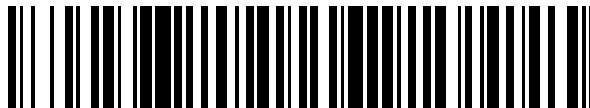


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 318**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12M 1/32** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**C12M 1/34** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2013** **E 13159965 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017** **EP 2781591**

54 Título: **Bandeja, sistema y método de supervisión y de cultivo de un cultivo celular**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.08.2017**

73 Titular/es:

**UNISENSE FERTILITECH A/S (100.0%)**  
**Tueager 1**  
**8200 Aarhus N, DK**

72 Inventor/es:

**HANSEN, JONAS LERCHE;**  
**RAMSING, NIELS B.;**  
**PORSGAARD, SØREN;**  
**PLOUGSGAARD, HOLGER SØE y**  
**ISAKSEN, MAI FAURSCHOU**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 628 318 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**

Bandeja, sistema y método de supervisión y de cultivo de un cultivo celular

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un dispositivo, referido en la presente memoria como una bandeja, un sistema y un método para facilitar la supervisión y/o el cultivo de objetos microscópicos, en particular, cultivos celulares, tales como embriones como parte de una fertilización *in vitro* (FIV). En una realización, la invención proporciona imágenes de alta resolución de los embriones en desarrollo con un detalle superior debido a una mayor apertura numérica. En otra realización, la invención procura facilitar la manipulación y la identificación segura de los embriones durante la formación de imágenes digitales automatizada y microscopía de lapso de tiempo.

10

Antecedentes de la invención

15

En microscopía de cultivos de células eucariotas y procariotas vivas, incluyendo ovocitos y embriones durante, p. ej., el tratamiento por FIV, es deseable generalmente para reducir el estrés impuesto a los cultivos celulares durante la manipulación de los mismos.

20

El diámetro de embriones humanos tempranos es de aproximadamente 1/8 mm (aproximadamente 120 µm) con una densidad ligeramente superior que su medio de crecimiento. El posicionamiento de los embriones con precisión mediante el uso de gotitas en el medio es difícil, y la manipulación puede alterar fácilmente su posición. Cuando se aplican técnicas de transferencia de embriones (TE), tales como FIV (fertilización *in vitro*) y técnicas relacionadas, el cultivo *in vitro* del embrión en desarrollo se lleva a cabo durante un periodo de días antes de la transferencia de embriones seleccionados de nuevo al útero de la paciente receptora. Incluso en condiciones ideales de crecimiento, se necesitan criterios de selección como herramienta para elegir los embriones más viables para la transferencia puesto que la mayoría de los embriones tienen defectos genéticos (p. ej., aneuploidía) que les impiden desarrollarse en lactantes sanos. La evaluación de la viabilidad de un embrión determinará la idoneidad de los embriones para la transferencia. En la FIV tradicional, la evaluación del embrión se limita a una clasificación más o menos subjetiva basada en criterios morfológicos. Como el desarrollo del embrión es un proceso dinámico y gradual, éste es habitual y ampliamente evaluado por una sucesión de imágenes, tales como las proporcionadas por microscopía de lapso de tiempo (LT). La automatización es esencial cuando se capturan imágenes a intervalos temporales definidos de numerosos embriones en crecimiento y es un requisito previo para el uso clínico de formación de imágenes de LT para la evaluación de la viabilidad del embrión. En un nivel práctico, un posicionamiento preciso para microscopía facilita la evaluación de la viabilidad de un embrión basándose en la formación de imágenes de lapso de tiempo automatizada.

25

30

35

Por lo tanto, existe una necesidad de un método, sistema y dispositivo rápido, sencillo y no molesto para facilitar y automatizar la evaluación morfológica.

40

La publicación de patente internacional nº WO 2009/003487 desvela un dispositivo para su uso durante la supervisión y/o cultivo de objetos microscópicos. El dispositivo desvelado en ella aborda cuestiones relacionadas con la proporción de condiciones estables de incubación y con la facilidad de manipulación de los objetos, incluyendo la manipulación automatizada.

45

Un microscopio se utiliza habitualmente para supervisar ópticamente cultivos celulares, tales como embriones. La adquisición de imágenes digitales y equipos de análisis se aplican normalmente para ayudar a un examinador humano en la obtención de la información adecuada cuando sea necesario a partir de las imágenes adquiridas con un microscopio. En aplicaciones de microscopía convencionales, tales como las utilizadas en FIV, existe por lo general una cierta distancia entre una lente óptica de un microscopio y el cultivo celular que se va a supervisar, la distancia viene dada por el grosor de una bandeja que aloja el cultivo celular, el aislamiento y los elementos conductores de calor proporcionan un entorno termostático y los elementos de sellado mantienen una atmósfera controlada y espacios de aire entre los elementos antes mencionados para permitir el movimiento mecánico y el intercambio de los cultivos celulares que se están supervisando.

50

55

La calidad de las imágenes capturadas por microscopio desempeña evidentemente un papel en la calidad del análisis que puede efectuarse sobre la base de las imágenes. Una forma de aumentar la calidad de la imagen es aumentar la resolución de píxeles del equipo fotográfico digital, que captura las imágenes. No obstante, el aumento de resolución de la cámara más allá de la resolución del sistema óptico no proporcionará detalles adicionales sino que sólo ampliará la imagen reproduciendo los contornos borrosos de los componentes visibles.

60

La resolución del sistema de ópticas empleado puede describirse por la distancia requerida entre dos objetos diminutos para que puedan ser percibidos como objetos distintos y no formen parte del mismo objeto alargado (cf. descripciones de los sistemas ópticos, disco de Airy etc.): Si dos objetos visualizados por un sistema óptico están separados por un ángulo lo suficientemente pequeño como para que sus discos de Airy en el detector de sistemas ópticos (es decir, la cámara) comiencen a solaparse, los objetos ya no pueden más estar claramente separados en

65

la imagen, y comienzan a difuminarse a la vez. Se dice que dos objetos son simplemente resolubles cuando el máximo del primer patrón de Airy cae en la parte superior del primer mínimo del segundo patrón de Airy (el criterio de Rayleigh). Por lo tanto, la separación más pequeña de dos objetos que pueden tener lugar antes de difuminarse de manera significativa a la vez, se aproxima por el tamaño del disco de Airy:

5

$$h = 0,61\lambda/NA$$

en el que  $\lambda$  es la longitud de onda de la luz y NA es la apertura numérica dada por:

10

$$NA = n \cdot \sin(\theta)$$

en el que  $n$  es el índice de refracción y  $\theta$  es el semi-ángulo del cono luminoso máximo recogido por el sistema óptico.

15

Una forma de aumentar la resolución óptica (es decir, la disminución  $h$ ) sería reducir la longitud de onda de la luz utilizada (p. ej., cambio de luz roja a verde o preferentemente azul o incluso más preferentemente a luz UV). No obstante, la luz de longitud de onda corta tiene mayor energía y ha demostrado ser mucho más fototóxica para los organismos vivos que la luz de longitud de onda larga. Para aplicaciones clínicas, es aconsejable, por lo tanto, el uso de sólo luz roja de longitud de onda larga para minimizar cualquier daño potencial en los organismos vivos.

20

Otra forma de aumentar la calidad de la imagen (es decir, la disminución  $h$ ) es aumentar la apertura numérica del sistema óptico. Esto se puede lograr mediante el aumento del índice de refracción (p. ej., por microscopía de inmersión en líquido) o mediante el aumento del semi-ángulo del cono de luz recogida por el objetivo del microscopio. La inmersión en líquido no es práctica en un sistema automatizado con partes móviles que cambian mecánicamente entre la adquisición de imágenes de diferentes células/embriones. Incluso en un sistema estacionario, la limpieza y la manipulación son más complicadas cuando se utiliza inmersión en líquido y existe un mayor potencial para la contaminación.

25

Aumentar el ángulo de aceptación para el cono de luz de la luz recogida se logra por lo general mediante el posicionamiento del objetivo más cerca del objeto investigado al tiempo que aumenta la ampliación del objetivo. Los objetivos de gran ampliación con apertura numérica elevada requieren así pues una estrecha proximidad entre el objeto observado y la posición de la lente del microscopio. No obstante, no siempre es posible colocar el objetivo cerca de las células vivas, por ejemplo, si el objeto observado ha de intercambiarse mecánicamente con otros objetos similares y si el objeto ha de estar en un entorno estable protegido (p. ej., en un soporte termostático con transferencia directa de calor al recipiente de cultivo). Los sistemas de cultivo que mantienen un entorno termostático y una atmósfera controlada optimizados para el desarrollo del embrión suelen requerir una distancia/separación mínima entre las células vivas y el objetivo del microscopio como se ha mencionado anteriormente.

30

35

El aumento del diámetro de la lente óptica para aumentar el ángulo de aceptación de la luz incidente es generalmente prohibitivamente costoso. La apertura numérica de un sistema óptico basado en elementos microscópicos convencionales (objetivo, lentes tubáricas y lentes de cámara) puede así no aumentar infinitamente, y el requisito de mantener un entorno estable para el desarrollo embrionario/cultivo celular puede limitar aún más la resolución óptica que puede lograrse. La resolución óptica y, por consiguiente, la calidad de imagen, es por lo tanto limitada.

40

45

El documento WO 2009/003487 desvela un dispositivo, un sistema y un método para realizar la supervisión y/o el cultivo de objetos microscópicos. Los objetos microscópicos son, en particular, organismos microscópicos similares a bacterias y a cultivos celulares, tales como objetos de cultivo similares a muestras de tejido y embriones, que proporcionan condiciones de cultivo óptimas y seguras para la incubación durante el desarrollo del embrión y facilitan la selección de embriones óptimos que se van a utilizar en la fertilización *in vitro* (FIV) facilitando la manipulación embrionaria por la formación de imágenes digitales automatizada y la microscopía de lapso de tiempo.

50

El documento US 5.171.995 desvela un soporte de muestras para colocar una sustancia de muestra para mediciones de transmisión con radiación óptica en un espectrómetro. El soporte de muestras está fabricado al menos parcialmente de un material transparente a la radiación óptica en una región de longitud de onda entremezclada y que exhibe un índice de refracción superior a 1 y que está configurado como una lente convergente con una superficie cóncava y una superficie convexa. Para tomar un espectro de absorción de una sustancia de muestra disuelta o suspendida en polvo y/o fluido, la sustancia de muestra se lleva a la superficie cóncava del soporte de muestras antes de la medición en la que, como consecuencia de la curvatura y en contraste con una superficie plana, se concentra en una región superficial sustancialmente más pequeña. Se dice que la configuración del soporte de muestras como una lente convergente aumenta el rendimiento de la radiación que penetra a través de la sustancia de muestra sobre el detector de la configuración del espectrómetro.

55

60

El documento EP 0 963 790 desvela una placa de microtitulación que tiene cámaras con partes superiores abiertas y que se dice que es útil en aplicaciones microbiológicas. La placa de base es transparente. Una lente o reflector óptico se sitúa cerca de la base de las cámaras. Preferentemente, la lente es convexa o cóncava. La base de la cámara forma la lente. El material reflectante se sitúa en la base. La lente está formada alternativamente por la

#### Descripción de la invención

Con los antecedentes anteriores, es un objeto de las realizaciones de la invención proporcionar una bandeja para alojar cultivos celulares durante el cultivo de los mismos y un sistema y un método para la manipulación de cultivos celulares durante el cultivo de los mismos, lo que aumenta la calidad de las imágenes de los cultivos celulares, tales como embriones, capturadas a través de una lente microscópica. Es un objeto adicional de las realizaciones de la invención proporcionar una bandeja y un sistema, cuya fabricación y cuyo funcionamiento es de bajo costo. Es un objeto adicional de las realizaciones de la invención proporcionar un sistema robusto y resistente en el que la probabilidad de mezcla no prevista de cultivos celulares/embriones se reduce y resultó correcto que el reposicionamiento del cultivo celular/embriones entre fotogramas consecutivos es menos crítico.

