ª marca (Figura 9 B).

35

Descargar cuidadosamente y expulsar la muestra dentro del medio de recalentamiento usado (Figura 10).

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**Ejemplo 1. Procedimiento de conservación celular de ovocitos**

- 5 Este ejemplo muestra la aplicación práctica del método para la criopreservación de ovocitos de ratona.

Se emplearon ratonas vírgenes C57BL/6 x CBA/Ca (4-8 semanas) mantenidas bajo condiciones controladas (12 horas luz: 12 horas oscuridad) y alimentadas *ad libitum*.

- 10 Fueron superovuladas por inyección intraperitoneal con 0.1 ml de PMSG (5 UI). Tras 48-56 horas, se les administró 0.1 ml de HCG (5 UI). Se sacrificaron 14 horas después por dislocación cervical y se extrajeron los oviductos.

- 15 Los ovocitos fueron liberados del cúmulo por acción de la hialuronidasa (SIGMA Ref. H4272-30 mg). Tras esto, los ovocitos se lavaron en medio M2 para eliminar los restos de hialuronidasa. Los ovocitos en metafase II previamente desnudados se transfirieron entonces a una solución de equilibrio, y después a la solución de vitrificación. La solución de equilibrio consistió en 7.5% EG, 7.5% DMSO (cinco minutos). La solución de vitrificación consistió en 15% EG, 15% DMSO y 1M sacarosa (un minuto). Todas
20 las soluciones usadas llevan como disolvente PBS (Buffer salino de fosfato).

Los ovocitos se introdujeron en el microcapilar, que fue termosellado, con la muestra biológica en interior. Seguidamente se selló la parte trasera. El microcapilar se introdujo en el recipiente de nitrógeno líquido de forma manual.

- 25 Una vez la muestra con el capilar alcanzó temperaturas criogénicas, el microcapilar fue puesto en posición de almacenamiento recubierto por el capuchón, y fue transportado en un canister de plástico hasta un tanque de almacenamiento con nitrógeno líquido, donde permaneció 24 horas.

- 30 En el proceso de recalentamiento, el canister con el dispositivo conteniendo el ovocito fue extraído del tanque de almacenamiento. El canister se emplazó en la taza, en el lugar que contiene nitrógeno líquido. Se sacó el dispositivo del canister, siempre con el microcapilar sumergido en nitrógeno líquido. El postizo del microcapilar fue cortado (parte trasera del dispositivo). El protector del microcapilar fue desplazado hacia
35 arriba, dejando este al descubierto. El microcapilar se pasó, rápidamente (menos de

0.5 segundos), del nitrógeno líquido al vaso anejo con agua a 37 °C, de forma manual (siempre en posición de uso, o sea, sin protector).

Se secó la punta del capilar con papel secante estéril. Se conectó la parte trasera (postizo) a al sistema de aspiración/expulsión. Se cortó la punta del microcapilar y se procedió a su descarga del dispositivo sobre una gota de medio de recalentamiento. Tras tres lavados, se puso en cultivo en una incubadora con CO₂ durante cuatro horas. El primer lavado se hizo con una solución 1M de sacarosa (1 min). El segundo lavado con una solución 0.5 M de sacarosa (3 minutos) y el tercer lavado con una solución 0.25 M de sacarosa (3 minutos).

Después de cuatro horas, se estudió la viabilidad de los ovocitos, mediante una gama amplia de valoraciones morfológicas y la técnicas de tinción para ver compromiso de la membrana (trypan blue).

Siguiendo dicho procedimiento se criopreservaron y recalentaron 620 ovocitos de ratona, de los cuales sobrevivieron 595, obteniéndose una supervivencia de ovocitos de un 96%, mucho mayor a otras técnicas de vitrificación que utilizan dispositivos cerrados.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico caracterizado porque comprende:
 - 5 a. Un microcapilar o preferentemente dos microcapilares concéntricos de distinto diámetro.
 - b. Una pajuela que contiene y fija el microcapilar o los dos microcapilares.
 - c. Una funda del microcapilar/es que lo protege durante la posición de almacenamiento y es móvil pero no desmontable.
 - 10 d. Un adaptador que se adhiere al extremo inferior de la pajuela.
 - e. Preferentemente un embudo que se coloca en el extremo superior del microcapilar exterior.
- 15 2. Dispositivo de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 1 caracterizado porque el microcapilar interior en el caso de dos microcapilares actúa como una barrera permeable bloqueando el paso a la muestra y permitiendo identificar la posición de la muestra en todo momento.
- 20 3. Dispositivo de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 1 caracterizado porque el/los microcapilar/es están ensamblados en la pajuela proporcionando rigidez y facilidad en el uso.
- 25 4. Dispositivo de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 1 caracterizado porque la pajuela es plana para facilitar la escritura e identificación de los datos del paciente.
- 30 5. Dispositivo de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 1 caracterizado porque el adaptador de goma se adhiere al extremo inferior de la pajuela para conectar los microcapilares con el sistema de aspiración, manual o automático.

- 5 6. Dispositivo de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 1 caracterizado porque el embudo facilita la entrada de la muestra y elimina cualquier contacto de la superficie externa del capilar exterior con el medio que contenía la muestra biológica para así garantizar la no contaminación del mismo.
- 10 7. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según el dispositivo descrito en las reivindicaciones anteriores, caracterizado por el uso de microcapilares poliméricos termoplásticos como contenedores del material biológico, introducidos en fluidos criogénicos para conseguir la vitrificación de la muestra biológica.
- 15 8. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 7, caracterizado por la utilización de microcapilares poliméricos termoplásticos fabricados con policarbonato, o con cualquier otro material termosellable, con una conductividad térmica similar o superior.
- 20 9. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 7, caracterizado por la utilización de microcapilares poliméricos termoplásticos termosellables, para evitar la contaminación cruzada de la muestra y que éste quede completamente aislada del exterior.
- 25 10. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según las reivindicaciones 7 y 9 en las cuales las células a criopreservar son ovocitos, para los que se necesita una alta velocidad de recalentamiento para asegurar su viabilidad posterior.
- 30 11. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 7, caracterizado porque la muestra celular se introduce previamente bañada en agentes crioprotectores en el interior del microcapilar exterior, a distintas concentraciones dependiendo del tipo celular a criopreservar.

12. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 7, en el que los microcapilares son introducidos en fluidos criogénicos con la parte inferior de los mismos conteniendo la muestra biológica sin la funda del capilar exterior, para optimizar el proceso de enfriamiento.
13. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 7, caracterizado por la utilización de un baño de recalentamiento para el proceso de recalentamiento, en el que el microcapilar polimérico termoplástico termosellado, es introducido con la parte inferior conteniendo la muestra biológica, sin el protector del capilar exterior, para optimizar el proceso de recalentamiento.
14. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 7, caracterizado por la utilización de agua a 37°C o de un fluido similar para el baño de recalentamiento.
15. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según las reivindicaciones 7, 9, 10 y 13 en la que, durante el recalentamiento, la distancia entre el baño de nitrógeno líquido y el baño con agua a 37°C es del orden o menor a 1 cm.
16. Procedimiento de criopreservación y almacenamiento mediante vitrificación de material biológico según la reivindicación 15 en la que si el tiempo de vuelo entre la salida del baño de nitrógeno líquido y la entrada en el baño de agua a 37°C es inferior a 0.5 segundos, la velocidad de recalentamiento alcanza fácilmente el valor de 200.000 °C/min, lo que garantiza la viabilidad celular en el caso de ovocitos.

