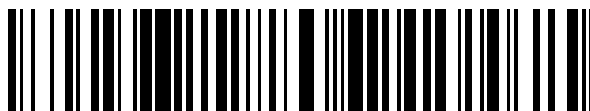


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 623**

51 Int. Cl.:

A01N 1/00 (2006.01)

A01N 3/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

G01N 1/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2009 PCT/AU2009/000212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2009 WO09105813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2009 E 09714696 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2257155**

54 Título: **Criopreservación de células y tejidos biológicos**

30 Prioridad:

25.02.2008 AU 2008900890

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

29.03.2019

73 Titular/es:

**GENEA IP HOLDINGS PTY LIMITED (100.0%)
Level 2, 321 Kent Street
Sydney, NSW 2000, AU**

72 Inventor/es:

STOJANOV, TOMAS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 706 623 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

Criopreservación de células y tejidos biológicos

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a un procedimiento y un equipo para la criopreservación de células y tejidos biológicos.

10 La invención se ha desarrollado principalmente para su uso en la criopreservación de ovocitos, embriones y células madre humanas mediante vitrificación aplicada durante la fecundación *in vitro* (FIV).

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 La siguiente discusión de la técnica anterior se proporciona como antecedentes técnicos para facilitar que las características y beneficios de la invención se aprecien completamente en un contexto técnico apropiado. Sin embargo, cualquier referencia a la técnica anterior no debería tomarse como una admisión expresa o implícita de que dicha técnica es ampliamente conocida o forma parte del conocimiento general común en este campo.

20 La tecnología para criopreservar embriones humanos y animales, así como muchos otros tipos de células biológicas y pequeñas muestras de tejidos es conocida, por ejemplo, por Tao Li y col. en el documento: *Bulk vitrification of human embryonic stem cells*, Human Reproduction, Vol. 23, nº 2, 14 de diciembre de 2007, páginas 358-364, XP055214310, ISSN: 0268-1161.

25 En particular, durante los procesos de fecundación *in vitro* (FIV) la criopreservación de embriones implica la extracción, fecundación, congelación y almacenamiento de embriones. Cuando sea necesario, los embriones pueden ser descongelados y trasladados al útero para un desarrollo normal.

Últimamente se han aplicado técnicas similares de criopreservación a óvulos u ovocitos no fecundados. La
30 criopreservación de ovocitos implica la extracción, congelación y almacenamiento de los óvulos femeninos u ovocitos en un estado no fecundado. Cuando sea necesario, los óvulos pueden ser descongelados, fecundados y trasladados al útero como embriones. La técnica de congelar ovocitos en lugar de embriones se considera conveniente por razones médicas, personales y éticas.

35 Actualmente hay dos procedimientos conocidos para criopreservar células y tejidos biológicos. Para tener éxito, todas las estrategias de criopreservación deben prevenir la formación de cristales de hielo, los efectos de la solución y el shock osmótico. El procedimiento tradicional es enfriar lentamente la(s) célula(s) y la solución que la(s) envuelve a la temperatura de almacenamiento e iniciar deliberadamente la formación de cristales de hielo alejados de la(s) célula(s). Un procedimiento más reciente conocido como vitrificación transforma la solución en un sólido amorfo,
40 similar al vidrio, que está libre de cualquier estructura cristalina tras un enfriamiento extremadamente rápido.

En ambos procedimientos, es conocido el uso de productos químicos adicionales para evitar el daño celular. A estos químicos se les conoce como crioprotectores y pueden dividirse en dos categorías: permeables y no permeables.

45 Los crioprotectores permeables son moléculas pequeñas que penetran fácilmente las membranas de las células. Forman enlaces de hidrógeno con moléculas de agua e impiden la cristalización del hielo. Algunos ejemplos son: el etilenglicol (EG), el dimetilsulfóxido (DMSO) y el glicerol. En bajas concentraciones en agua disminuyen la temperatura de congelación de la mezcla resultante. Sin embargo, en concentraciones suficientemente altas inhiben la formación del cristal de hielo característico y conducen al desarrollo de un estado sólido, vítreo o vitrificado en el
50 que el agua se solidifica, pero no es cristalina ni se expande. La toxicidad en esta concentración es bastante alta y, por lo tanto, la célula puede exponerse a esta solución durante un período muy corto de tiempo (como en las técnicas de vitrificación) o a temperaturas muy bajas en las que la tasa metabólica de la célula es muy baja.