En un primer aspecto, la invención proporciona una bandeja para alojar un cultivo celular para su uso durante el cultivo de los mismos y/o para la supervisión óptica del cultivo celular, la bandeja comprende una estructura portadora que define al menos una zona de recepción para alojar el cultivo celular, en la que la estructura portadora comprende al menos una lente focal, que es parte integrante de la estructura portadora o se une a la misma, al menos una lente focal se dispone para recoger los rayos luminosos que emanan de al menos una zona de recepción con el fin de facilitar la supervisión del cultivo celular a través de la lente focal y la estructura portadora, en la que un diámetro de la lente focal supera un diámetro de al menos una zona de recepción.

Por tanto, sería conveniente que la presente invención presente un sistema en el cual parte del sistema óptico de ampliación que reside convencionalmente en el objetivo del microscopio se incorpore en sí en el recipiente de cultivo y de este modo logre efectivamente un aumento de la distancia de trabajo entre el objeto supervisado (célula o embrión vivo) y el objetivo de una ampliación y calidad de la imagen dados, que no se puede lograr con los objetivos tradicionales de larga distancia de trabajo.

La lente focal se proporciona para aumentar la resolución óptica de las imágenes adquiridas a través de la lente focal y la estructura portadora cuando se observa al menos una zona de recepción mediante el aumento de la apertura numérica del sistema óptico combinado. En otras palabras, al menos una lente focal se dispone para aumentar la apertura numérica de un sistema óptico para la inspección de al menos una zona de recepción a través de la estructura portadora. Gracias a al menos una lente focal, la calidad de las imágenes de microscopio capturadas se mejora en el sentido de que la calidad de imagen no se restringe a las propiedades de una lente de microscopio o cualquier otra lente externa a través de la cual se capturan las imágenes. Además, dado que por lo general existe una cierta distancia entre una lente óptica de un microscopio y el cultivo celular que va a supervisarse debido a la presencia de la bandeja que aloja el cultivo celular y de los elementos aislantes y de sellado y los espacios de aire entre los elementos anteriormente mencionados, la lente focal de la bandeja de la presente invención permite la recogida de los rayos luminosos a partir de un plano focal que se extiende o a través del cultivo celular por medio de una lente que tiene dimensiones que son considerablemente más pequeñas que una lente remota dispuesta a una distancia de, p. ej., 8-10 mm desde la bandeja.

En el presente contexto, la expresión lente focal debe entenderse como aquella que abarca cualquier estructura transparente con al menos una superficie curvada o con una estructura simétrica para proporcionar una concentración de rayos luminosos. Una lente focal es, así pues, una expresión para cualquier tipo de lente convexa (p. ej., biconvexa, plano convexa u otras lentes con un menisco positivo). Una lente focal es una lente convergente, y la expresión no se aplica a lentes divergentes cóncavas, pero no se restringe a lentes esféricas. La lente puede ser una lente esférica o esférica o una lente de Fresnel o de otro tipo de lente convergente. Se entenderá que la lente focal se proporciona para aumentar una apertura numérica de la estructura portadora para la supervisión de al menos una zona de recepción.

A fin de garantizar la ampliación apropiada de toda la estructura celular en la zona de recepción con distorsión limitada, un diámetro de la lente focal supera preferentemente un diámetro de al menos una zona de recepción. Por ejemplo, la lente focal puede definir un primer diámetro  $D_L$  en su interfaz con una superficie de la estructura portadora. La zona de recepción, formada p. ej., como un pocillo en depresión en la estructura portadora, puede definir un segundo diámetro  $D_z$ . En una realización preferente de la invención, el diámetro  $D_z$  de la zona de recepción es inferior al diámetro  $D_L$  de la lente con el fin de asegurar que la lente proporcione una ampliación suficiente de toda el área superficial de la zona de recepción, p. ej., en la parte inferior del pocillo. En una realización más preferente de la invención, el diámetro de la zona de recepción es menos de la mitad del diámetro  $D_L$  de la lente. En una realización más preferente de la invención, el diámetro de la zona de recepción es inferior a un cuarto del diámetro  $D_L$  de la lente. En algunas realizaciones, la lente es semiesférica, en cuyo caso el diámetro  $D_L$  de la lente es el radio de la semiesfera. En otras realizaciones, la superficie de la lente es una parte de un hemisferio más grande, en cuyo caso el radio de la curvatura de la superficie de la lente debe superar preferentemente el diámetro

de la zona de recepción aunque el diámetro de la lente en sí pueda ser menos del doble del diámetro de la zona de recepción.

La zona de recepción se puede proporcionar como un pocillo en la estructura portadora. Por ejemplo, una depresión puede formarse en la estructura portadora para definir el pocillo. En la depresión, puede proporcionarse una entalladura para alojar el cultivo celular. Alternativamente, la zona de recepción puede proporcionarse como una estructura que sobresale de una superficie de la estructura portadora. En otra realización, la estructura de recepción está en el mismo plano que la superficie portadora pero rodeada por una pared que sobresale. La forma de la zona de recepción puede ser circular, pero podría también ser rectangular, cuadrada, hexagonal etc. No obstante, la delimitación de la zona de recepción puede asegurar que las células/embriones se posicionen correctamente con respecto a la lente focal para asegurar la calidad de la imagen. La zona de recepción puede estar rodeada además de paredes, o constituir depresiones, pocillos etc. para reducir la posibilidad de que los embriones se desplacen accidentalmente por vibraciones o durante la manipulación.

El cultivo celular es habitualmente una estructura que tiene un diámetro no superior a 2 mm, tal como máximo 1 mm, tal como menos de 500  $\mu\text{m}$ , tal como menos de 200  $\mu\text{m}$ . La zona de recepción tiene preferentemente un diámetro de aproximadamente 1,1 a 10 veces el diámetro del cultivo celular, preferentemente 1,5 a 3 veces el diámetro del cultivo celular, de modo que la posición del cultivo celular en la zona de recepción está bien definida. El diámetro de la zona de recepción se comprende preferentemente entre 100 y 600  $\mu\text{m}$ , tal como entre 150 y 500  $\mu\text{m}$  o entre 200 y 300  $\mu\text{m}$ . La zona de recepción tiene preferentemente una superficie esencialmente planar para soportar el cultivo celular, pero puede tener una superficie curva para permitir que el cultivo celular se mueva hacia el centro de la estructura de recepción. En algunos casos, esto es una realización preferente, no obstante, esto puede necesitar una adaptación de la superficie de la lente para alojar cualquier distorsión óptica inducida por una superficie inferior curvada ya que la superficie curvada entre el medio y el soporte con un índice de refracción diferente actuará como un elemento de lente óptica. En realizaciones, en las que la zona de recepción comprende un pocillo formado, p. ej. por una depresión y/o una entalladura en la estructura portadora, la altura de la entalladura o pocillo puede comprenderse entre 0,1 y 5 mm, tal como entre 0,1 y 1 mm, tal como entre 0,1 y 0,4 mm.

Una pared inferior formada por la estructura portadora en la zona de recepción tiene preferentemente un grosor comprendido entre 0,2 y 5 mm, tal como entre 0,2 y 2 mm, tal como entre 0,5 y 1,5 mm, tal como entre 0,6 y 1,2 mm. La estructura portadora es preferentemente transparente. Al menos esa parte de la estructura portadora que forma una pared de fondo en la zona de recepción debe ser preferentemente transparente.

En una realización particularmente preferente, al menos una lente focal se forma a partir del material que forma la estructura portadora en al menos una zona de recepción y se moldea en una única pieza con dicho material. El material puede ser ventajosamente un material plástico, preferentemente un material termoplástico, tal como poliestireno o policarbonato. Al moldear en una única pieza la estructura portadora y la lente focal a la vez a partir de una única pieza de material, se proporciona una bandeja de bajo costo, que puede desecharse después de su uso. En consecuencia, la carga de limpieza y esterilización de la bandeja después de su uso puede eliminarse. El moldeo en una única pieza de la lente focal y la estructura portadora a la vez a partir de una única pieza de material es en particular posible en realizaciones en las que un diámetro de la lente focal supera un diámetro de la zona de recepción, tal como, por ejemplo, en realizaciones en las que el diámetro de la lente focal supera 0,8 mm. En tales diámetros de lentes, las tolerancias de fabricación alcanzables son posibles puesto que no afectan a las propiedades ópticas de la lente en un grado satisfactorio.

Como alternativa al moldeo en una única pieza de la estructura portadora y la lente focal a partir de un único material, al menos una lente focal puede proporcionarse como un elemento separado fabricado que se incorpora a la estructura portadora o se une a la misma. La lente focal puede formarse a partir de un material distinto del material que forma la estructura portadora en al menos la zona de recepción, o puede formarse a partir del mismo material que el material que forma la estructura portadora en al menos una zona de recepción.

En una realización de la invención, al menos una zona de recepción comprende una pluralidad de zonas de recepción, y cada una de al menos una lente focal tiene un tamaño para cubrir sólo una única zona de recepción. Por tanto, el número de lentes focales es igual al número de zonas de recepción. En otra realización, al menos una zona de recepción comprende una pluralidad de zonas de recepción, en la que una sola de al menos una lente focal tiene un tamaño para cubrir al menos dos de dichas zonas de recepción. En cualquier realización, un diámetro de la lente focal tiene un tamaño preferentemente para superar un diámetro de la zona de recepción. Por ejemplo, el diámetro de la zona de recepción puede comprenderse entre 0,1 y 0,5 mm, y el diámetro de la lente puede ser al menos 0,8 mm por ejemplo, entre 1 y 2 mm.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un sistema de cultivo de un cultivo celular y para la supervisión óptica del mismo durante el cultivo del cultivo celular, que comprende una bandeja de acuerdo con el primer aspecto de la invención como se reivindica y se describe en la presente memoria, y una unidad de inspección óptica dispuesta para permitir o facilitar la supervisión óptica del cultivo celular alojado en al menos una zona de recepción de la estructura portadora.

El sistema de acuerdo con el segundo aspecto de la invención puede incluir una cámara de cultivo, tal como una cámara de incubación y un sistema de control para mantener un entorno controlado (p. ej., termostasis y atmósfera definida) en la cámara de cultivo. El entorno controlado puede p. ej., controlarse para mantener una temperatura predeterminada y una concentración predeterminada de uno o más gases específicos, tales como oxígeno y dióxido de carbono en la cámara de cultivo. Además, el sistema puede disponerse para preservar la cámara de cultivo en la oscuridad, es decir, para evitar esencialmente la luz ambiental que entre en la cámara de cultivo. Una fuente luminosa controlada por el sistema de control puede proporcionarse para iluminar la cámara de cultivo o al menos la zona de recepción en momentos determinados, en los que es deseable para adquirir una imagen del cultivo celular, y sólo durante la duración con respecto al tiempo que se tarda para adquirir dicha imagen.

La unidad de inspección óptica puede comprender ventajosamente un sistema óptico fijo que utiliza componentes del microscopio (por ejemplo, objetivos, lentes auxiliares y unidad de cámara) u otro dispositivo adecuado para ampliar además una imagen del cultivo celular visible a través de la lente focal de la bandeja. Una cámara puede además incluirse en la unidad de inspección óptica para la captura de imágenes en distintos momentos determinados para supervisar los cambios del cultivo celular que se producen con el tiempo. El sistema puede comprender además un ordenador programado apropiadamente para la realización del análisis de la imagen y/o para la visualización de las imágenes capturadas por un operador.