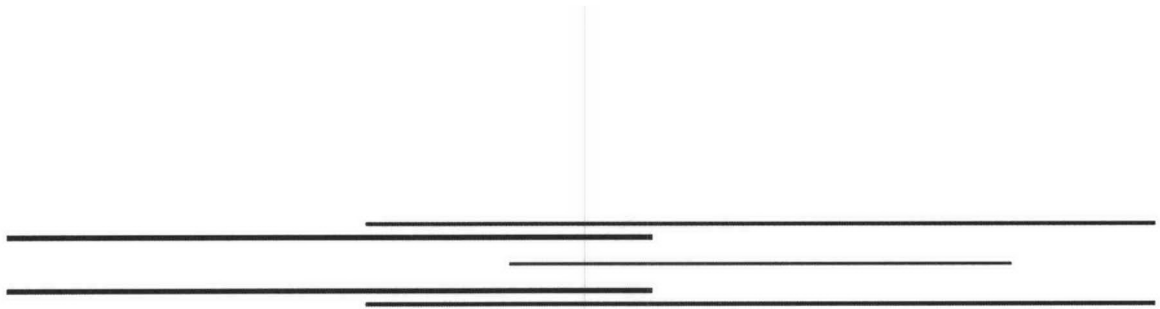


FIGURA 1

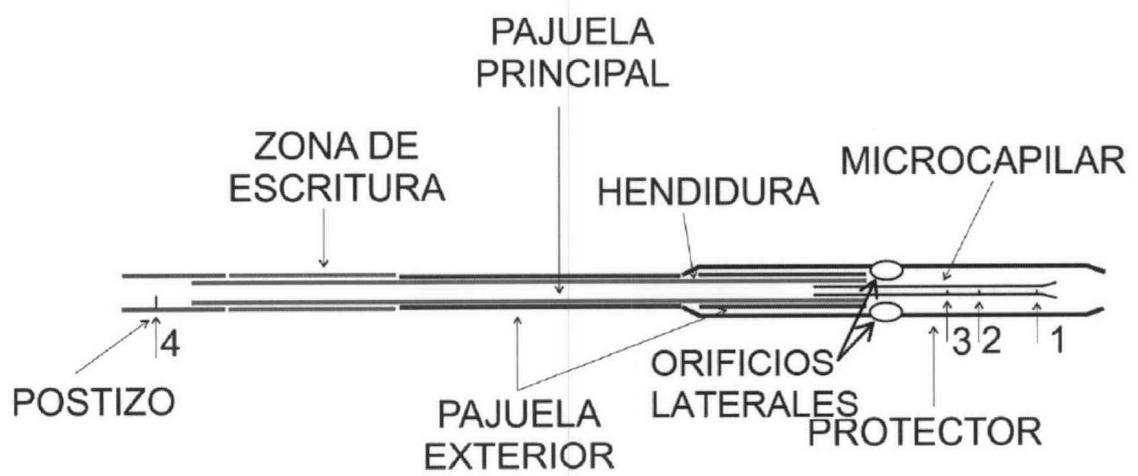


FIGURA 2.1

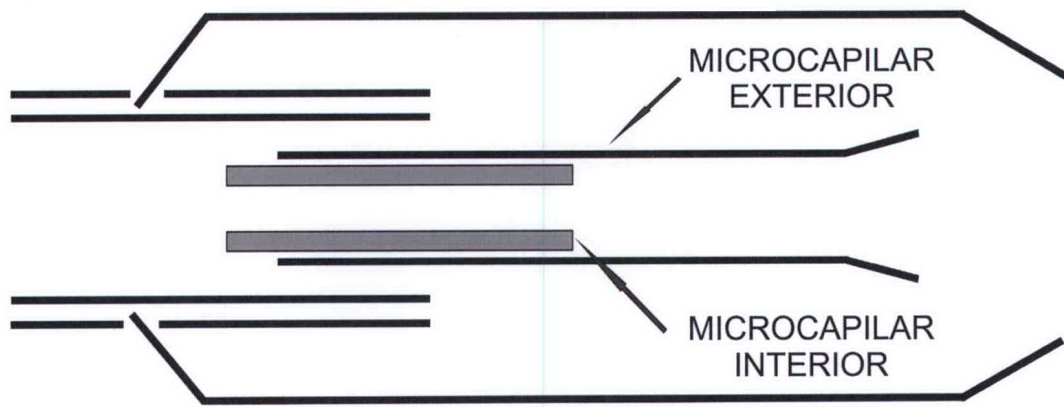


FIGURA 2.2

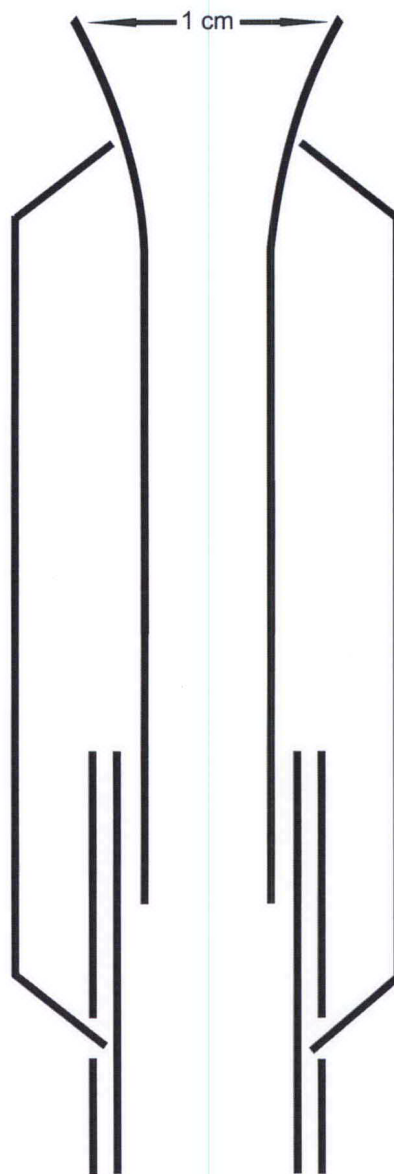


FIGURA 2.3

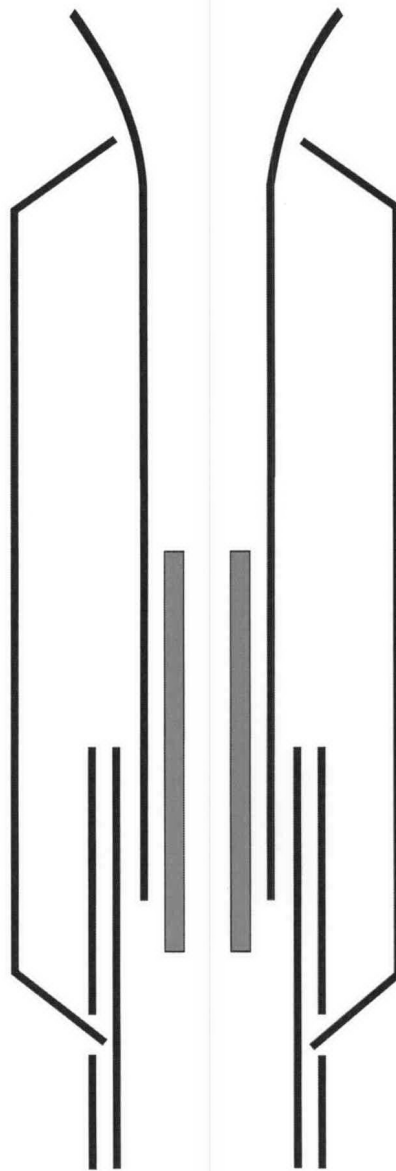


FIGURA 2.4

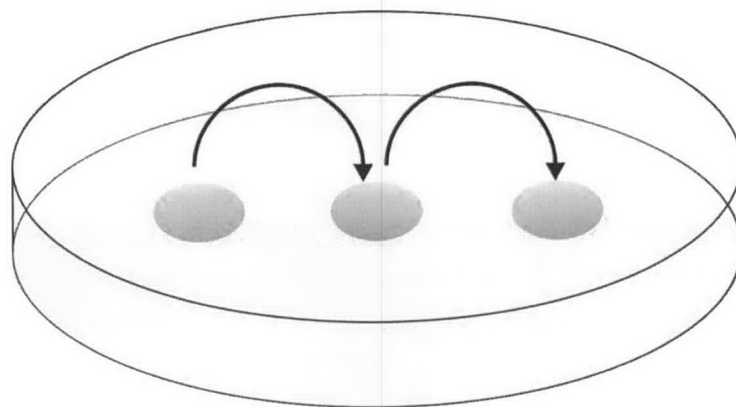


FIGURA 3

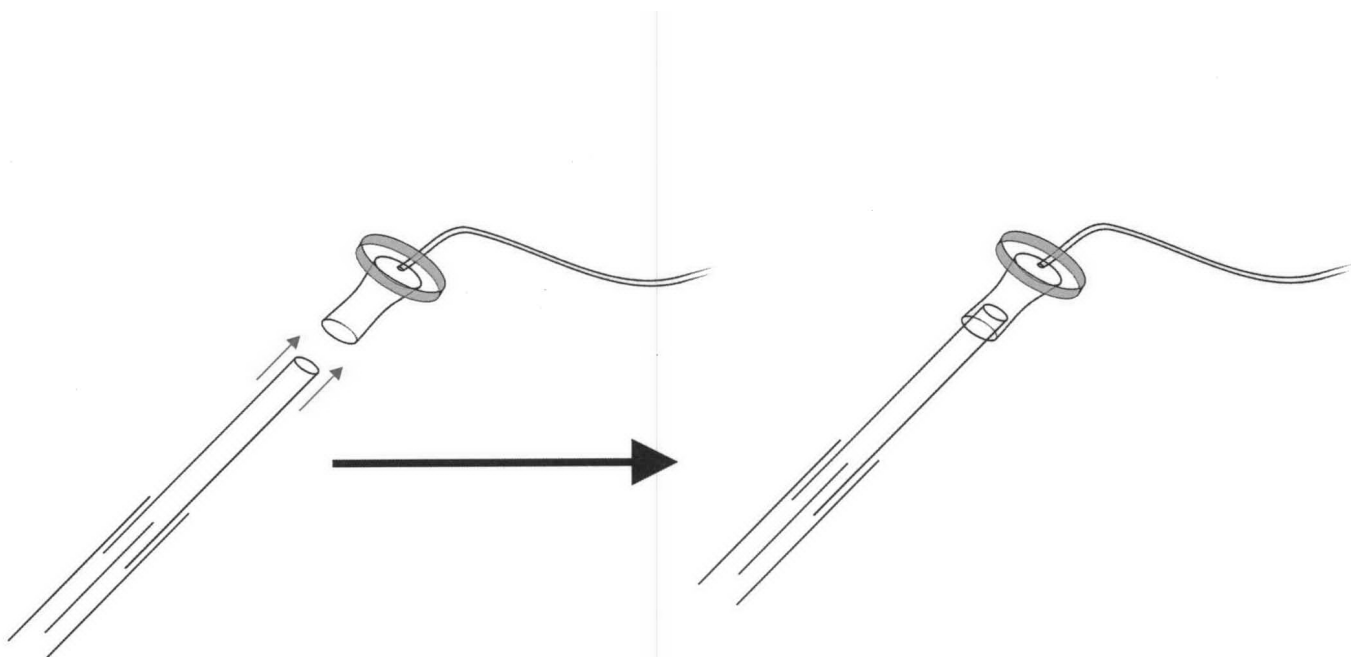


FIGURA 4.1 A

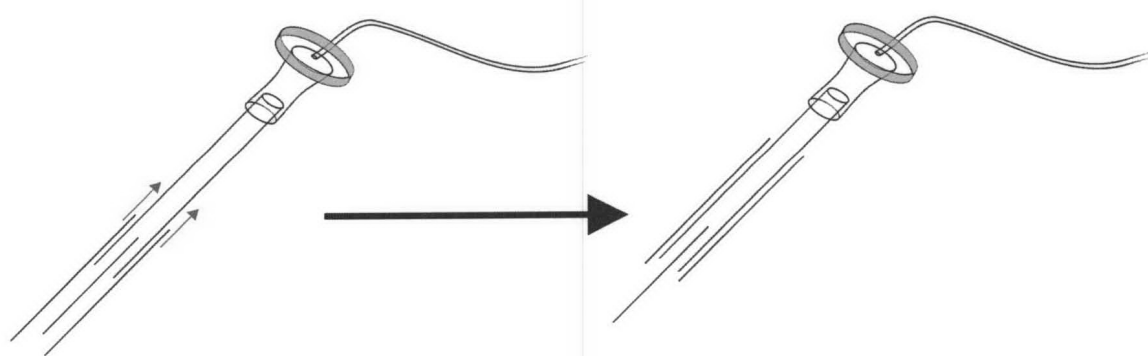


FIGURA 4.1 B

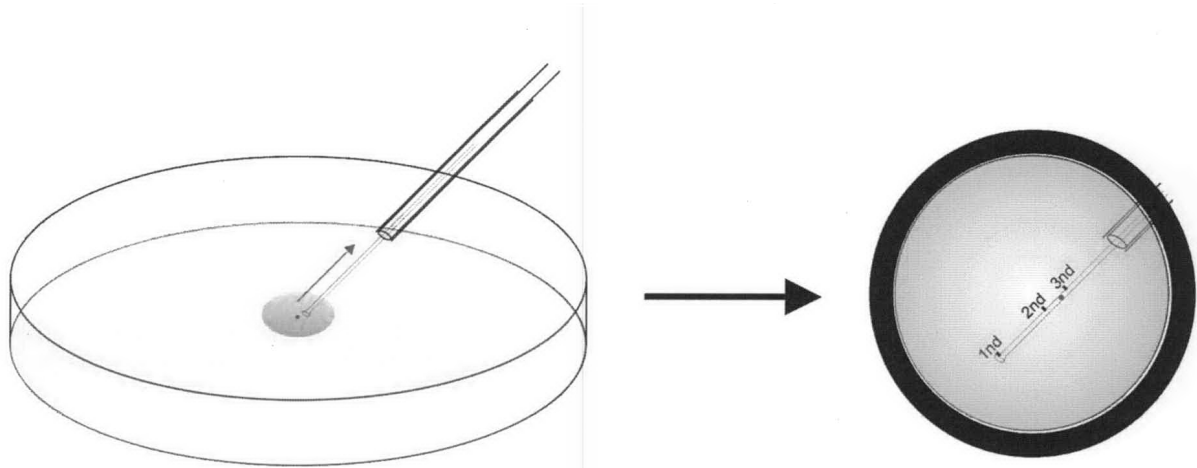


FIGURA 4.1 C

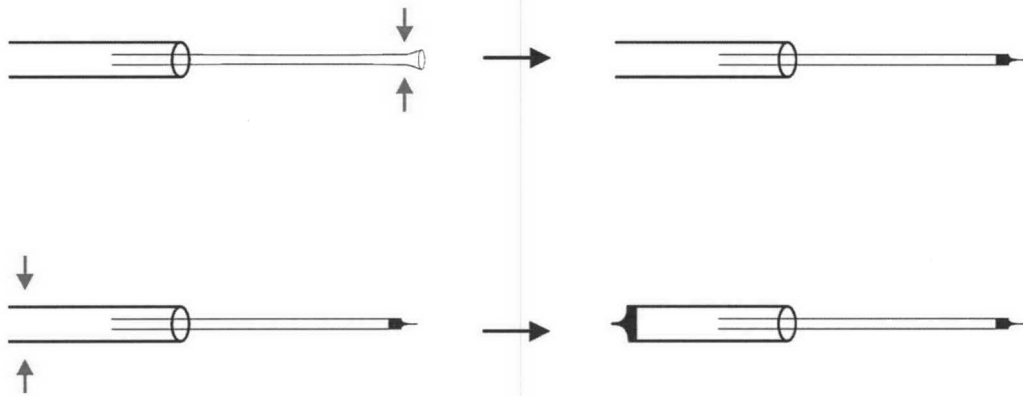


FIGURA 4.1 D

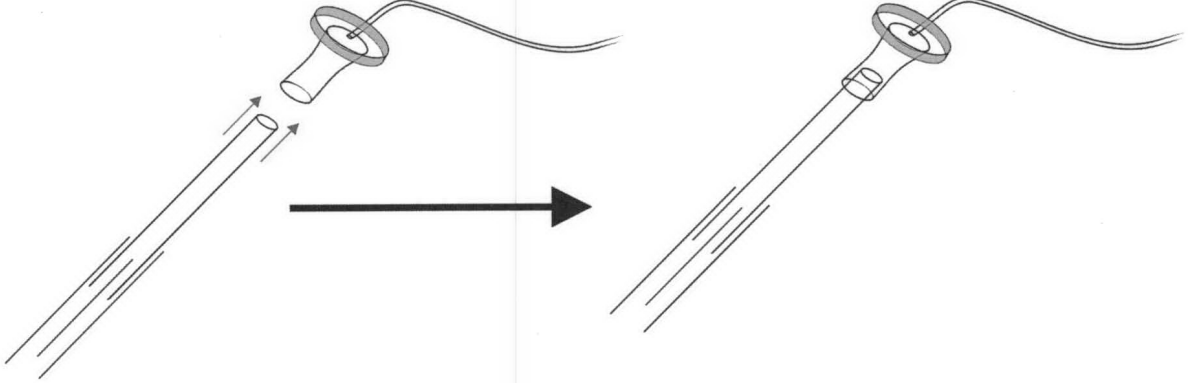


FIGURA 4.2 A

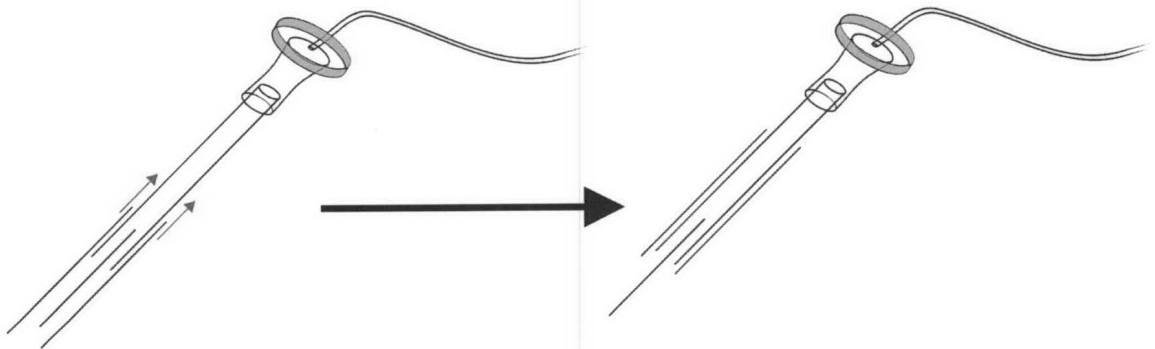


FIGURA 4.2 B

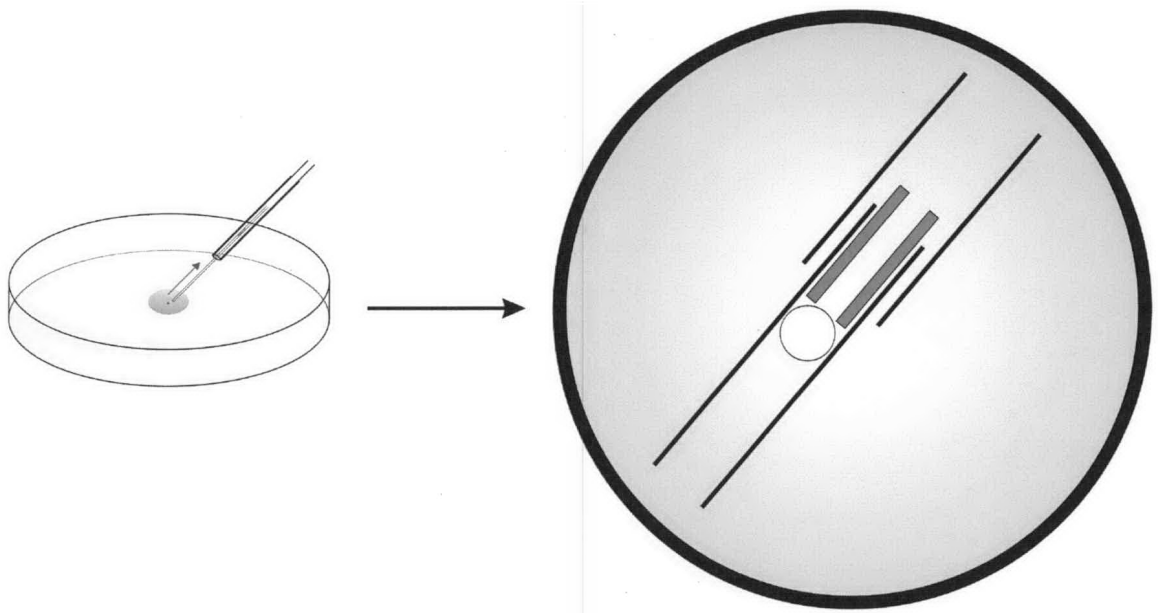


FIGURA 4.2 C

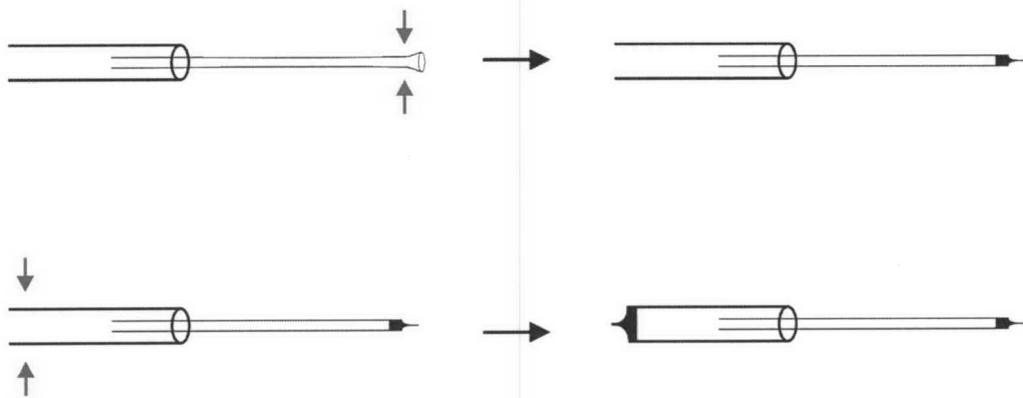


FIGURA 4.2 D

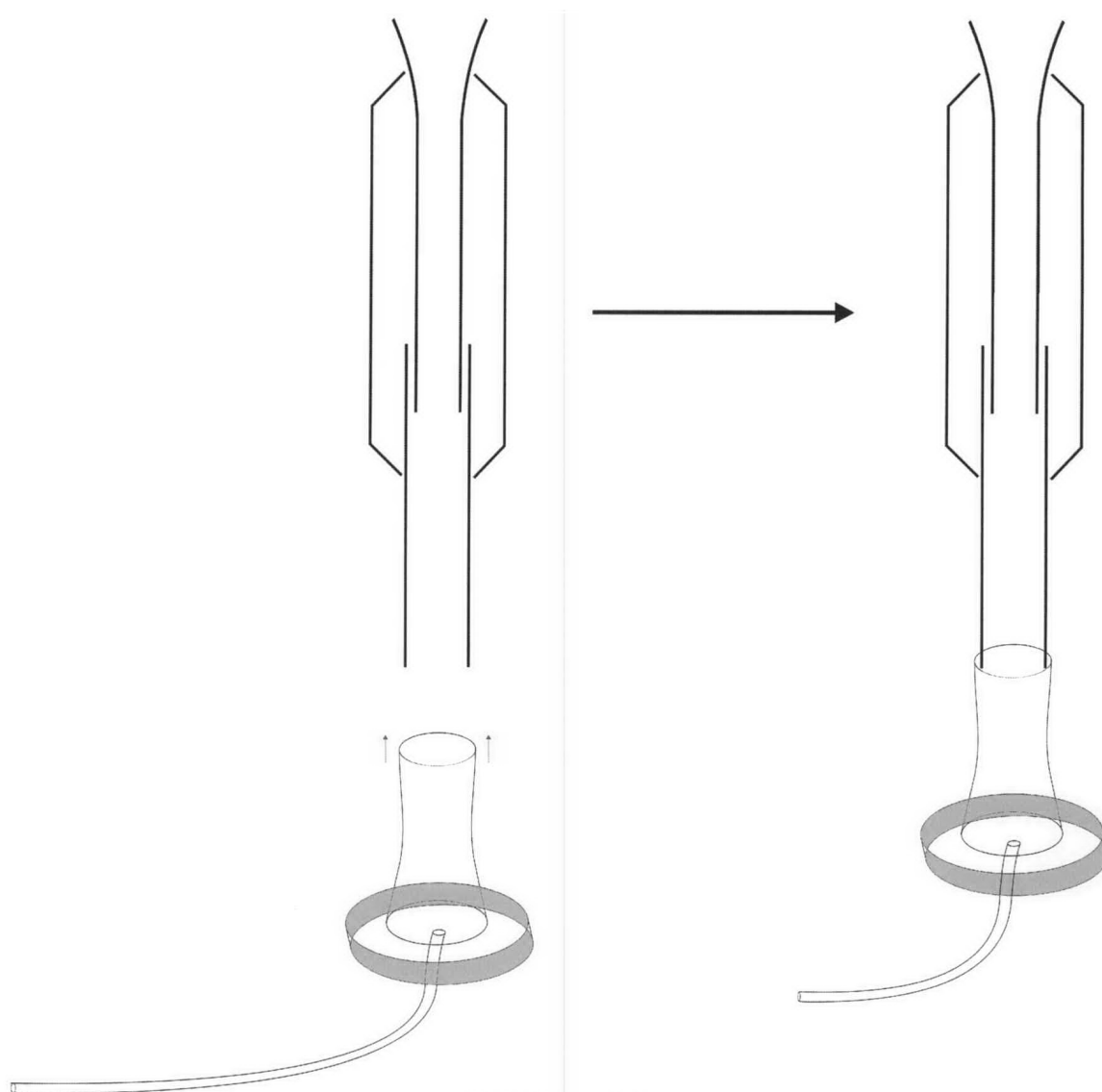


FIGURA 4.3 A

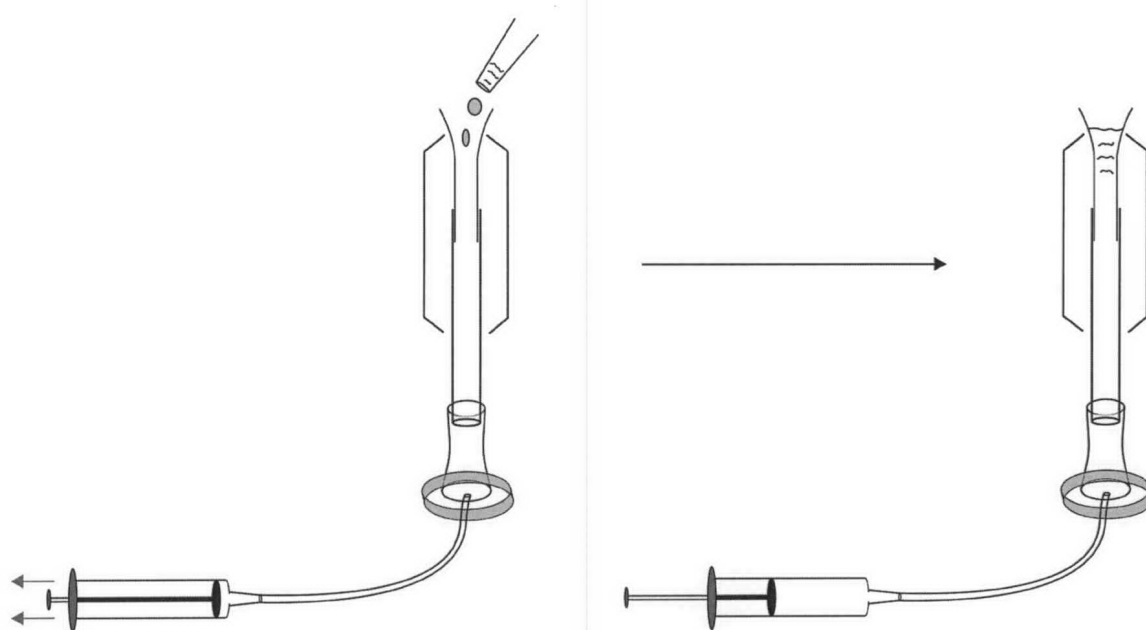


FIGURA 4.3 B

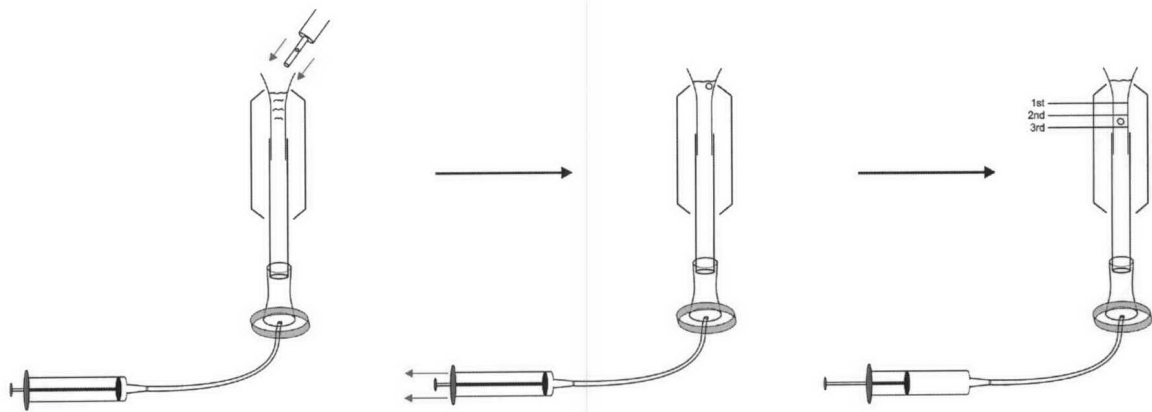


FIGURA 4.3 C

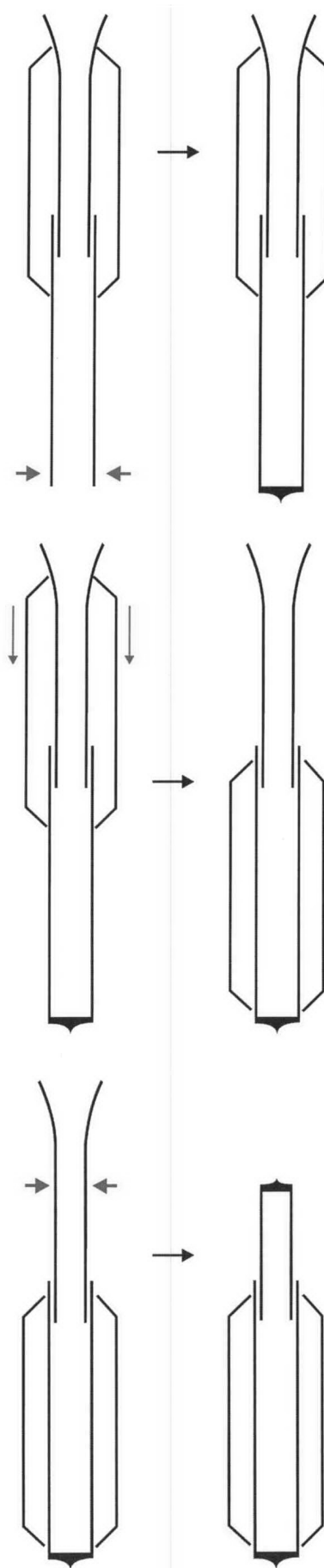