En contraste con los crioprotectores permeables, los crioprotectores no permeables permanecen extracelulares.

55 Algunos ejemplos son los disacáridos trehalosa y sacarosa. Actúan extrayendo el agua libre del interior de la célula, deshidratando así el espacio intracelular. Como resultado, cuando se usan en combinación con un crioprotector permeable, la concentración neta del crioprotector permeable se puede aumentar en el espacio intracelular. Esto ayuda aún más al crioprotector permeable a prevenir la formación de cristales de hielo.

60 Durante la vitrificación, los crioprotectores permeables se pueden añadir en una alta concentración mientras la

temperatura de la célula se controla a un nivel predeterminado por encima de la congelación. Sin embargo, debido a que la toxicidad de esta alta concentración de crioprotector permeable es considerable, la(s) célula(s) no puede mantenerse a estas temperaturas durante mucho tiempo. En cambio, se permite un tiempo muy corto para el equilibrado, después de lo cual los embriones / ovocitos se sumergen directamente en nitrógeno líquido. Esta tasa de enfriamiento extremadamente rápida no solo minimiza los efectos negativos del crioprotector sobre la célula, sino que también protege aún más contra la formación de cristales de hielo al fomentar la vitrificación.

Un procedimiento de vitrificación típico implica exponer la célula a tres o más soluciones de vitrificación. Las soluciones de vitrificación se añaden a los pocillos respectivos en una placa microtituladora. La placa y las soluciones se calientan a una temperatura predeterminada seleccionada dependiendo del tipo de célula o tejido.

En un protocolo típico, la célula es trasladada a una primera solución en un primer pocillo y se lava moviendo cuidadosamente la célula a través de la solución con un dispositivo de pipeteo celular. El procedimiento de lavado se repite en el segundo, tercer y cuarto pocillo durante varios períodos de tiempo predeterminados hasta que la célula esté lista para la criopreservación.

La célula entonces se extrae junto con una medida predeterminada de solución de vitrificación con una pipeta. Una gota que contiene la célula a vitrificar se pasa al gancho de un bastoncillo de fibra.

El bastoncillo de fibra se puede trasladar directamente al nitrógeno líquido o sobre la superficie de un bloque de vitrificación que se ha enfriado previamente con nitrógeno líquido. El bastoncillo de fibra se sitúa sobre la superficie del bloque durante un período mínimo en el que la célula y el fluido se vitrifican. El bastoncillo de fibra se inserta entonces en una pajuela previamente enfriada o en otro dispositivo situado en una ranura en el bloque de vitrificación antes de ser trasladado a un almacenamiento a largo plazo en frío, ya sea en nitrógeno líquido o en vapor de nitrógeno líquido.

Para maximizar las posibilidades de supervivencia de la célula es muy importante que el procedimiento se lleve a cabo con una manipulación mínima. Además, el procedimiento y el tiempo de lavado y enfriamiento deben cumplirse con una variación mínima. El procedimiento es largo y requiere además que el técnico tenga un nivel relativamente alto de preparación y habilidad para lograr una ratio de supervivencia aceptable.

Un objetivo de la presente invención es superar o mejorar sustancialmente una o más de las limitaciones de la técnica anterior, o al menos proporcionar una alternativa útil.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para la criopreservación de una célula orgánica como la aplicada durante los procedimientos de fecundación *in vitro* (FIV).