El sistema de acuerdo con la invención puede comprender más de una unidad de inspección, incluyendo más de una cámara para la inspección de respectivas zonas de recepción de la bandeja. Alternativamente, sólo puede proporcionarse una unidad de inspección. En una realización, las unidades de Inspección diferentes pueden posicionarse para supervisar diferentes zonas de recepción individualmente. En otra realización, las unidades de inspección diferentes pueden posicionarse para supervisar la misma zona de recepción desde diferentes ángulos, proporcionando así una base adicional para una interpretación tridimensional del cultivo celular contenido. Una representación multidimensional puede así derivarse siguiendo los cambios en la estructura 3D del cultivo celular con el tiempo. La unidad de inspección puede ser estacionaria, es decir, inmovilizada, o elementos de movimiento pueden proporcionarse para desplazar la unidad de inspección y/o la bandeja (y por tanto los cultivos celulares en al menos una zona de recepción) uno respecto al otro. La unidad de inspección óptica puede disponerse para proporcionar imágenes del cultivo celular en la zona de recepción en una pluralidad de planos focales a varias distancias desde una superficie inferior de la zona de recepción, representando así otra manera de obtener una interpretación tridimensional de la estructura del cultivo celular. Una representación multidimensional puede derivarse así siguiendo los cambios en la estructura 3D del cultivo celular con el tiempo.

Una realización preferente abarca además medios motorizados para posicionar intermitentemente/secuencialmente al menos dos, por ejemplo, tal como 3 o más, bandejas de acuerdo con el primer aspecto de la invención como se reivindica y se describe en la presente memoria en la posición óptima para la adquisición de imágenes por una unidad de inspección óptica estacionaria.

En otra realización preferente se abarcan además medios para posicionar intermitentemente/secuencialmente la unidad de inspección óptica en la posición óptima para la adquisición de imágenes de al menos dos, por ejemplo, tal como 3 o más, bandejas estacionarias de acuerdo con el primer aspecto de la invención como se reivindica y se describe en la presente memoria.

En un aspecto independiente adicional, la invención proporciona un método para el cultivo de un cultivo celular y para la supervisión óptica del mismo durante el cultivo del cultivo celular, que comprende:

- proporcionar una bandeja, tal como una bandeja de acuerdo con el primer aspecto de la invención como se reivindica y se describe en la presente memoria, para alojar el cultivo celular, la bandeja comprende una estructura portadora que define al menos la zona de recepción para alojar el cultivo celular, en la que la estructura portadora comprende al menos una lente focal, que es parte integrante de la estructura portadora o se une a la misma, y en la que al menos una lente focal se dispone para recoger los rayos luminosos que emanan de al menos una zona de recepción con el fin de facilitar la supervisión del cultivo celular a través de la lente focal y la estructura portadora;
- proporcionar el cultivo celular en al menos una zona de recepción;
- proporcionar al menos una unidad de inspección óptica dispuesta para permitir o facilitar la supervisión del cultivo celular alojado en al menos una zona de recepción de la estructura portadora.

En caso de que la unidad de inspección óptica comprenda al menos una unidad de cámara, el método de acuerdo con la invención puede comprender además la adquisición, por medio de la unidad de cámara, de una pluralidad de imágenes del cultivo celular alojado en al menos la zona de recepción a través del al menos una lente focal, la pluralidad de imágenes se adquiere en diferentes momentos determinados. Por consiguiente, pueden supervisarse los cambios celulares, tales como el desarrollo de un embrión con el tiempo.

El cultivo celular puede conservarse en un fluido alojado en la zona de recepción al mismo tiempo que el cultivo celular. Una relación de un índice de refracción del fluido y un índice de refracción del material que forma la estructura portadora en la zona de recepción se comprende preferentemente entre 0,5 y 2. Al seleccionar un índice

de refracción del fluido o, alternativamente, el material del portador para minimizar la diferencia en el índice de refracción de los dos componentes, el efecto de perturbaciones ópticas inducidas por la transición cuando la luz pasa desde el portador al medio puede reducirse o incluso eliminarse.

- 5 Otras características y dimensiones de la bandeja (excepto la lente focal) de acuerdo con la presente invención y su uso se describen en la publicación previa de la solicitud n.º WO 2009/003487, que se incorpora por la presente por referencia.

Descripción de las realizaciones de la invención

- 10 La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales

15 La Fig. 1 muestra una vista superior de una realización de una bandeja de acuerdo con la invención; en esta representación particular 100: las dimensiones totales son 25 x 75 mm, 106 son 12 grandes pocillos con un diámetro de 4 mm, 102 son pequeños micropocillos que son depresiones dentro de los pocillos más grandes. Los micropocillos tienen un diámetro de 0,3 mm y una profundidad de 0,3 mm.

20 La Fig. 2 muestra un corte en perspectiva de la bandeja de la Fig. 1; en esta representación particular 100: 104 superficie superior, 105 área grande para ser llenada con aceite de inmersión para evitar la evaporación. 106 grandes pocillos llenos de medio de crecimiento con un micropocillo de recepción central, 102 y 108 de varias profundidades. 110 lente focal semiesférica unida a la parte inferior del pocillo.

25 La Fig. 3 muestra una sección transversal de una bandeja de acuerdo con la técnica anterior; tenga en cuenta la parte 302, 308 inferior planar de los pocillos de recepción central y la superficie inferior planar, 311, que no constituye una lente focal puesto que no es una lente focal ya que no amplía el cultivo celular y no se mejora la apertura numérica del sistema.

30 La Figs. 4, 5A y 5B muestran secciones transversales de una primera y una segunda realización de una bandeja de acuerdo con la invención; la primera realización en la Fig. 4 incluye una lente 410 focal integral que recoge la luz que emana del cultivo celular en el pocillo 402. La segunda realización en la Fig. 5A es un diseño equivalente con lentes focales adjuntas, 510, situadas bajo los cultivos celulares en los pocillos de recepción 502. La Fig. 5B muestra una configuración alternativa de un micropocillo que se curva de forma cóncava para la recepción de un cultivo celular.

35 La Figs. 6A-6C ilustran otras realizaciones de una bandeja de acuerdo con la invención, que comprenden múltiples zonas de recepción 602, opcionalmente separadas por barreras que sobresalen de la superficie 604. Las múltiples zonas de recepción de cada realización se pueden supervisar a través de una lente 610 focal común.

40 Las Figs. 7, 8A y 8B ilustran realizaciones de una lente focal para una bandeja de acuerdo con la invención. La Fig. 7 ilustra rayos que emanan desde el centro del hemisferio. Las Figs. 8A y 8B ilustran cómo se recogen los rayos que se originan en el punto aplanático que apunta en un amplio arco de direcciones después del paso a través de una lente focal semiesférica de modo que se puede lograr una gran apertura numérica del sistema óptico combinado.

45 Las Figs. 9 y 10 ilustran una comparación entre una realización de una bandeja de acuerdo con la presente invención (Fig. 9) y una bandeja de acuerdo con la técnica anterior (Fig. 10), en particular con respecto a una distancia D transversal entre las zonas de recepción vecinas.

50 La Fig. 11 ilustra una reconstrucción tomográfica de una lente dual en una realización de una bandeja de acuerdo con la presente invención.

La Fig. 12 es una fotografía de una realización de una bandeja de acuerdo con la invención.

55 La Fig. 13 muestra imágenes obtenidas a través de la parte inferior de la bandeja de la Fig. 12.

La Fig. 14 muestra una realización de un sistema de acuerdo con la invención.

60 La Fig. 15 es una foto a modo de ejemplo de un embrión tomada en una etapa temprana de la fertilización *in vitro*. La imagen fue adquirida a través de una bandeja de acuerdo con el primer aspecto de la invención como se reivindica y se describe en la presente memoria con una lente de vidrio semiesférica adjunta al fondo (radio de 1,0 mm) como se muestra en principio en la Figura 5.

65 La bandeja 100 de la Fig. 1 comprende una pluralidad de zonas de recepción 102 para la recepción de los cultivos celulares respectivos, tales como embriones. En la realización mostrada, se proporcionan un total de 12 zonas de recepción en un patrón de matriz bidimensional de 3 x 4. Las zonas de recepción se proporcionan por una estructura

portadora 104 formada, p. ej., a partir de plásticos moldeados por inyección. Como se muestra en la Fig. 2, cada zona de recepción 102 se forma en una depresión 106, que, a su vez, se proporciona en un área rebajada 105 de la estructura portadora 104. Una entalladura 108 (es decir, micropocillos) se forma en cada depresión 106 (es decir, pocillo). La zona de recepción se encuentra en la parte inferior de la entalladura 108. Las depresiones y entalladuras pueden tener una forma y un tamaño como se desvela en el documento WO 2009/003487, que se incorpora por la presente por referencia. Una lente focal 110 que forma parte integrante de la estructura portadora 104 o se unida a la misma se coloca en la superficie inferior bajo cada entalladura 108, la lente focal 110 se proporciona en una superficie exterior de la estructura portadora, es decir, en la superficie exterior orientada de forma descendente a un pocillo formado por cada depresión 106 y entalladura 108. En uso, los cultivos celulares respectivos, tales como embriones para la fertilización *in vitro* se posicionan en las entalladuras 108, y los cultivos celulares se cultivan posteriormente en un entorno apropiado, tal como una incubadora. Un medio de cultivo se proporciona preferentemente en las depresiones 106, y las entalladuras 108, llenando así la zona de recepción al mismo tiempo que el cultivo celular, como se desvela generalmente en el documento WO 2009/003487. El rebaje general 105 se llena con un aceite de inmersión para evitar el estrés osmótico debido a la pérdida por evaporación de los medios. La estructura portadora 104 puede moldearse en una única pieza a partir de un material plástico transparente. Cada lente focal 110 puede moldearse en una única pieza con la estructura portadora, es decir, formada en una única pieza con la estructura portadora, o las lentes focales 110 pueden proporcionarse como elementos separados de, p. ej., vidrio, unidas a una superficie inferior de la estructura portadora 104.

La Fig. 3 ilustra una bandeja 300 de la técnica anterior de acuerdo con los principios del documento WO 2009/003487. La bandeja 300 comprende un número de zonas de recepción 302 de la bandeja formadas en una estructura portadora 304. Cada zona de recepción 302 se forma por una entalladura 308 en la parte inferior de una depresión 306 en la estructura portadora 304. La bandeja 300 está configurada para que sea aceptada por una incubadora, en la que se cultivan los cultivos celulares alojados en las entalladuras 308. La supervisión de los cultivos celulares se realiza por medio de un microscopio dispuesto por debajo de la estructura portadora 304 y la recepción de los rayos luminosos a través de la estructura portadora 304 y su superficie 311 inferior esencialmente planar en la parte inferior de cada entalladura 308.

Una primera realización de una bandeja 400 de acuerdo la invención mostrada en la Fig. 4 comprende una estructura portadora 404 y una pluralidad de depresiones 406 en la estructura portadora. En cada depresión, se proporciona una entalladura 408, la entalladura forma por tanto una zona de recepción 402 para la recepción de un cultivo celular durante el cultivo del mismo, p. ej., una incubadora. Frente a cada zona de recepción 402 en una superficie externa (inferior) de la estructura portadora 404, una lente focal 410 se proporciona en la estructura portadora 404. Una pared 412 circunferencial opcional puede proporcionarse en torno a cada lente 410 para proteger esta última contra los arañazos y la abrasión durante la manipulación en superficies sólidas. Alternativamente, una pared común puede proteger una serie de lentes o constituir un borde externo para que se apoye la estructura portadora. La lente focal 410 proporciona una recogida de rayos luminosos de la zona de recepción 402, potenciando así la ampliación visible a través de un microscopio (no mostrado) y la resolución óptica cuando se examina el cultivo celular en la zona de recepción desde la parte inferior a través de la lente 410. Un cultivo celular 101, tal como un embrión, se aloja en la zona de recepción 402. La lente 410 está configurada de tal manera que un plano focal 411 de la lente se extiende a través del cultivo celular, es decir, a través de la entalladura 408 que forma la zona de recepción 402, ya sea a lo largo de una superficie inferior de la misma o como se muestra en la Fig. 4, a una altura predeterminada por encima de la superficie inferior de la entalladura 408 (es decir, micropocillo).