FIGURA 4.3 D

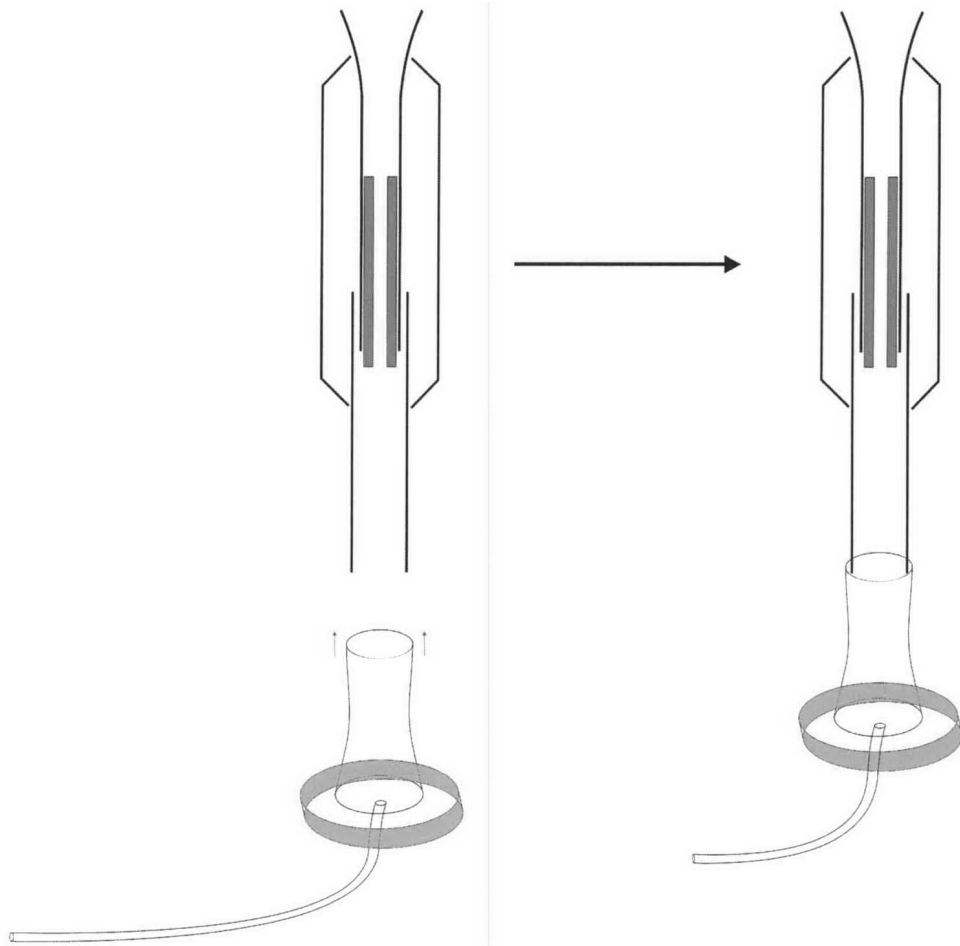


FIGURA 4.4 A

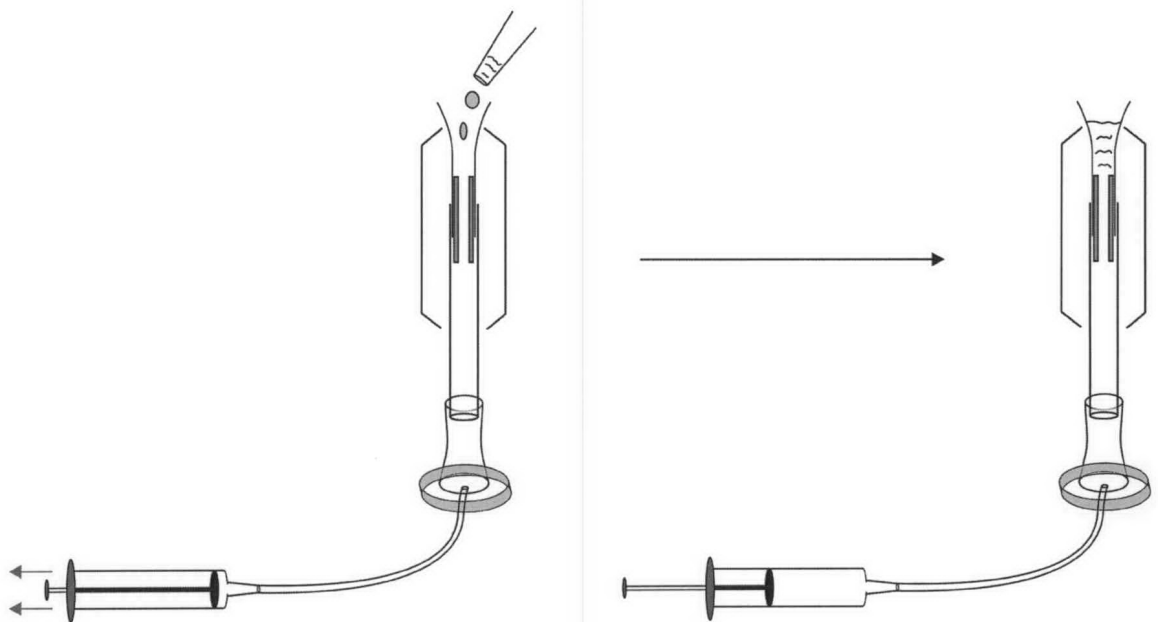


FIGURA 4.4 B

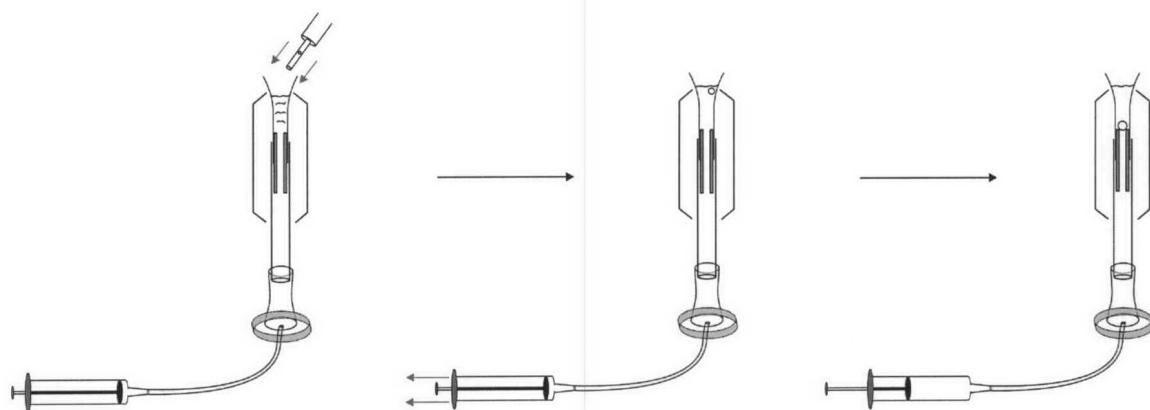


FIGURA 4.4 C

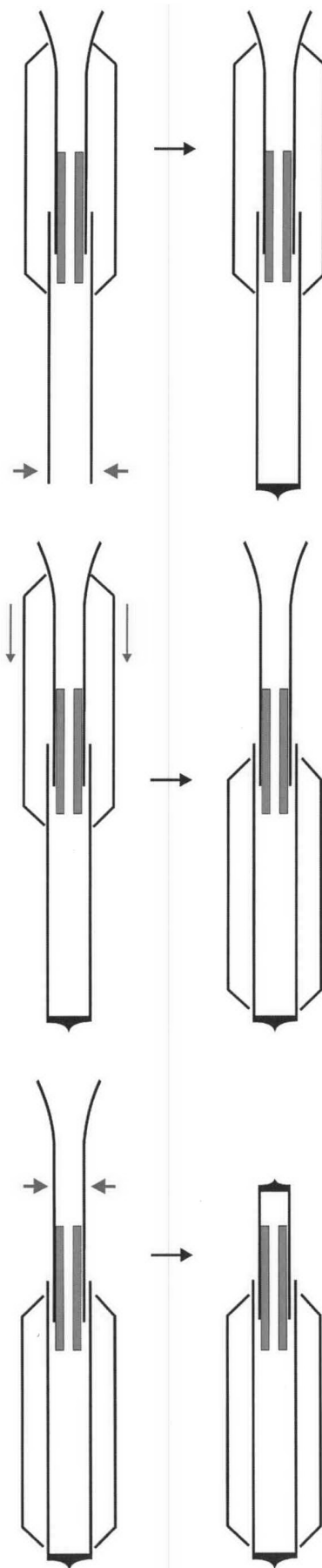


FIGURA 4.4 D

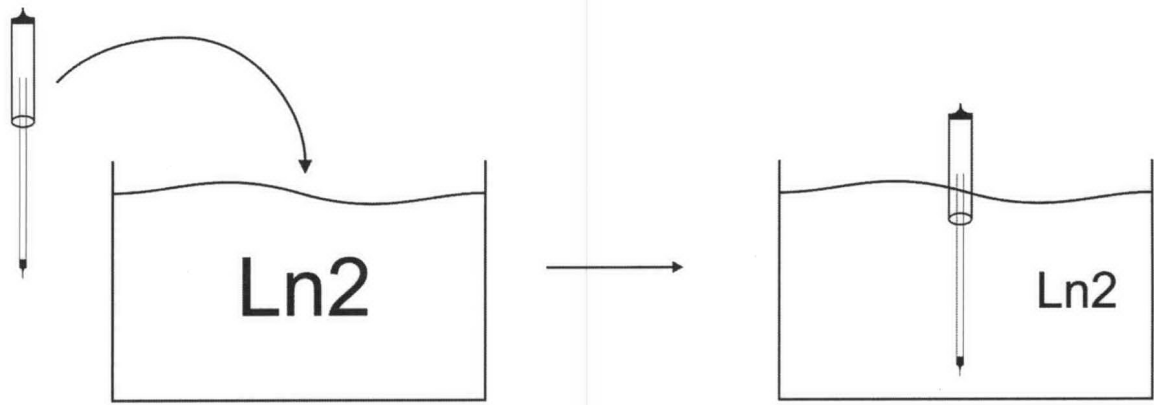


FIGURA 5 A

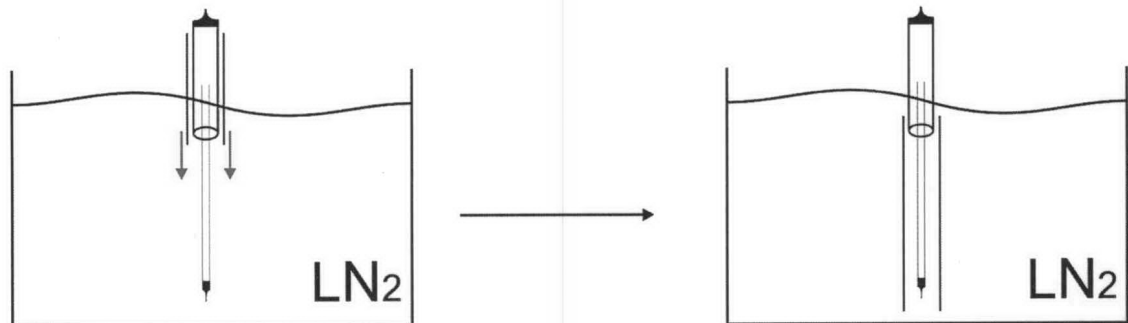


FIGURA 5 B

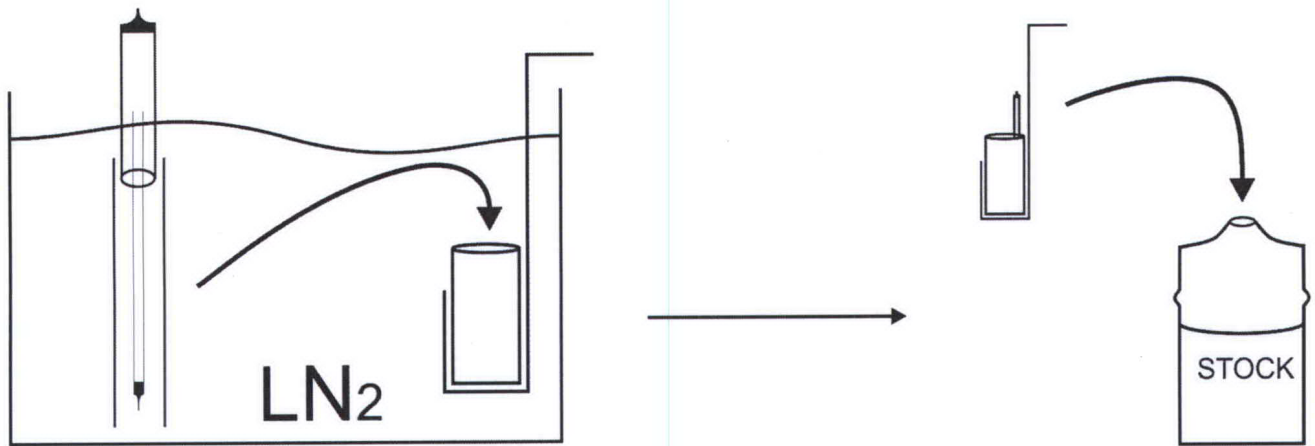


FIGURA 6

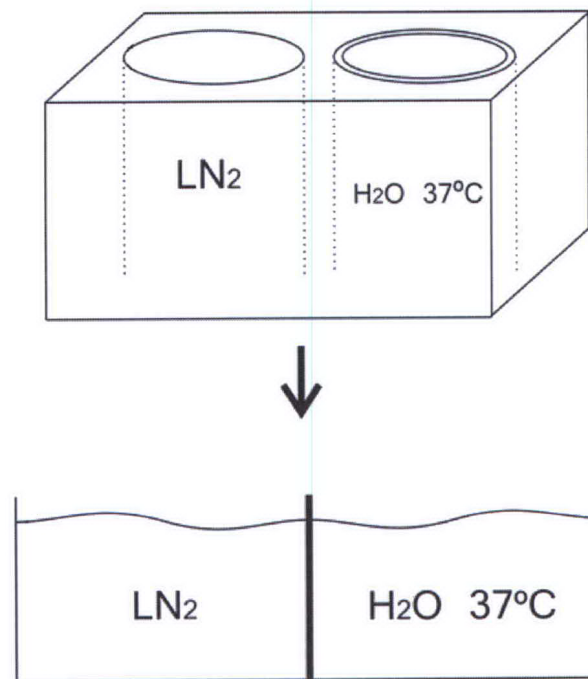


FIGURA 7 A

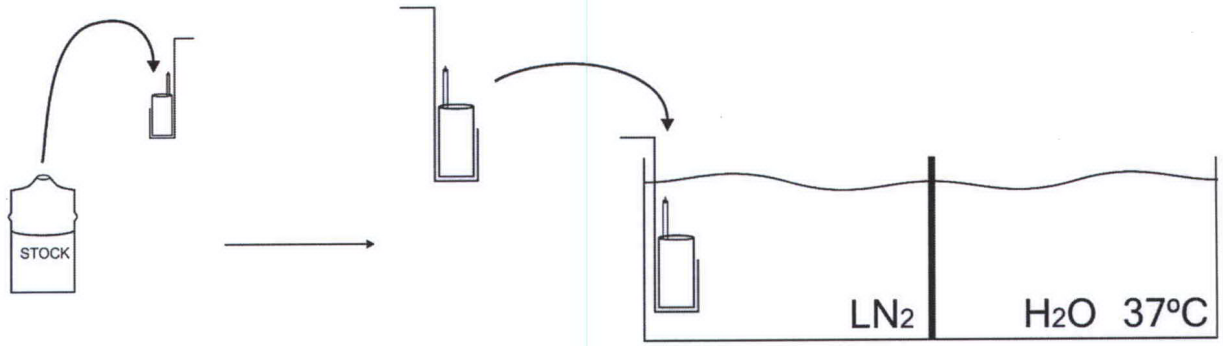


FIGURA 7 B

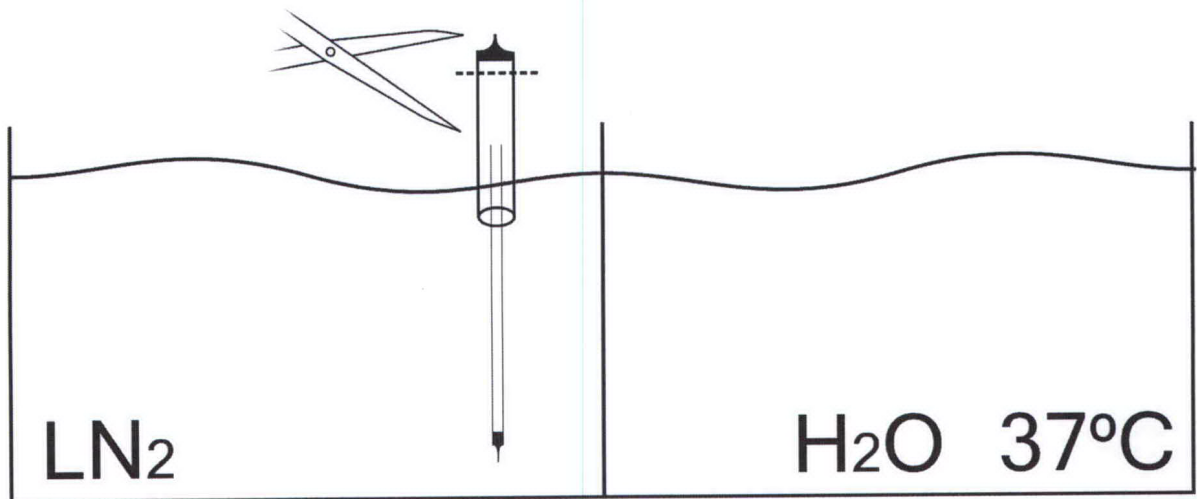


FIGURA 7 C

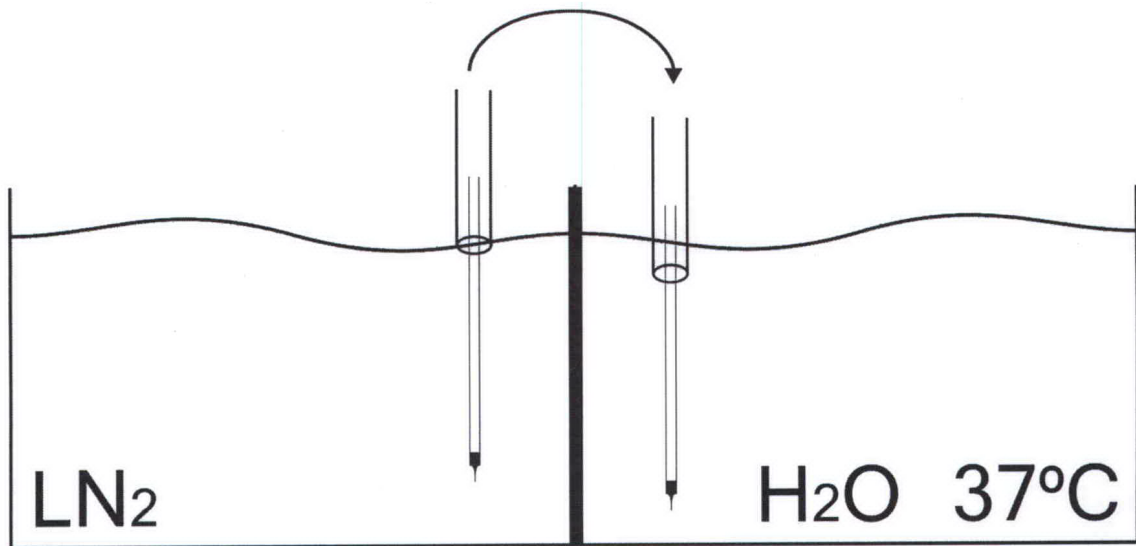


FIGURA 7 D

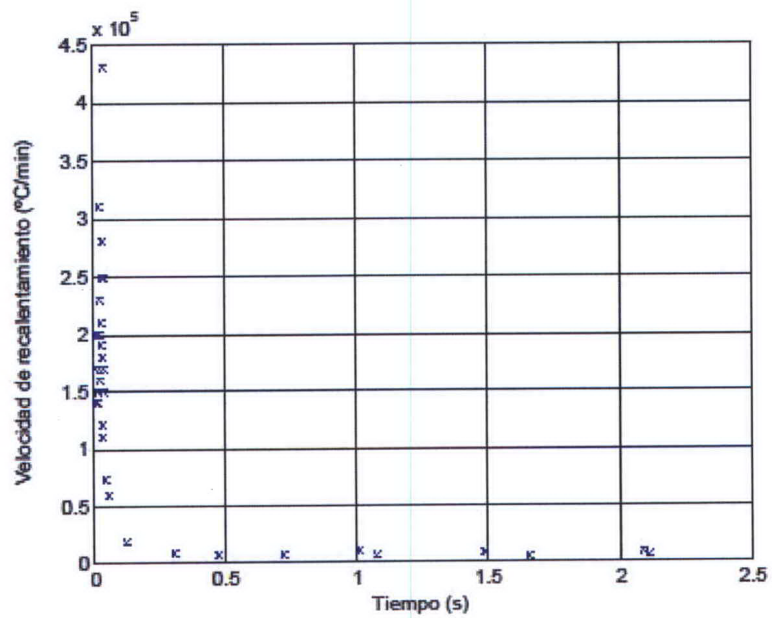


FIGURA 8

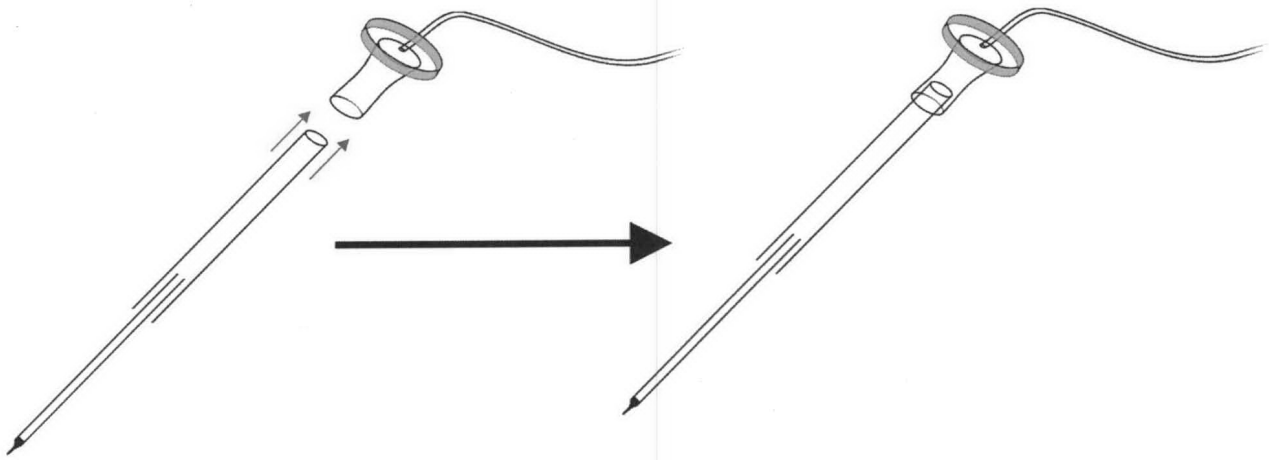


FIGURA 9 A

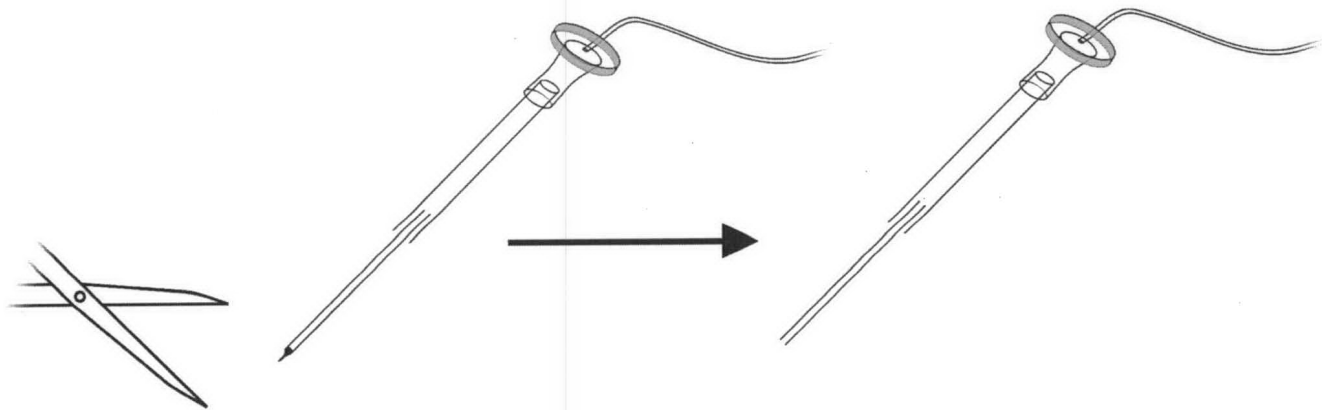


FIGURA 9 B

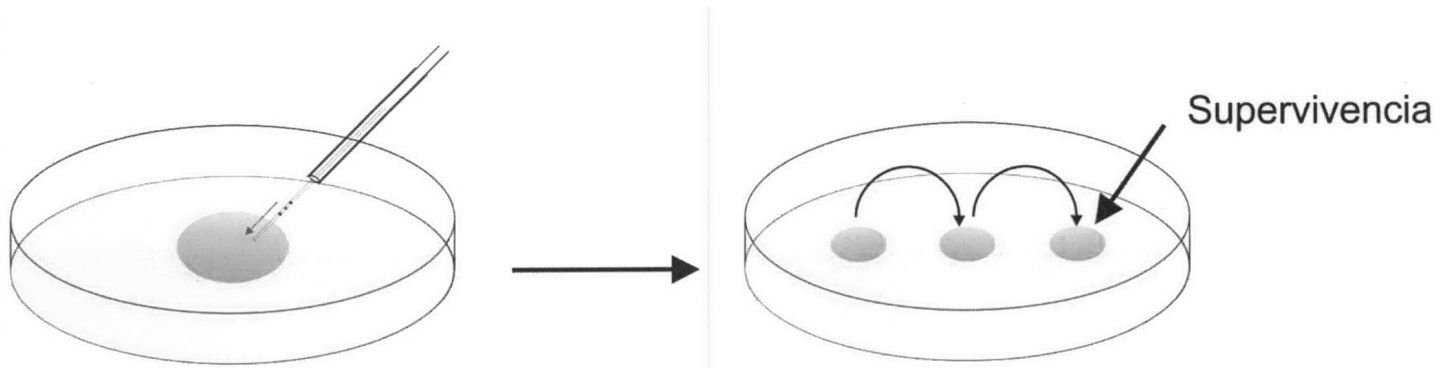


FIGURA 10



- ②① N.º solicitud: 201500752
②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.10.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N1/02** (2006.01)