El término «célula biológica» se usa en esta invención y está destinado a aplicarse a cualquier célula biológica pequeña o a grupos de células, ya sean unidas o no unidas. Está destinado a incluir a células individuales tales como ovocitos y células madre, pequeñas estructuras multicelulares tales como embriones y pequeñas muestras de tejidos.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un equipo de criopreservación de células orgánicas de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en la vitrificación de una célula orgánica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

A continuación se describirán las realizaciones preferidas de la invención, solo a modo de ejemplo, en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1a es una vista en perspectiva de un recipiente celular de acuerdo con la invención;

La figura 1b es una vista en perspectiva del recipiente celular mostrado en la figura 1a;

La figura 1c es una vista en perspectiva de una parte detallada del receptáculo para células del recipiente celular mostrado en la figura 1a;

Las figuras 1d y 1e son vistas en perspectiva de una parte detallada de los recipientes celulares alternativos de acuerdo con la invención;

La figura 1f es una vista en perspectiva de una pajuela de almacenamiento de acuerdo con la invención;

La figura 2a es una vista en perspectiva de una bandeja de sujeción de acuerdo con la invención;

- La figura 2b es una vista en perspectiva superior de una parte detallada de un recipiente celular situado en la bandeja de sujeción mostrada en la figura 2a;
- La figura 2c es una vista en perspectiva inferior de una parte detallada de un recipiente celular en la bandeja de sujeción mostrada en la figura 2a;
- 5 La figura 2d es una vista en perspectiva superior de una parte detallada de un recipiente celular en la bandeja de sujeción mostrada en la figura 2a;
- La figura 3a es una vista en perspectiva de una cubierta para la bandeja de sujeción mostrada en la figura 2a, de acuerdo con la invención;
- La figura 3b es una vista en perspectiva explosionada de la cubierta para la bandeja de sujeción mostrada en la
- 10 figura 3a y la bandeja de sujeción mostrada en la figura 2a;
- La figura 3c es una vista en perspectiva explosionada de la cubierta para la bandeja de sujeción mostrada en la figura 3a y la bandeja de sujeción mostrada en la figura 2a;
- La figura 4a es una vista en perspectiva de la cubierta para la bandeja de sujeción mostrada en la figura 3a montada sobre la bandeja de sujeción mostrada en la figura 2a.
- 15 La figura 4b es una vista en perspectiva del reverso de la cubierta para la bandeja de seguridad mostrada en la figura 3a montada sobre la bandeja de seguridad mostrada en la figura 2a;
- La figura 4c es una vista en perspectiva de una estación de lavado de acuerdo con la invención;
- La figura 5a es una vista en perspectiva de una parte detallada de la figura 4a;
- La figura 5b es una vista en perspectiva de un recipiente celular de acuerdo con la invención;
- 20 La figura 5b es una vista en perspectiva en sección transversal detallada de la estación de lavado mostrada en la figura 4c y el ensamblaje de la bandeja y la cubierta mostrados en la figura 4a;
- La figura 6a es una vista en perspectiva explosionada del ensamblaje de la bandeja y la cubierta mostrados en la figura 4a y una estación de enfriamiento de acuerdo con la invención;
- La figura 6b es una vista en perspectiva del ensamblaje de la bandeja y la cubierta que se muestra en la figura 4a
- 25 montado sobre la estación de enfriamiento que se muestra en la figura 6a;
- La figura 7a es una vista en perspectiva de la bandeja mostrada en la figura 2a montada sobre la estación de enfriamiento mostrada en la figura 6a con un recipiente celular retirado;
- La figura 7b es una vista en perspectiva de la bandeja mostrada en la figura 2a montada sobre la estación de enfriamiento mostrada en la figura 6a con un recipiente celular retirado;
- 30 La figura 8a es una vista en perspectiva del recipiente celular de la figura 1a y la pajueta de la figura 1f;
- La figura 8b es una vista en perspectiva del recipiente celular de la figura 1a parcialmente insertado en la pajueta de la figura 1f; y
- La figura 8c es una vista en perspectiva del recipiente celular de la figura 1a completamente insertado en la pajueta de la figura 1f y listo para el almacenamiento a largo plazo en frío.

35 REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

Haciendo referencia a los dibujos, la invención proporciona un procedimiento y un equipo para la criopreservación de ovocitos, embriones y otros tipos celulares.

40 En aras de la sencillez, la realización preferida de la invención se describirá en relación con las células de ovocitos, sin embargo, la invención no se limita a la criopreservación de ovocitos y está destinada a ser igualmente aplicable a otras células y tejidos biológicos, incluidas las células individuales tales como las células madre, los grupos de células tales como los embriones y las muestras de tejidos durante los procesos de fecundación *in vitro*.