Una realización adicional de una bandeja 500 de acuerdo con la invención mostrada en la Fig. 5A comprende una estructura portadora 504 y una pluralidad de depresiones 506 en la estructura portadora. Al igual que en la realización de la Fig. 4, una entalladura 508 se forma en cada depresión 506, la entalladura, por tanto, constituye una zona de recepción 502 para alojar un cultivo celular. En una superficie externa de la estructura portadora 504 y frente a cada zona de recepción 502, es decir, en una superficie inferior de la estructura portadora 504, una lente focal 510 se une a la estructura portadora 504. La lente focal 510 constituye un elemento separado de la estructura portadora 504, la lente 510 se une a la estructura portadora 504 mediante cualquier medio adecuado, tal como empalme, aguafuerte, encaje a presión o por una combinación de las técnicas antes mencionadas. La lente focal 510 puede fabricarse del mismo material que la estructura portadora 504 o de un material diferente. En una realización, la estructura portadora 504 se moldea a partir de un material plástico, y la lente 510 se forma a partir del mismo material plástico. Alternativamente, la lente focal 510 puede conformarse a partir de vidrio o de otro material transparente con propiedades ópticas deseables. Una pared circunferencial 512 se proporciona en torno a la lente 510 para proteger a esta última contra los arañazos y la abrasión durante la manipulación de las superficies sólidas.

Alternativamente, una pared común puede proteger una serie de lentes o constituir un borde externo para que se apoye la estructura portadora. La lente focal 510 proporciona una recogida de los rayos luminosos de la zona de recepción 502, potenciando así la ampliación visible a través de un microscopio (no mostrado) y la resolución óptica cuando se examina en el cultivo celular en la zona de recepción desde la parte inferior a través de la lente 510. La lente 510 está configurada de tal manera que un plano focal 511 o 513 de la lente se extiende a través del cultivo celular, es decir, a través de la entalladura 508 que forma la zona de recepción 502, ya sea a lo largo de una



superficie inferior de la misma o a una altura predeterminada por encima de la superficie inferior de la entalladura 508 (es decir, micropocillo).

En las realizaciones de las Figs. 4 y 5A parecidas, cada una de las lentes 410 y 510 tiene un primer diámetro  $D_L$  en su interfaz con una superficie 414 y 514 definida por una parte de la estructura portadora 404 y 504 que rodea la lente 410 y 510. La zona de recepción 402 y 502 formada por entalladuras 408 y 508 tiene un segundo diámetro  $D_z$ . En realizaciones preferentes de la invención, el diámetro  $D_z$  de la zona de recepción es inferior al diámetro  $D_L$  de la lente con el fin de asegurar que la lente proporcione una ampliación suficiente y la visibilidad de toda el área superficial de la zona de recepción 402 y 502, es decir, de la superficie inferior de la entalladura 408 y 508. La posición y la curvatura óptimas de la superficie de la lente focal respecto a la zona de recepción dependen de las propiedades ópticas de los materiales y medios involucrados. En una realización, la posición óptima de la zona de recepción está cerca del centro del hemisferio (véase la fig. 7). En otra realización preferente, la posición óptima de la zona de recepción está cerca del punto aplanático del hemisferio.

La Fig. 5B muestra una configuración alternativa de un micropocillo que se curva de forma cóncava para la recepción de un cultivo celular. La bandeja 540 de la Fig. 5B comprende una estructura portadora 544, depresión 546, entalladura 548 que forma la zona de recepción (es decir, micropocillos 542) que forma una superficie 543 inferior curvada. La superficie 543 inferior curvada puede facilitar el posicionamiento correcto del cultivo celular (no mostrado en la Fig. 5B) con respecto a la lente focal 550. La lente focal 550 está protegida por la pared o paredes 552.

Las estructuras respectivas mostradas en las Figs. 4, 5A y 5B pueden incorporarse o forman parte de la realización de una bandeja 100 como se muestra en las Figs. 1 y 2. Por tanto, cada una de las estructuras portadoras 404, 504 y 544 puede ser idéntica a la estructura portadora 104. Las depresiones 406, 506 y 504, las entalladuras 408, 508 y 548, las zonas de recepción 402, 502 y 542, y las lentes focales 410, 510 y 550 pueden estar formadas de manera idéntica como los elementos similares representados en las Fig. 1 y 2, es decir, similares a las depresiones 106, entalladuras 108, zonas de recepción 102 y lentes focales 110.

Las Figs. 6A-6C ilustran realizaciones adicionales de una bandeja 600 de acuerdo con la invención. La bandeja comprende una pluralidad de zonas de recepción 602 formadas en una estructura portadora 604, se ajusta el tamaño de cada una de las zonas de recepción 602 para alojar un cultivo celular durante el cultivo, tal como la incubación del mismo. Las zonas de recepción 602 pueden formarse adecuadamente por depresiones en la estructura portadora, y opcionalmente se separan por paredes o salientes de la superficie portadora como se indica en la figura. Una lente 610 focal común se dispone en una superficie inferior de la estructura portadora 604. La lente focal 610 tiene un tamaño para cubrir una pluralidad de zonas de recepción 602 con el fin de permitir que los cultivos celulares en la pluralidad de zonas de recepción 602 se vean a través de una única lente 610. En una realización, la bandeja 600 comprende solamente una lente focal 610, mientras que en otras realizaciones, la bandeja 600 comprende una pluralidad de lentes focales 610, cada una de las cuales tiene un tamaño para cubrir una pluralidad de zonas de recepción 602.

La lente o lentes focales 610 pueden ser parte integrante con el resto de la estructura portadora 604, tal como mediante moldeado por inyección de la estructura portadora 604 y la lente o lentes focales 610 entre sí a partir de una única pieza de material. Alternativamente, la lente o lentes focales 610 pueden proporcionarse como uno o más elementos separados fijados a una superficie de la estructura portadora, la lente o lentes focales 610 se fabrican a partir del material de la estructura portadora 604 o de otro material transparente.

Como se muestra en las Figs. 6A-6C, en particular, en la Fig. 6B, la estructura portadora puede formar una pared de barrera entre las zonas de recepción 602 vecinas para prevenir la transferencia accidental de un cultivo celular de una zona de recepción a una zona de recepción vecina o el intercambio involuntario de los cultivos celulares entre las zonas de recepción.

Las Figs. 7, 8A y 8B muestran realizaciones alternativas de una lente focal para su uso en realizaciones de la presente invención. La lente 710 de la Fig. 7 muestra el trazado de rayos que emanan desde el punto central dentro del hemisferio (ilustrado por las flechas en la Fig. 7). Los rayos emergen desde un punto central 720 de la lente 710 a un plano característico 722, que coincide con la superficie planar 724 de la lente. Las respectivas lentes focales 810 de las Figs. 8A y 8B recogen rayos ópticos emergentes desde el punto aplanático 820 en un plano característico 822, que se contrarresta desde la superficie planar 824 de la lente 810.

Cualquiera de las lentes 710 y 810 de las Figs. 7, 8A y 8B puede constituir una lente focal en las realizaciones mencionadas anteriormente de las Figs. 1, 2, y 4, 5A, 5B, y 6A-6C, es decir, cualquiera de las lentes 110, 410, 510, 550 y 610.

En una realización preferente de la invención, la posición óptima de la zona de recepción está cerca del punto aplanático del hemisferio como se ilustra en las Figs. 8A y 8B.

Las Figs. 9 y 10 ilustran una comparación entre una realización de una bandeja de acuerdo con la presente invención (Fig. 9) y una bandeja de acuerdo con la técnica anterior (Fig. 10). La bandeja de acuerdo con la invención de la Fig. 9 incluye una lente focal asociada a cada zona de recepción. La distancia entre las zonas de recepción vecinas, en el plano de la sección transversal, se indica por la dimensión D en la Fig. 9. La bandeja de la técnica anterior de la Fig. 10 tiene una superficie inferior plana. Al igual que en la Fig. 9, la distancia entre zonas de recepción vecinas se indica por la dimensión D en la Fig. 10. Se observará que la distancia D es menor en la Fig. 10 que en la Fig. 9. Esto se debe al hecho de que, en la técnica anterior, para la adquisición de una imagen satisfactoria por medio de un sistema óptico (no mostrado), incluyendo p. ej., un microscopio y una cámara, los cultivos celulares han de proporcionarse a distancias mutuas relativamente pequeñas a fin de permitir que una cámara adquiera imágenes de múltiples zonas de recepción a la vez. Esto, a su vez, tiene la desventaja de que el posicionamiento y/o recolección de los cultivos celulares de las zonas de recepción, p. ej., tras la selección de un embrión para la transferencia, se ve dificultado, en particular, en sistemas en los que tal posicionamiento y/o recolección se lleva a cabo a mano. La bandeja de acuerdo con la invención, cuya realización se representa en la Fig. 9, supera esa desventaja gracias a la lente focal que proporciona ampliación del cultivo celular en la zona de recepción, ya que una sola imagen puede adquirirse de una pluralidad de zonas de recepción a la vez sin comprometer la calidad de imagen. Generalmente, la ampliación proporcionada por la lente focal reduce la necesidad de precisión durante la manipulación de la bandeja y/o de los cultivos celulares.

La Fig. 11 ilustra una reconstrucción tomográfica de una lente dual en una realización de una bandeja de acuerdo con la invención.

La Fig. 12 es una foto de una bandeja de acuerdo con una realización de la invención. En el lado izquierdo, la bandeja de la Fig. 12 comprende un pocillo convencional con una parte inferior plana/planar. A la derecha, se proporciona un pocillo con una lente de cristal semiesférica adjunta con un radio de 1,0 mm. El diseño general es similar al concepto de la Fig. 5A.

La foto de la Fig. 13 muestra una vista desde abajo que muestra una ampliación de aproximadamente 3 veces de la parte inferior del micropocillo central (izquierda sin lente focal; derecha con lente focal). El pocillo derecho con lente focal adjunta se utilizó para adquirir la imagen en la figura 15.

La Fig. 14 muestra una realización de un sistema 900 de acuerdo con la invención. El sistema puede p. ej., constituir o formar parte de un aparato de fertilización *in vitro* para el cultivo de embriones. El sistema 900 comprende una cámara de cultivo 902, tal como una cámara de incubación, y un sistema de control 914 para mantener un entorno de incubación controlado en la cámara de cultivo 902. El entorno controlado puede p. ej. controlarse para mantener una temperatura predeterminada y una concentración predeterminada de uno o más gases específicos, tales como oxígeno y dióxido de carbono en la cámara de cultivo. Una bandeja 100, 400, 500, 600 de acuerdo con la invención se proporciona dentro de la carcasa, con un cultivo celular 101, tal como un embrión, alojado en una zona de recepción 102, 402, 502, 602 de la bandeja 100, 400, 500, 600. La cámara de cultivo 902 está encapsulada por las paredes 904 y una pared 908 inferior transparente fabricada de, p. ej., vidrio o plásticos. Dentro de la cámara de cultivo 902, la bandeja 100, 400, 500, 600 se apoya en un elemento 906 estabilizante de la temperatura, tal como una placa de aluminio calentada para proporcionar termostasis, con la lente óptica 110, 410, 510, 610 que es parte integrante de la bandeja 100, 400, 500, 600 expuesta en un paso 907 a través del elemento 906 estabilizante de la temperatura. Un espacio de aire 909 se proporciona entre el elemento 906 estabilizante de la temperatura y la pared transparente 908 para permitir opcionalmente el movimiento de la bandeja o el microscopio. Varios sensores 916, tales como los sensores de temperatura y de concentración de gas, se proporcionan dentro de la cámara de cultivo 902 y se conectan operativamente al sistema de control 914. Los dispositivos de control 918 se proporcionan para el ajuste de diversos parámetros del entorno controlado en la cámara de cultivo 902. Los dispositivos de control 918 pueden, p. ej., incluir elementos de calentamiento y/o de refrigeración controlados, o unidades de suministro de oxígeno, nitrógeno o dióxido de carbono. Los sensores de temperatura 916 y dispositivos 918 de control de temperatura también se pueden incorporar en el elemento 916 estabilizante de la temperatura (esta configuración constituye una realización alternativa que no se muestra). Una fuente luminosa 920 se conecta al sistema de control para iluminar la cámara de cultivo 902 siempre que se desee adquirir una imagen del cultivo celular 101 por medio de una unidad de inspección óptica, incluyendo la unidad de cámara 912 y un objetivo opcional y/o un microscopio 910. Cuando no se captura ninguna imagen, la fuente luminosa no se activa para preservar la cámara de cultivo en la oscuridad. El funcionamiento de la unidad de inspección se controla preferentemente por el sistema de control 914.