G01N1/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20060046243 A1 (JAMES JOSEPH STACHECKI et al.) 02.03.2006, página 2, columna 2, línea 36 - página 5, columna 2, línea 62;	1-16
A	US 20090123996 A1 (MILTON CHIN) 14.05.2009, Todo el documento	1-16
A	EP 2156735 A1 (DR. H. ZECJ GMBH.) 24.02.2010, Columna 2, línea 15 - columna 5, línea 31; figura 7,	1-16
A	US 20080233633 A1 (PHILIPPE CLAIRAZ et al.) 25.09.2008, página 1, columna 2, línea 52 - página 4 columna 1, línea 19; línea 52	1-6
A	US 20110275153 A1 (BRADLEY K. BUTLER et al.) 10.11.2011, página 2, columna 1 línea 8 - página 5, columna 1, línea 16; figura 1,	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.10.2016

Examinador
M. Ybarra Fernandez

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.10.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-16	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20060046243 A1 (JAMES JOSEPH STACHECKI et al.)	02.03.2006
D02	US 20090123996 A1 (MILTON CHIN)	14.05.2009
D03	EP 2156735 A1 (DR. H. ZECJ GMBH.)	24.02.2010
D04	US 20080233633 A1 (PHILIPPE CLAIRAZ et al.)	25.09.2008
D05	US 20110275153 A1 (BRADLEY K. BUTLER et al.)	10.11.2011

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El documento D01 reivindica un método de vitrificación de células de mamíferos. De acuerdo con el método de la presente invención, las células biológicas de origen mamífero se congelan rápidamente por un método de vitrificación. Tras la exposición a un líquido de refrigeración, las células biológicas se someten a la vitrificación. Las células biológicas que han sido sometidos a vitrificación se pueden almacenar durante un período de tiempo y luego desvitrificados en una fecha posterior. Las células biológicas desvitrificadas permanecen viables. Células biológicas preferidas de acuerdo con la presente invención son células susceptibles de desarrollo, incluyendo blastocistos, embriones y ovocitos.