45 Asimismo, mientras que el procedimiento y el equipo se describen en relación con la criopreservación por vitrificación, se comprenderá que pueden aplicarse igualmente a otros procedimientos de criopreservación.

50 En su forma más simple, el procedimiento consiste en poner una célula de ovocito en un recipiente celular, sujetar el recipiente celular en una estación de tratamiento, aplicar una solución de tratamiento a dicha célula lavando la célula con la solución y enfriar rápidamente el recipiente celular y la célula a una temperatura de criopreservación predeterminada para la criopreservación de la célula. Preferentemente, la célula se enfría a un ritmo elevado suficiente para posibilitar que se produzca la solidificación de la célula y de cualquier solución de tratamiento que la envuelva. Más preferentemente, la solidificación incluye la vitrificación sustancial de la célula y el fluido que la

55 envuelve. La célula se mantiene entonces a una temperatura de almacenamiento predeterminada, o por debajo de ella, para su almacenamiento.

La invención incluye múltiples componentes diseñados para funcionar juntos, lo que facilita un manejo sencillo, seguro e higiénico de la célula. El procedimiento y el equipo también se prestan a la multiplexación, de modo que un

60 técnico individual puede tratar más de un recipiente celular y más de una célula de ovocito simultáneamente.

En relación con la figura 1a, el recipiente celular (1) incluye medios de retención para retener la célula orgánica mientras permiten que el fluido pase sobre la célula y a través del recipiente celular. Los medios de retención incluyen un filtro (2) para proporcionar una barrera física a las células mientras se permite el paso de una solución de tratamiento. El filtro se puede ver en la figura 1c, que proporciona un primer plano del recipiente.

En esta realización el recipiente también incluye paredes laterales (3), que delimitan un receptáculo con forma de taza (4) que tiene una entrada superior abierta (5). De esta manera, en la realización mostrada en la figura 1c, el filtro (2) constituye la superficie inferior del receptáculo. Sin embargo, en otras realizaciones el filtro puede constituir cualquier parte del receptáculo, incluyendo el fondo y / o las paredes laterales. El filtro (2) puede ser una malla, membrana, material fibroso, material perforado o material poroso que permita el paso de líquidos pero que retenga el ovocito dentro del receptáculo.

Una realización adicional del receptáculo que tiene paredes laterales convergentes (6) se muestra en una vista detallada en la figura 1d. Las paredes laterales convergentes reducen la probabilidad de que la célula sea arrastrada fuera del receptáculo a través de la parte superior abierta. En esta vista también se muestra un embrión (7). En la figura 1e se muestra una realización adicional del receptáculo del recipiente. En esta realización, las paredes laterales incluyen recortes.

En otra realización adicional no mostrada en las figuras, el receptáculo puede incluir una cubierta extraíble. La cubierta puede incluir un material de filtro adicional sobre una entrada de fluido para permitir el paso del fluido dentro del recipiente celular mientras impide que la célula se escape. Así, la célula se asegura en una cámara de retención. El filtro en la cubierta puede ser de cualquier material de filtro como se describió anteriormente.

Todas las realizaciones mostradas en las figuras incluyen un mango alargado (8) unido al recipiente celular (1) para facilitar que la célula de ovocito se mueva manualmente sin contacto directo del operador. El mango también proporciona un área útil de etiquetado (9) para el etiquetado y la identificación.

En esta realización, el receptáculo está diseñado para encajar en una funda tubular alargada o pajuela (10) como se muestra en la figura 1f. La pajuela (10) está abierta en un extremo (11) y sellada en el otro (12). Una reborde circunferencial (13) en el mango del recipiente celular (1) se acopla y sella con el orificio interior de la pajuela tubular (14, 10), sellando así el ovocito dentro de la pajuela una vez que el procedimiento de congelación está completo.

En realizaciones alternativas no mostradas en los dibujos, el mango se puede desmontar de manera selectiva. En realizaciones adicionales, el mango es una herramienta separada diseñada para acoplar y agarrar de manera selectiva el recipiente celular para que pueda moverse según se necesite. La herramienta puede tener la forma de una herramienta tipo pinza o incluir una abrazadera simple fija o una formación de acoplamiento para rodear y acoplar completamente el recipiente celular. En tales realizaciones, el recipiente celular puede incluir una parte, formación o pestaña de acoplamiento diseñada para acoplarse de manera liberable con el mango o la herramienta.