La Fig. 15 es una foto a modo de ejemplo de un embrión en una etapa temprana de fertilización *in vitro*. La imagen fue adquirida a través de una bandeja de acuerdo con el primer aspecto de la invención como se reivindica y se describe en la presente memoria con una lente de cristal semiesférica adjunta a la parte inferior (radio de 1,0 mm) como se muestra en principio en la Figura 5A.

## Ejemplo 1

## Materiales

5 Un portaobjetos de cultivo para embriones de poliestireno moldeado por inyección convencional (EmbryoSlide™, Unisense FertiliTech A/S, Aarhus, Dinamarca) se asemeja al diseño mostrado en la Fig. 1 y en la Fig. 2. Excepto la escotadura 102, el micropocillo, era más pequeño que el mostrado en la figura, es decir, una profundidad de 0,3 mm y un diámetro de 0,3 mm. Las lentes de vidrio semiesféricas con un radio de 1,0 mm (Edmond optics, R.U.) se pegan sobre la superficie inferior de algunos de los pocillos en el portaobjetos de cultivo con pegamento de cianoacrilato como se indica en el objeto 110 en la Fig. 2. Algunos de los pocillos se quedaron sin lentes adjuntas para la comparación. El rendimiento óptico de la construcción se investigó y documentó utilizando un microscopio invertido y un alcance de disección (Leica, Wetzlar, Alemania).

15 La resolución óptica se investigó utilizando embriones de 1 célula murinos congelados adquiridos en (EmbryoTech, California, EE. UU.). Los embriones se descongelaron y manipularon de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Los embriones se cultivaron a 37 °C en medios de Global (LifeGlobal, EE. UU.) a CO<sub>2</sub> al 5 % hasta que se alcanzó la etapa de dos células. Los embriones se colocaron en los medios llenados en micropocillos vecinos en EmbryoSlide pre-equilibrado durante la noche a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 % y superpuesto con aceite mineral aprobado para FIV (LifeGlobal, EE. UU.).

20 Algunos de los embriones se colocaron en pocillos con microlentes adjuntas y otros se colocaron en los pocillos vecinos sin lentes.

## Resultados

25 La Figura 12 muestra una vista lateral del EmbryoSlide™ modificado con microlentes adjuntas. Los pocillos de la izquierda son pocillos no modificados convencionales con una parte inferior plana/planar. Los pocillos de la derecha incluyen una lente de cristal semiesférica adjunta con un radio de 1,0 mm (pocillo más distante a la derecha en la Fig. 12). Las lentes adjuntas sobresalen por debajo del recipiente de cultivo. De este modo, se exponen a los arañazos y a la abrasión y pueden protegerse para ello por una pared, tal como un elemento 412 representado en la Fig. 4.

35 La Figura 13 muestra imágenes obtenidas a través de la parte inferior de EmbryoSlide™. El pocillo de la izquierda no contiene ninguna modificación, es decir, presenta un pocillo de la técnica anterior, mientras que el pocillo de la derecha se aprecia a través de la lente semiesférica adjunta, es decir presenta una bandeja de acuerdo con la presente invención. La zona de recepción, es decir, la parte inferior de los micropocillos es fácilmente visible y está ampliada aproximadamente 3,2 veces.

40 La ampliación puede utilizarse de diferentes maneras: A) para obtener un sistema óptico con una resolución óptica más alta debido a un aumento de la apertura numérica como se describe en la presente invención. B) Una necesidad reducida de elevada ampliación por el resto del sistema óptico. Así, es posible utilizar un objetivo de microscopio con una ampliación inferior para examinar la bandeja (p. ej., 10x en lugar de un objetivo 20x) y tales objetivos de ampliación más bajos suelen tener una distancia de trabajo más larga y de este modo son más fáciles de alojar en una construcción de instrumento. C) El posicionamiento de la bandeja con la imagen del embrión ampliada es menos crítica ya que un pequeño desplazamiento de, p. ej., 3 μm sólo resultará en un desplazamiento de  $3 \mu\text{m}/3,2 \approx 1 \mu\text{m}$  de desplazamiento en las estructuras de la imagen del embrión.

50 Un ejemplo de una imagen de un embrión murino vivo de 2 células adquirido a través del sistema resultante se muestra en la Figura 15. Tras la comparación con imágenes similares de los pocillos vecinos resulta evidente que son visibles más detalles en la imagen con la lente focal adjunta.

55 Se debe mencionar que la construcción física no es ideal para la formación de imágenes ya que los embriones no se posicionan en el punto aplanático para las lentes de vidrio, sino un poco por encima de este punto debido al grosor inferior del EmbryoSlide™.

## Conclusión

60 La investigación empírica del sistema con la lente focal adjunta apoyó los principios y las expectativas indicadas en la presente solicitud. La incorporación de una lente focal en el recipiente de cultivo puede proporcionar imágenes con una resolución mejorada, permitir diseños más flexibles utilizando lentes menos costosas, proporcionando más distancia de trabajo, y siendo más resistente a las desviaciones de posición inevitables. La ampliación también se puede utilizar para obtener imágenes de alta resolución de embriones colocados en diferentes zonas de recepción con un sistema de cámara única al tiempo que permite un desplazamiento suficiente y barreras físicas entre los embriones para evitar cualquier mezcla accidental.

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una bandeja (400) para alojar un cultivo celular (101) para su uso durante el cultivo del mismo y/o para la supervisión óptica del cultivo celular, la bandeja comprende una estructura portadora que define al menos una zona de recepción (402) para alojar el cultivo celular;
- 10 caracterizada por que la estructura portadora comprende al menos una lente focal (410), que es parte integrante de la estructura portadora o se une a la misma, al menos una lente focal se dispone para recoger los rayos luminosos que emanan de al menos una zona de recepción con el fin de facilitar la supervisión del cultivo celular a través de la lente focal y la estructura portadora, en la que un diámetro de la lente focal supera un diámetro de al menos una zona de recepción.
- 15 2. Una bandeja según la reivindicación 1, en la que al menos una lente focal comprende una estructura transparente con al menos una superficie curvada o con una estructura simétrica.
- 20 3. Una bandeja según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos una lente focal aumenta la apertura numérica de un sistema óptico que inspecciona al menos una zona de recepción a través de la estructura portadora.
- 25 4. Una bandeja según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos una lente focal se forma a partir del material que forma la estructura portadora en al menos una zona de recepción y se moldea en una única pieza con dicho material.
- 30 5. Una bandeja según la reivindicación 5, en la que al menos una lente focal y la estructura portadora se fabrican a partir de un material termoplástico.
- 35 6. Una bandeja según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que al menos una lente focal se proporciona como un elemento separado fabricado a partir de un material distinto del material que forma la estructura portadora en al menos una zona de recepción, y en la que al menos una lente focal se incorpora a la estructura portadora o se une a la misma.
- 40 7. Una bandeja según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que al menos una zona de recepción comprende una pluralidad de zonas de recepción, y en la que cada una de al menos una lente focal tiene un tamaño para cubrir solamente una única zona de recepción.
- 45 8. Una bandeja según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que al menos una zona de recepción comprende una pluralidad de zonas de recepción, y en la que una sola de al menos una lente focal tiene un tamaño para cubrir al menos dos de dichas zonas de recepción.
- 50 9. Una bandeja según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada una de al menos una zona de recepción se forma por una entalladura (408) en una depresión (406) en la estructura portadora, la entalladura tiene un diámetro inferior al de la depresión, y en la que al menos una lente focal es parte integrante de la estructura portadora por una curvatura de la misma por debajo de la entalladura.
- 55 10. Una bandeja según la reivindicación 9, en la que un diámetro de la lente focal supera un diámetro de dicha entalladura.
- 60 11. Una bandeja según la reivindicación 10, en la que el diámetro de la entalladura se comprende entre 0,1 y 0,5 mm, y en la que un diámetro de la lente focal es superior a 0,8 mm.
- 65 12. Un sistema (900) de cultivo de un cultivo celular y para la supervisión óptica del mismo durante el cultivo del cultivo celular, que comprende:
- una bandeja (400) para alojar el cultivo celular (101), la bandeja comprende una estructura portadora que define al menos una zona de recepción (402) para alojar el cultivo celular;
  - una unidad (910, 912) de inspección óptica dispuesta para permitir o facilitar la supervisión óptica del cultivo celular alojado en al menos una zona de recepción de la estructura portadora;
- caracterizado por que la estructura portadora comprende una lente focal (410), que es parte integrante de la estructura portadora o se une a la misma, al menos una lente focal se dispone para proporcionar una recogida de rayos luminosos que emanan de la zona de recepción con el fin de facilitar la supervisión del cultivo celular a través de la lente focal y la estructura portadora, en la que un diámetro de la lente focal supera un diámetro de al menos una zona de recepción.
13. Un sistema según la reivindicación 12, en el que la unidad de inspección óptica comprende al menos una unidad de cámara (912) dispuesta para capturar imágenes del cultivo celular alojado en al menos una zona de recepción.

14. Un método para el cultivo de un cultivo celular (101) y para la supervisión óptica del mismo durante el cultivo del cultivo celular, que comprende:

- 5 - proporcionar una bandeja (400) para alojar el cultivo celular, la bandeja comprende una estructura portadora que define al menos la zona de recepción (402) para alojar el cultivo celular, en la que la estructura portadora comprende al menos una lente focal, que es parte integrante de la estructura portadora o se une a la misma, y en la que al menos una lente focal (410) se dispone para recoger los rayos luminosos que emanan de al menos una zona de recepción con el fin de facilitar la supervisión del cultivo celular a través de la lente focal y la estructura portadora; en la que un diámetro de la lente focal supera un diámetro de al menos una zona de recepción;
- 10 - proporcionar el cultivo celular en al menos una zona de recepción;
- proporcionar al menos una unidad (910, 912) de inspección óptica dispuesta para permitir o facilitar la supervisión del cultivo celular alojado en al menos una zona de recepción de la estructura portadora.

15. Un método según la reivindicación 14, en el que la unidad de inspección óptica comprende al menos una unidad de cámara (912), y en el que el método comprende además la captura, por medio de dicha unidad de cámara, de una pluralidad de imágenes de dicho cultivo celular alojado en al menos una zona de recepción a través de al menos dicha lente focal, la pluralidad de imágenes se captura en diferentes momentos determinados.

20 16. Un método según la reivindicación 14 o 15, que comprende además la etapa que consiste en proporcionar un medio fluido en al menos una zona de recepción al mismo tiempo que el cultivo celular, en el que el medio fluido tiene un primer índice de refracción, y en el que el material que forma la estructura portadora en la zona de recepción tiene un segundo índice de refracción, y en el que la relación entre el primer y el segundo índice de refracción se comprende entre 0,5 y 2.