El documento D02 describe un dispositivo de cierre para crear un sello en un recipiente criogénico para un espécimen biológico utiliza la transformación de fase inducida por la temperatura de los materiales con memoria de forma para causar un actuador para alternar entre un estado selladas y no selladas. La incitación temperatura se produce de forma natural dentro de los cambios normales de temperatura que se producen durante la vitrificación criogénica de muestras biológicas.

El documento D03 reivindica un instrumento para la vitrificación y el almacenamiento de espécimen biológico, en concreto de esperma, ovocitos, embriones, mórulas o blastocistos que comprende: un elemento de almacenamiento que está hecha de un material de nitrógeno-resistente a los líquidos, y un miembro de protección tubular para proteger dicho almacenar miembro, el elemento de protección tubular está también hecha de un material de nitrógeno-resistente a los líquidos, en el que dicho elemento de almacenamiento comprende una parte del cuerpo cilíndrico que tiene una celda de almacenamiento de la parte en una porción delantera, y que tiene una parte de extremo trasero en una parte extrema, en el que la célula de almacenamiento de parte se forma como un rebaje en la parte del cuerpo, y en el que el elemento de almacenamiento que tiene un diámetro exterior menor que el diámetro interior del elemento tubular de protección de modo que el elemento de almacenamiento puede ser insertado y acomodado en el elemento de protección tubular.

El documento D04 se refiere a un revestimiento para el envasado de un volumen predeterminado de una sustancia biológica diseñado para ser sumergido en un agente criógeno líquido que comprende un tubo delgado, caracterizado porque comprende además un lastre asociada con dicho tubo delgado.

El documento D05 describe un dispositivo de crioconservación para el almacenamiento de material biológico reproductiva. El dispositivo comprende un primer elemento alargado incluye un primer miembro alargado que se extiende entre un extremo distal y un extremo proximal, una primera porción de protuberancia dispuesta alrededor de una circunferencia del primer miembro, y un canal definido en el primer miembro, el canal está configurado para recibir un reproductiva respecto muestra biológica. Un segundo miembro incluye un segundo miembro con un lumen definido a su través. El segundo miembro está configurado para deslizarse sobre el primer elemento y el diámetro interior del segundo miembro es similar a un diámetro exterior de la porción de protuberancia para formar un sello entre el primer y segundo miembros.

La invención reivindicada no es obvia para un experto en la materia, ya que no hay información en los documentos citados que puedan dirigir al experto en la materia al método/solución/dispositivo reivindicado. Por lo tanto, la invención cumple con los requisitos de novedad y actividad inventiva según los Artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.