En otras realizaciones adicionales, el recipiente celular incluye múltiples receptáculos (4) unidos para proporcionar tratamiento y criopreservación a múltiples células. Los receptáculos, por lo demás similares a uno o más de los descritos anteriormente, pueden estar posicionados con una separación predeterminada entre sí para acoplarse con otros componentes, como se apreciará en la descripción a continuación. Alternativamente, cada uno de los recipientes celulares puede incluir formaciones de enlace para permitir que múltiples recipientes celulares se unan entre sí, formando de hecho un recipiente celular de múltiples receptáculos. De esta manera los recipientes celulares se pueden unir rápida y fácilmente en el laboratorio para proporcionar tantos receptáculos como sea necesario. Preferentemente, las formaciones de enlace están configuradas para posicionar los recipientes celulares con una separación predeterminada.

La invención incluye además una carcasa de sujeción para sujetar el recipiente celular. La carcasa se muestra en la figura 2a y en esta realización tiene la forma de una bandeja (20). La bandeja incluye una formación de acoplamiento (21) y una parte receptora del recipiente celular (22), cada una mostrada en detalle en las figuras 2b y 2d, respectivamente. Como se apreciará en relación con las figuras, en esta realización la formación de acoplamiento (21) incluye un surco de colocación alargado y poco profundo para recibir y colocar con seguridad el mango del recipiente celular (8, 1). De esta manera, la forma y configuración complementarias del mango del recipiente celular (8) y el surco correspondiente en la carcasa inclinan el recipiente celular hacia una orientación y posición particulares con respecto a la carcasa (20).

En posición, como se muestra en la vista superior detallada de las figuras 2b y 2d y en la vista inferior de la figura 2c,

el recipiente celular se posiciona dentro o sobre la parte receptora de la carcasa (22, 20). En esta realización, como se puede ver claramente en la figura 2a, la parte receptora (22) incluye una abertura en la bandeja para que el recipiente celular sea accesible desde arriba y la parte inferior del recipiente celular esté alejada o sobresalga del fondo de la bandeja.

5

La bandeja (20) puede incluir una pluralidad de surcos para recibir una pluralidad de recipientes celulares en un conjunto. La bandeja ilustrada en las figuras tiene surcos para ocho recipientes celulares. Sin embargo, se apreciará que una bandeja puede acomodar más de ocho recipientes celulares o menos.

10 En la configuración alternativa donde el recipiente celular no incluye un mango, la formación de acoplamiento (21) en la bandeja (20) puede incluir salientes que se acoplan a la pared lateral exterior del recipiente celular. En otras realizaciones adicionales, el recipiente celular incluye formaciones de acoplamiento correspondientes para acoplar las formaciones de acoplamiento sobre la bandeja.

15 Volviendo a las figuras, la invención también incluye medios de sujeción para fijar los recipientes celulares dentro de la bandeja. En algunas realizaciones, el recipiente celular y la bandeja pueden incluir formaciones de sujeción por fijación a presión (23) para fijar individualmente cada recipiente celular directamente a la bandeja. Tal formación de sujeción se puede ver en relación con la figura 2b y acopla el mango del recipiente celular (3).

20 En esta realización, los medios de sujeción también incluyen una cubierta para la bandeja (24) para mantener conjuntamente los recipientes celulares dentro de los surcos de colocación (21) en la bandeja (20), impidiendo así su extracción y cualquier movimiento relativo dentro de la bandeja. La cubierta (24) incluye medios de fijación liberables para fijarse a los medios de fijación liberables correspondientes en la bandeja, sujetando así la cubierta a la bandeja. La cubierta también incluye una formación de embudo y una abertura (25). La formación de embudo y la abertura

25 están configuradas de tal manera que cuando la cubierta se fija a la bandeja, el embudo y la abertura se alinean con la parte superior abierta del recipiente celular. La función del embudo se detallará más adelante. La cubierta también puede incluir formaciones de colocación (26) para acoplar y sujetar el mango del recipiente celular. Estas formaciones de colocación se pueden ver en la vista del reverso de la cubierta en la figura 3a.