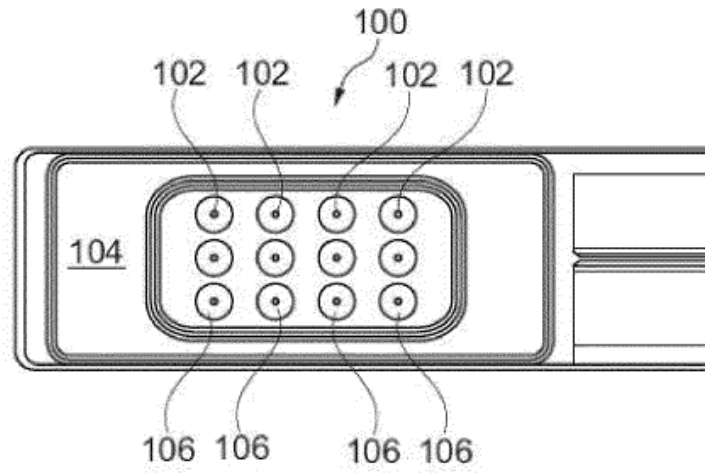


Fig. 1

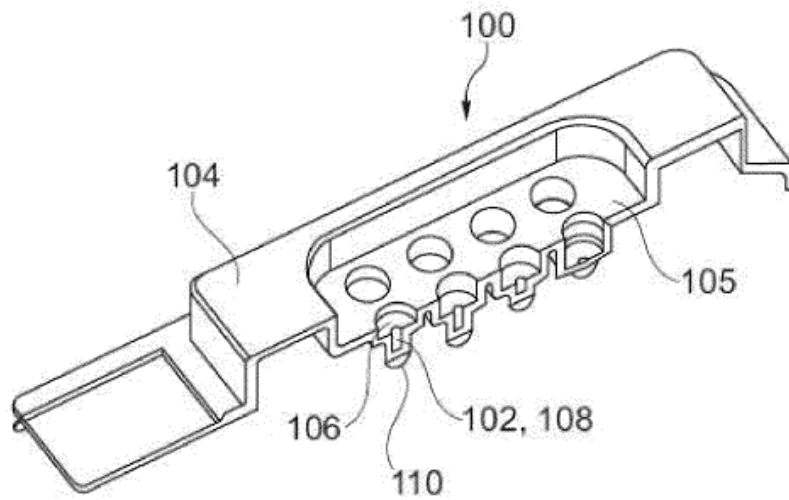


Fig. 2

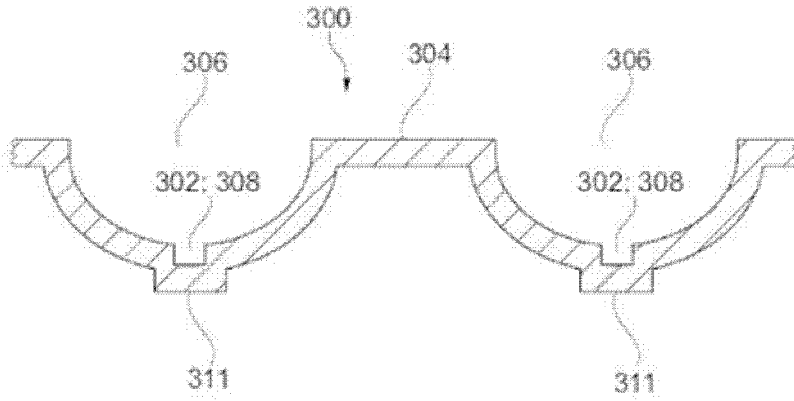


Fig. 3  
Técnica anterior

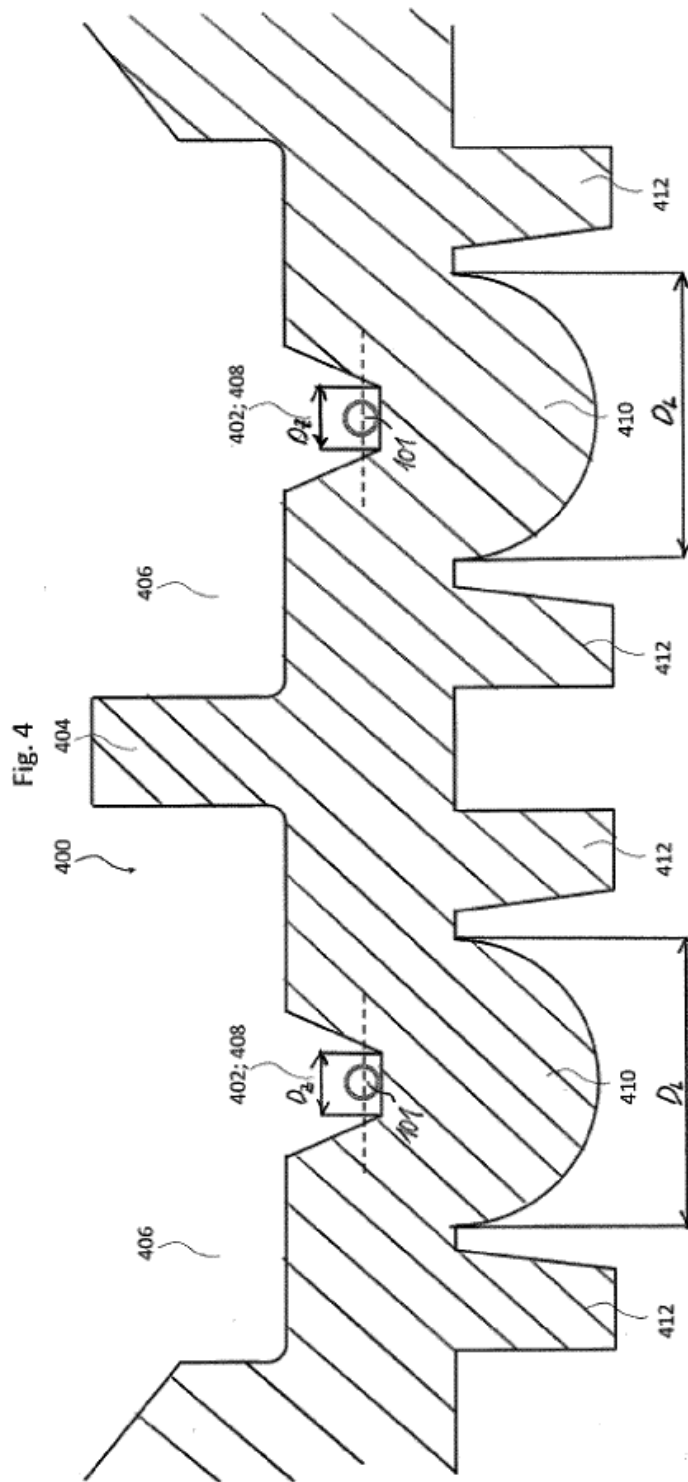




Fig. 5A

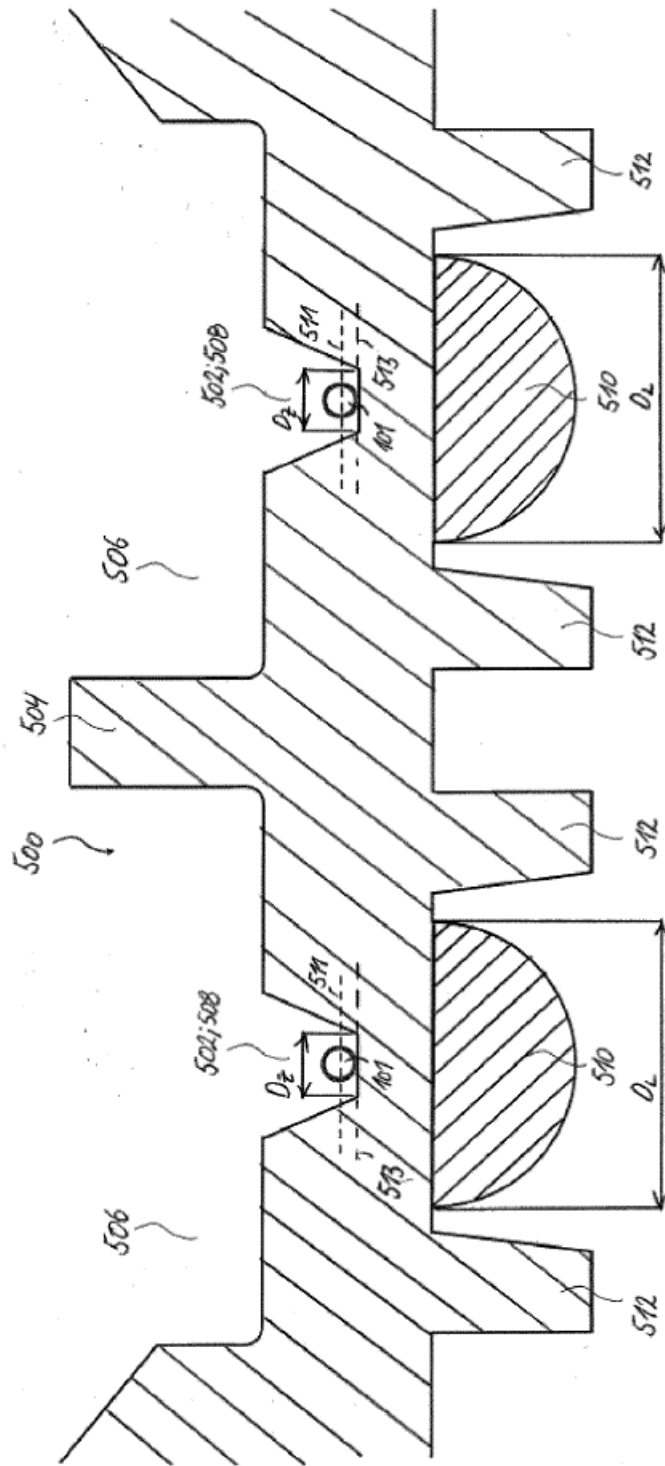
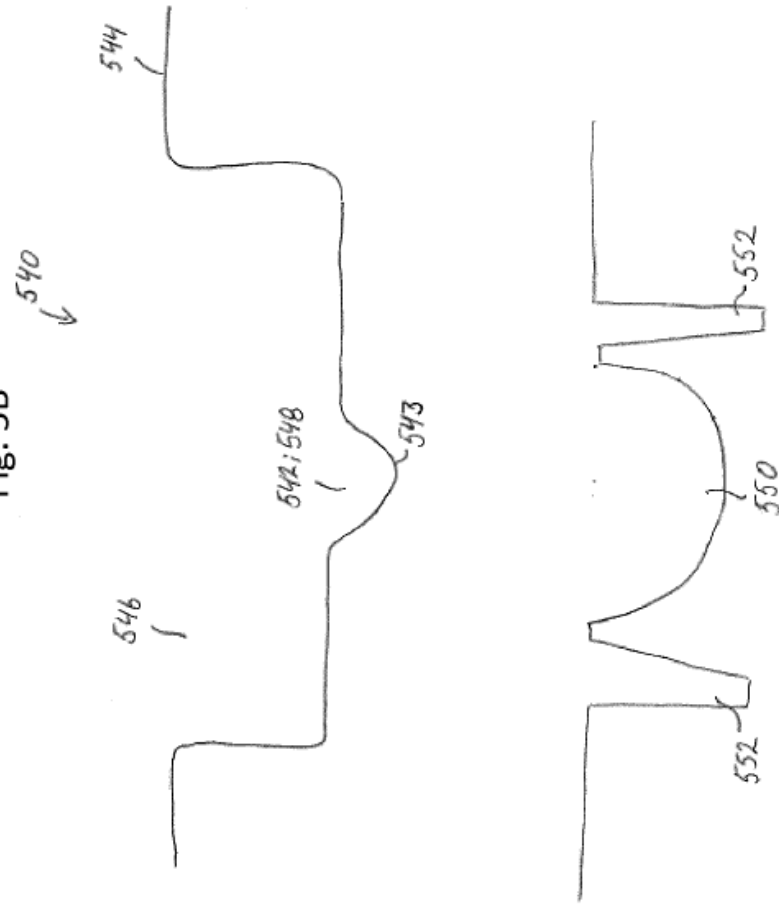
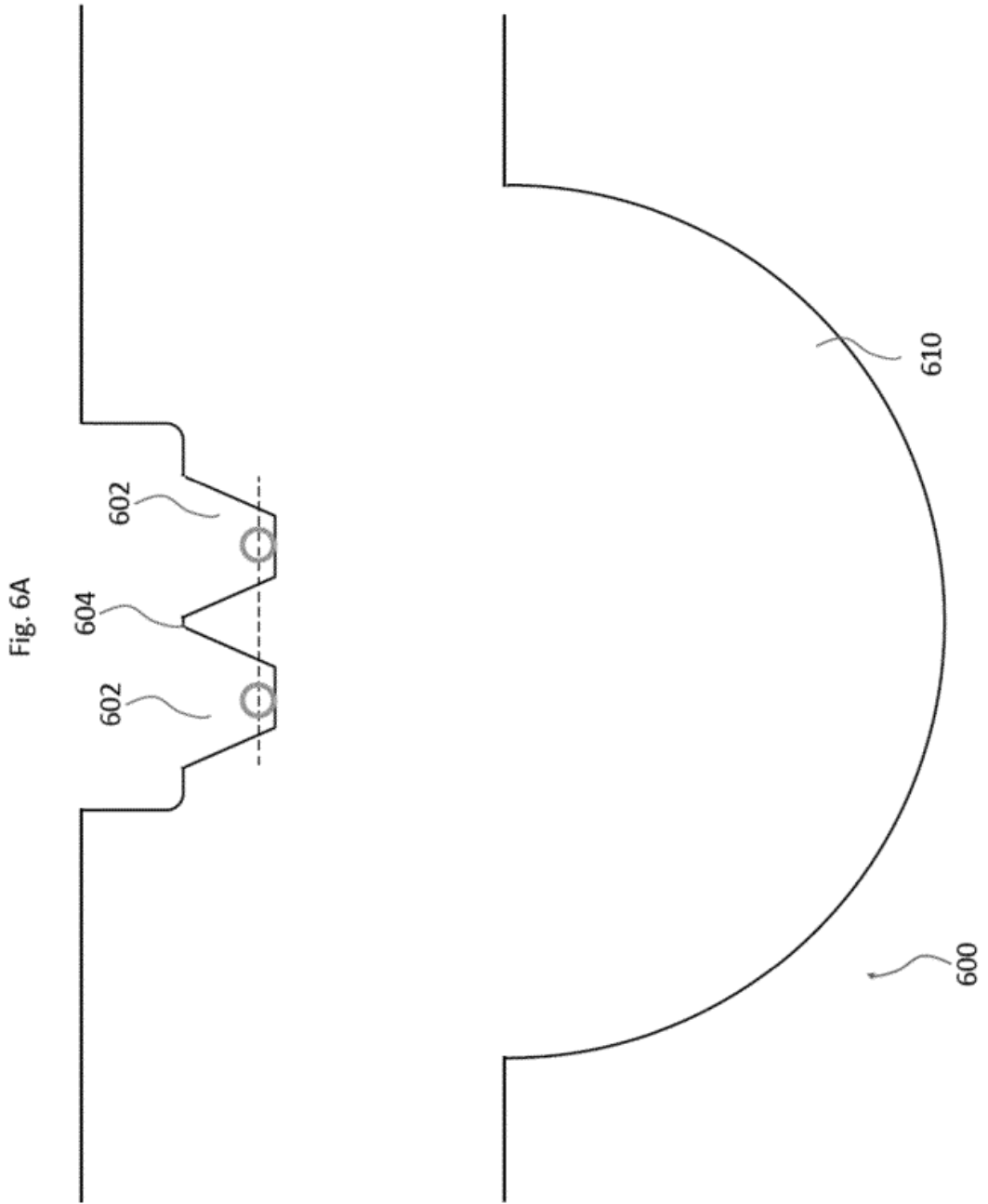