30 Se apreciará que, fijados dentro de la bandeja, una pluralidad de recipientes celulares pueden ser movidos de manera segura y fácil por un técnico individual o un dispositivo de manipulación mecánica, un robot automatizado o similar. Además, debido a que la posición relativa de los recipientes celulares y la bandeja está establecida, la bandeja se puede usar como una guía para alinear el conjunto de recipientes celulares para el tratamiento en una estación de tratamiento.

35

A este respecto, la invención incluye al menos una estación de tratamiento en la que se puede enganchar de manera selectiva la bandeja y realizar varias operaciones. La estación está configurada para recibir la bandeja e incluye formaciones de enganche para engancharse con las correspondientes formaciones de enganche de la bandeja.

40

Una primera estación de tratamiento es una estación de lavado (30) mostrada en la figura 4c. La estación de lavado incluye un desagüe (31) para capturar el fluido de desecho y medios de control de temperatura (32). En esta estación las células se mantienen a una temperatura predeterminada mediante los medios de control de temperatura y se lavan con la solución de tratamiento.

45

Una segunda estación de tratamiento es una estación de enfriamiento (40), que se muestra en las figuras 6a y 6b, donde las células y los recipientes celulares se enfrían por debajo de la temperatura de criopreservación. Las propiedades de enfriamiento específicas de la estación de enfriamiento dependerán del procedimiento de criopreservación previsto, ya sea por congelación a menor ritmo o por vitrificación rápida. La estación de

50 enfriamiento (41) incluye un bloque de enfriamiento o dispositivo similar que se mantiene a una temperatura muy baja con nitrógeno líquido.

En esta realización, las estaciones de tratamiento y enfriamiento están en lugares distintos y la bandeja se traslada entre ellas. Sin embargo, también es posible que la bandeja se mantenga en un punto fijo y que las estaciones se muevan para alinearse con la bandeja según sea necesario.

55

En uso, un ovocito a criopreservar se sitúa dentro del receptáculo del recipiente celular (4, 1) como se muestra en la figura 1a. El recipiente celular (1) en sí está generalmente preetiquetado con detalles de identificación acerca de la célula y / o el donante. El recipiente (1) se sitúa entonces dentro de la bandeja de sujeción (20) de manera que el

60

mango del recipiente celular descansan en el surco correspondiente y el receptáculo del recipiente está colocado en

la abertura receptora (22) o por encima de ella. Esto se puede ver en la figura 2c, donde la base del recipiente celular sobresale por debajo de la superficie inferior de la bandeja. La figura 2b muestra el mango del recipiente celular acoplado en el surco de colocación y asegurado con formaciones de sujeción por fijación a presión (23). En la realización representada, ocho de tales recipientes celulares se sitúan en la bandeja en un conjunto de surcos de colocación respectivos.

Con los recipientes celulares en su sitio, la cubierta de la bandeja se alinea y se fija sobre la bandeja. En posición, las formaciones de embudo y las aberturas sobre la cubierta de la bandeja se alinean con la parte superior abierta de los receptáculos para células.

La bandeja entonces se traslada a la primera estación de tratamiento: la estación de lavado (30). Las formaciones de enganche correspondientes sobre la bandeja y la estación de lavado posicionan la bandeja de manera que los receptáculos colocados estén por encima del desagüe, adyacentes al bloque de calentamiento (32). Esto se puede ver en la figura 5b donde la cubierta (24) y el embudo se posicionan por encima de la parte superior abierta del receptáculo, que está sobre el desagüe de la estación de lavado (31).

Como se ve en la figura 5a, una pipeta dispensadora de fluidos (50) se posiciona por encima de la formación de embudo para dispensar una medida predeterminada de solución de tratamiento dentro de cada abertura de embudo. El fluido fluye hacia abajo a través del embudo, sale por la abertura del embudo hacia el interior del receptáculo del recipiente pasando sobre la célula de ovocito y lavándola. El exceso de fluido se drena desde el receptáculo a través del filtro (2) y pasa al interior del desagüe.

El caudal de fluido de la pipeta y las proporciones del embudo se eligen cuidadosamente para que el fluido de tratamiento fluya delicadamente hacia el receptáculo. Si el caudal del fluido es demasiado alto, el fluido puede dañar las células y / o desbordar el receptáculo y posiblemente desalojar las células. Como medida preventiva, en algunas realizaciones, se puede situar una membrana de filtración adicional sobre la entrada superior abierta (5) para retener la célula dentro del receptáculo.

Asimismo, para estimular el flujo de la solución de tratamiento a través del filtro, el desagüe (31) se mantiene en una presión negativa. A este respecto, la estación de tratamiento también incluye medios de vacío para aplicar una presión negativa suave al desagüe. Una bomba de vacío y la electrónica de control correspondiente están posicionadas dentro de una cavidad de la estación de lavado (33).

También es fundamental durante este procedimiento mantener la célula de ovocito a la temperatura correcta. Para este fin, el fluido de tratamiento se mantiene a una temperatura predeterminada en la pipeta y el bloque de calentamiento (32) mantiene la temperatura de las células en un nivel predeterminado.

La célula puede tratarse con una serie de diferentes soluciones de tratamiento según sea necesario. Se puede usar la misma pipeta para cada solución o, si las soluciones son incompatibles, se puede usar una pipeta diferente para cada solución. La última solución de tratamiento a aplicar es un fluido de vitrificación, el cual se vitrifica junto con la célula durante el enfriamiento y la solidificación.

Además, está previsto que el conjunto de ovocitos en sus respectivos recipientes colocados en la bandeja sean todos tratados simultáneamente. Por consiguiente, se utiliza una pipeta de múltiples cabezas (50), como se muestra en la figura 5a, para dispensar la solución de tratamiento a cada recipiente celular al mismo tiempo. Asimismo, el sistema también se presta a la automatización o semiautomatización. Dado que la posición de los recipientes celulares está dictada por la posición de la bandeja, todo el procedimiento de lavado puede ser multiplexado y automatizado.

Como tal, un sistema automatizado permite un control preciso sobre el suministro de la solución de tratamiento, la temperatura del fluido y de la célula, lo cual hasta ahora era difícil de lograr en un sistema manual.

Una vez que se han tratado los ovocitos, la bandeja se retira de la estación de lavado y se traslada sin demora a la estación de enfriamiento (40). Al igual que con la estación de lavado, la estación de enfriamiento incluye formaciones de enganche que se acoplan a la correspondiente formación de enganche en la bandeja (20). En posición, los receptáculos de los recipientes celulares se alinean con el bloque de vitrificación de la estación de enfriamiento (41). El bloque de vitrificación se enfría con nitrógeno líquido, de modo que el enfriamiento ocurre al momento del contacto a un ritmo suficiente para transformar la célula y cualquier fluido de vitrificación que la envuelva en un estado vitrificado. El bloque puede estar sumergido o contener el nitrógeno líquido de modo que esté a una temperatura similar al nitrógeno líquido.

Si bien la vitrificación de los ovocitos o células ocurre muy rápidamente, los recipientes celulares se mantienen en posición en la estación de enfriamiento durante un período predeterminado para garantizar que las células se enfríen a una temperatura adecuadamente baja. Con la bandeja montada en la estación de enfriamiento, Fig. 7a, la cubierta de la bandeja se retira y cada recipiente celular que contiene un ovocito vitrificado se retira de la bandeja, Fig. 7b, y se inserta en una pajuela previamente enfriada (10), Fig. 8b, u otro dispositivo de recepción adecuado. De esta forma, el ovocito está contenido de manera segura, Fig. 8c, y se puede situar en un almacenamiento a largo plazo en frío.

10 De nuevo, el procedimiento de retirada de la bandeja, inserción en una pajuela y luego almacenamiento está automatizado. En realizaciones alternativas se puede realizar manualmente.

Ventajosamente, se apreciará que el sistema permite que la preparación del embrión / ovocito para la criopreservación se controle cuidadosamente. Además, el sistema propuesto permite la preparación y vitrificación de 15 múltiples embriones / ovocitos simultáneamente.