Fig. 5B





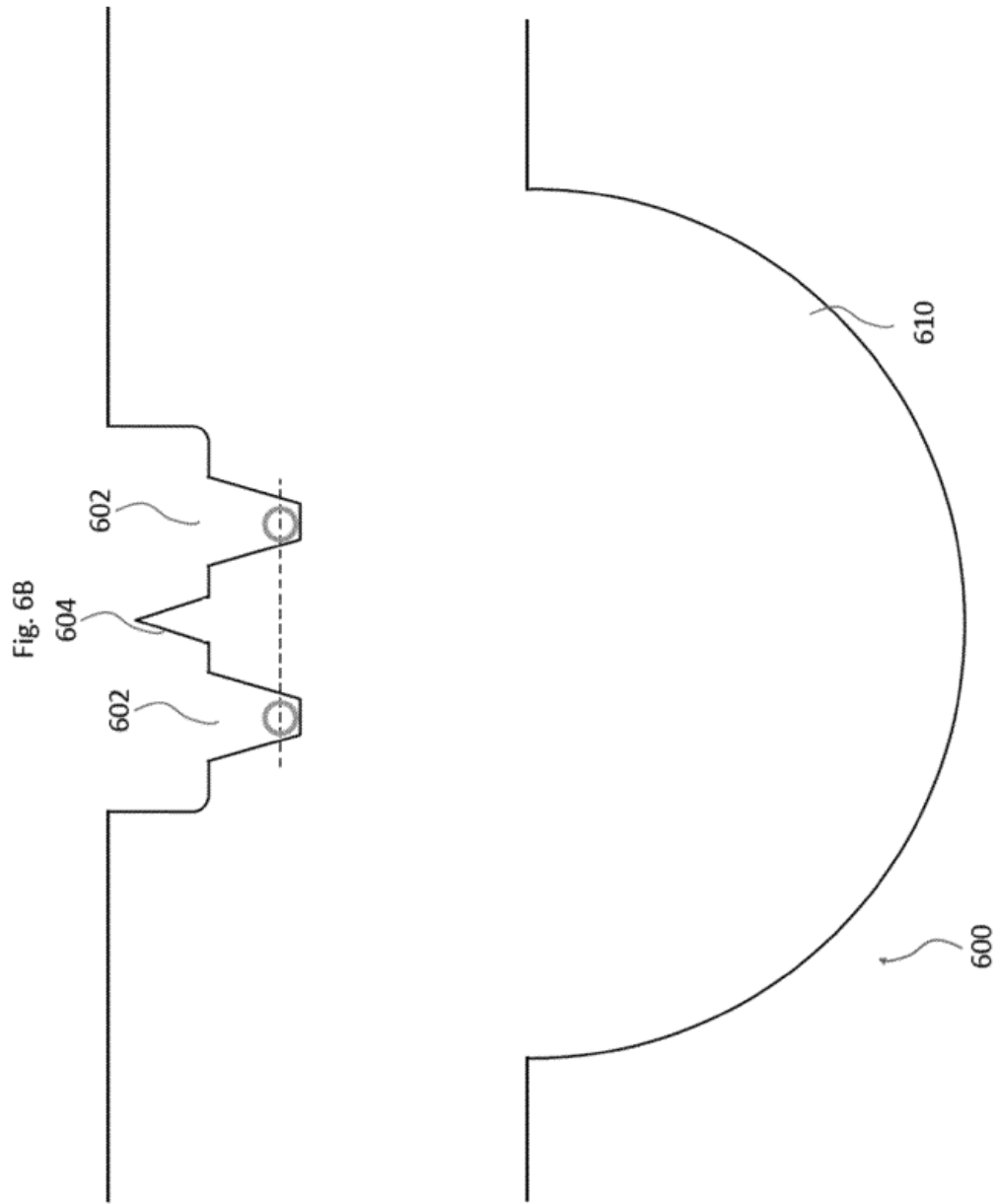


Fig. 6C

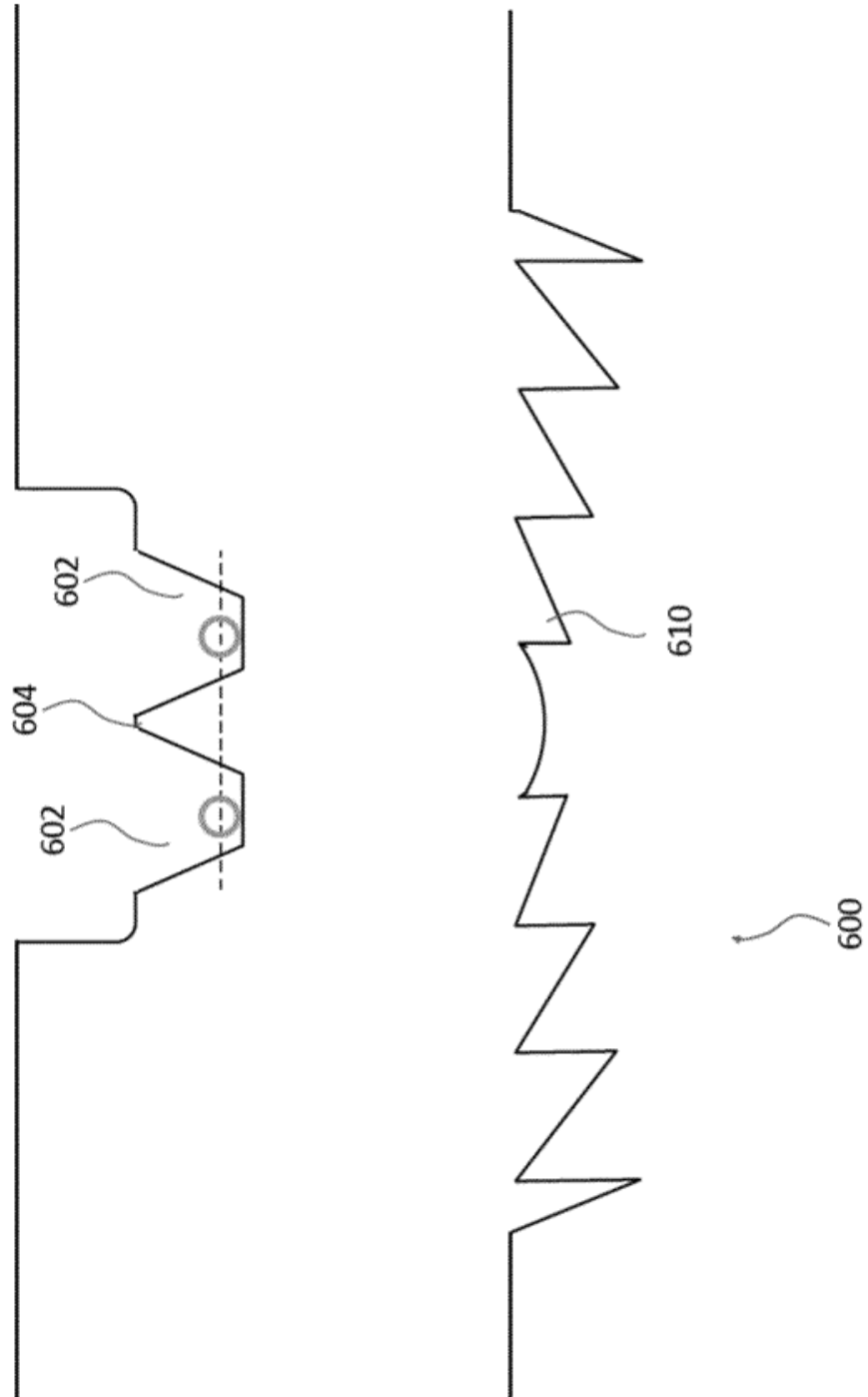


Fig. 7

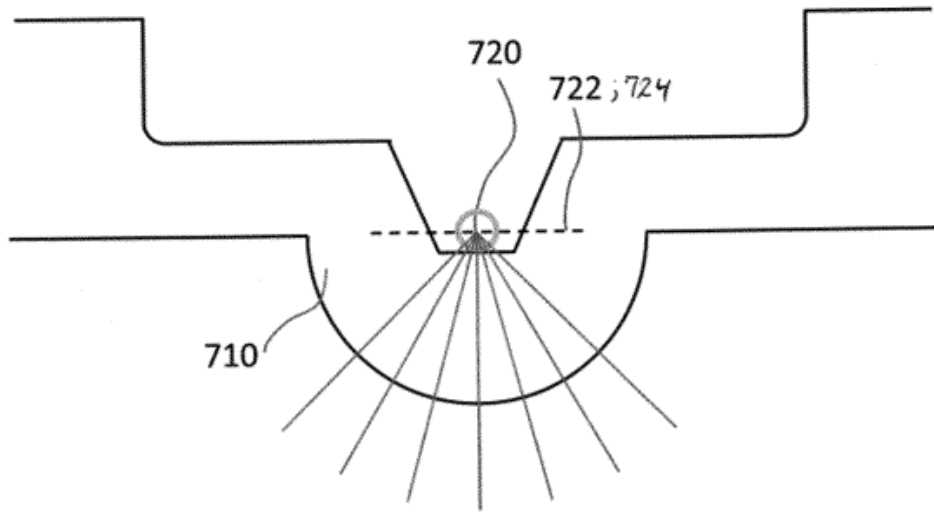


Fig. 8A

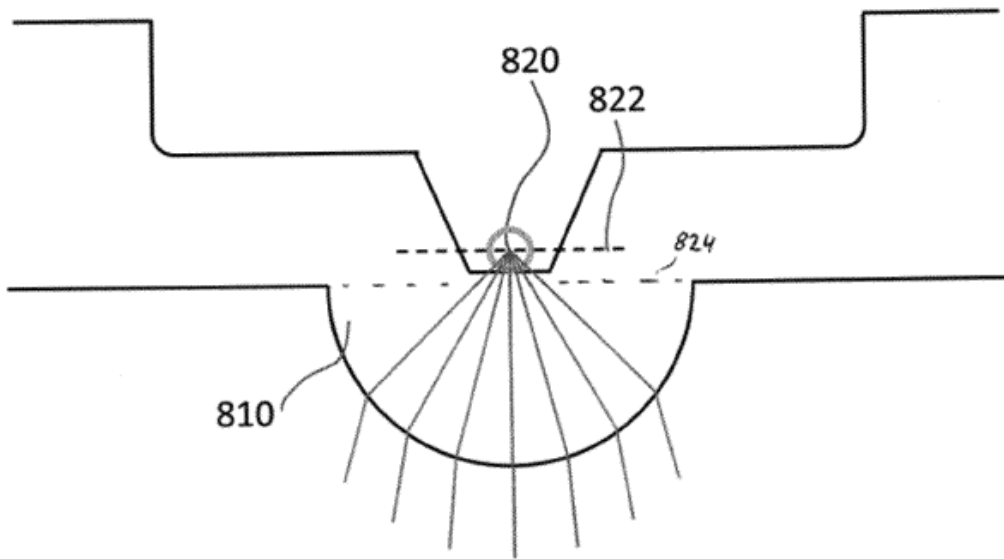


Fig. 8B

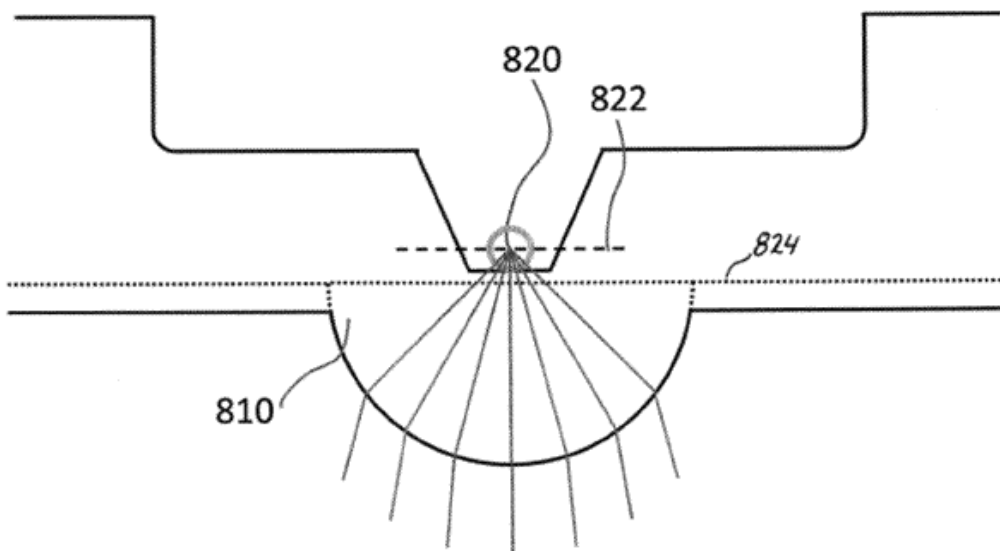


Fig. 9

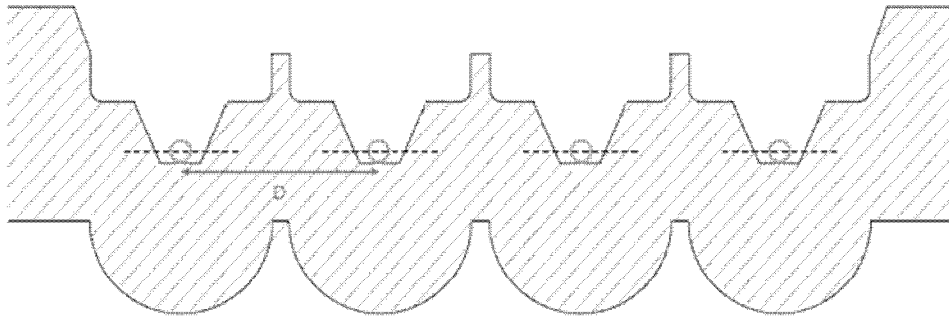


Fig. 10  
Técnica anterior

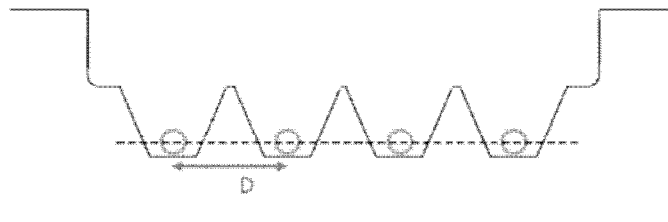




Fig. 11

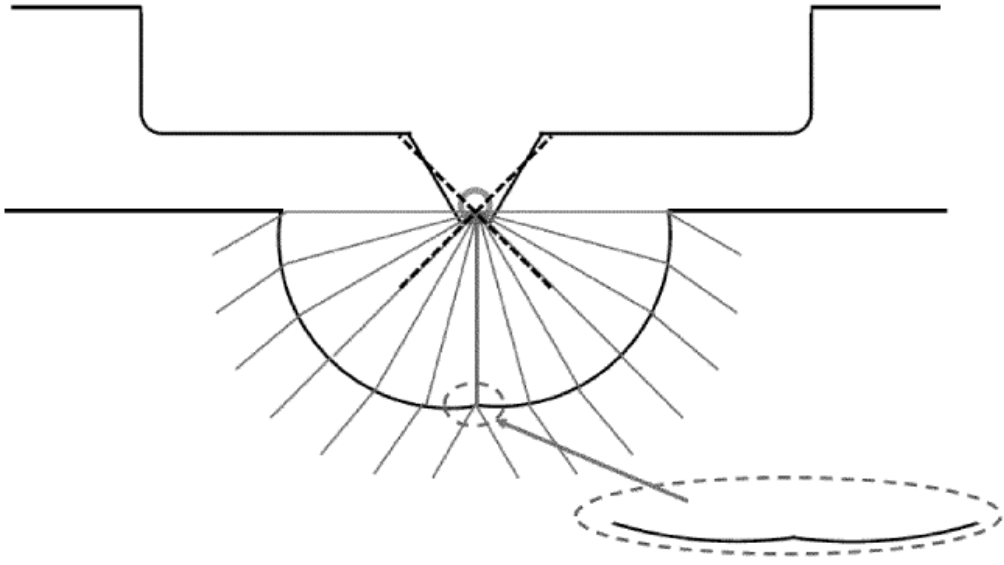


Fig. 12



Fig. 13



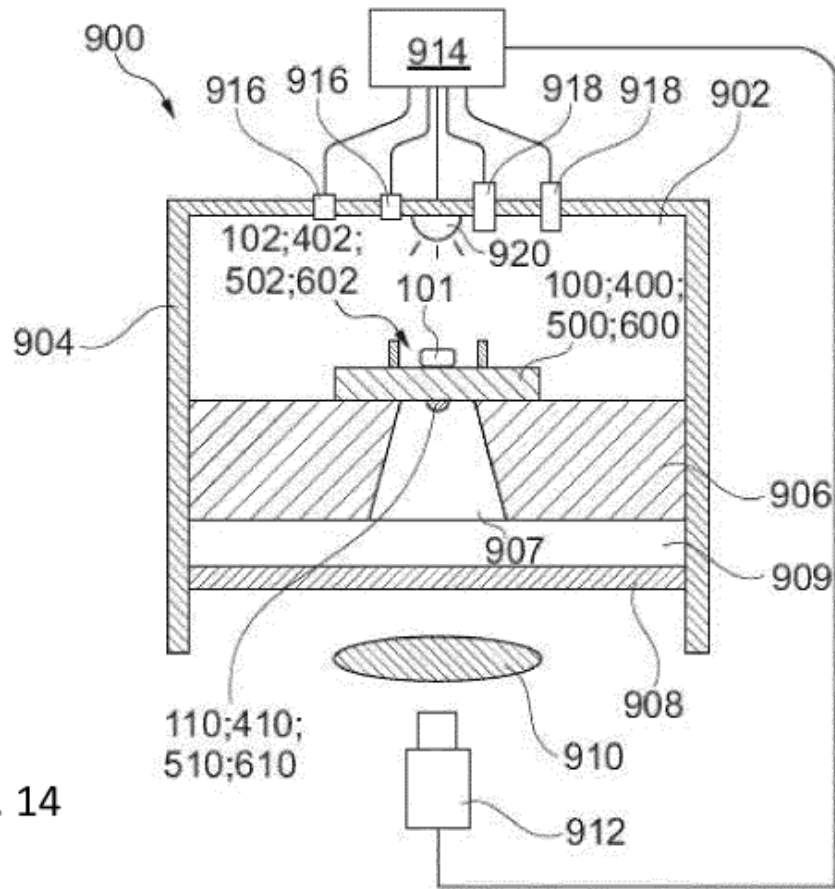


Fig. 14

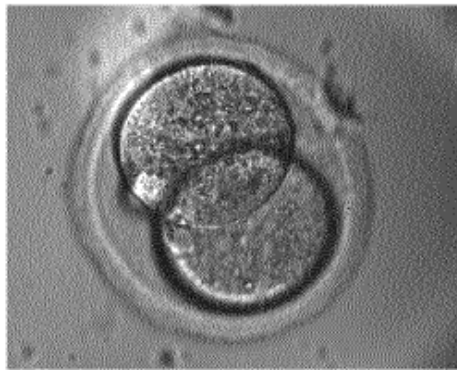


Fig. 15