El procedimiento permite que el procedimiento de tratamiento se controle de manera uniforme, eliminando las variaciones del procedimiento de lavado y vitrificación. Además, la invención proporciona una menor manipulación de las células porque permanecen generalmente estacionarias en el recipiente celular durante todo el procedimiento de tratamiento y vitrificación. En estos y otros aspectos, la invención representa una mejora práctica y 20 comercialmente significativa sobre la técnica anterior.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la criopreservación de una célula orgánica (7) como se aplica durante los procedimientos de fecundación *in vitro*, incluyendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 proporcionar una célula orgánica para la criopreservación;
- mantener la célula en un recipiente celular (1);
- 10 sujetar el recipiente celular (1) que contiene la célula a una estación de tratamiento (30, 40), donde dicho recipiente celular (1) está sujeto en una carcasa del recipiente celular (20) y dicha carcasa (20) está sujeta a dicha estación de tratamiento (30, 40), incluyendo dicha carcasa (20) una formación de acoplamiento (21) para acoplar dicho recipiente celular (1), sujetando así el recipiente celular (1) a la carcasa (20), incluyendo dicha estación de tratamiento (30, 40) formaciones de enganche configuradas para engancharse con las correspondientes
- 15 formaciones de enganche en la carcasa (20) para sujetar dicha carcasa (20) a dicha estación de tratamiento (30, 40) en una orientación predeterminada;
- aplicar una primera solución de tratamiento a la célula;
- 20 enfriar dicho recipiente celular (1) y la célula a una temperatura de criopreservación predeterminada; y
- mantener la célula a una temperatura de almacenamiento o por debajo de ella, donde dicha célula se enfría con una tasa de enfriamiento suficiente para promover la vitrificación de la célula y la solución de tratamiento que la envuelve, y
- 25 donde dicha etapa de aplicar una solución de tratamiento incluye retener dicha célula en dicho recipiente celular (1) y permitir que dicha solución fluya sobre dicha célula.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde el recipiente celular (1) incluye un mecanismo de filtración (2) que permite al fluido pasar a través del mecanismo de filtración mientras retiene la célula.
- 30 3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, donde el recipiente celular (1) incluye al menos una pared lateral (3) formando así un receptáculo con forma de taza (4) y delimitando una entrada abierta (5).
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha etapa de
- 35 aplicar una solución de tratamiento incluye aplicar sucesivamente una primera y una segunda solución de tratamiento a dicha célula.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, donde dicha etapa de aplicar una solución de tratamiento incluye aplicar sucesivamente una pluralidad de soluciones de tratamiento a
- 40 dicha célula.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha solución de tratamiento es una solución de vitrificación.
- 45 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde una pluralidad de dichos recipientes celulares (1) están sujetos en un conjunto en la estación de tratamiento (30, 40) simultáneamente.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicha célula
- 50 orgánica incluye la de una célula de ovocito, una célula madre o un embrión.
9. Un equipo de criopreservación de células orgánicas para su uso en la vitrificación de una célula orgánica (7), incluyendo dicho equipo:
- 55 un recipiente celular (1) que tiene un mecanismo de filtración (2) para retener la célula orgánica mientras permite que el fluido pase desde el recipiente celular (1);
- una carcasa del recipiente celular (20) que comprende una formación de acoplamiento para acoplar y sujetar dicho recipiente celular (1) en una orientación predeterminada con respecto a la carcasa del recipiente celular (20);
- 60

una estación de tratamiento (30) para lavar dicha célula orgánica, incluyendo dicha estación de tratamiento:

un mecanismo de control de temperatura (32); y

5 un mecanismo de enganche para acoplar un mecanismo de enganche correspondiente en la carcasa del recipiente celular (20) alineando de ese modo dicha carcasa del recipiente celular (20) en una orientación predeterminada con dicha estación (30),

donde dicho equipo incluye además una estación de enfriamiento (40) para enfriar dichas células a una temperatura de vitrificación; y

10 donde dicha estación de enfriamiento incluye un bloque enfriado con nitrógeno líquido.

10. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 9, donde el recipiente celular (1) incluye un mecanismo de filtración (2) para retener la célula mientras permite que el fluido pase a través del mecanismo de filtración (2) y desde el recipiente.

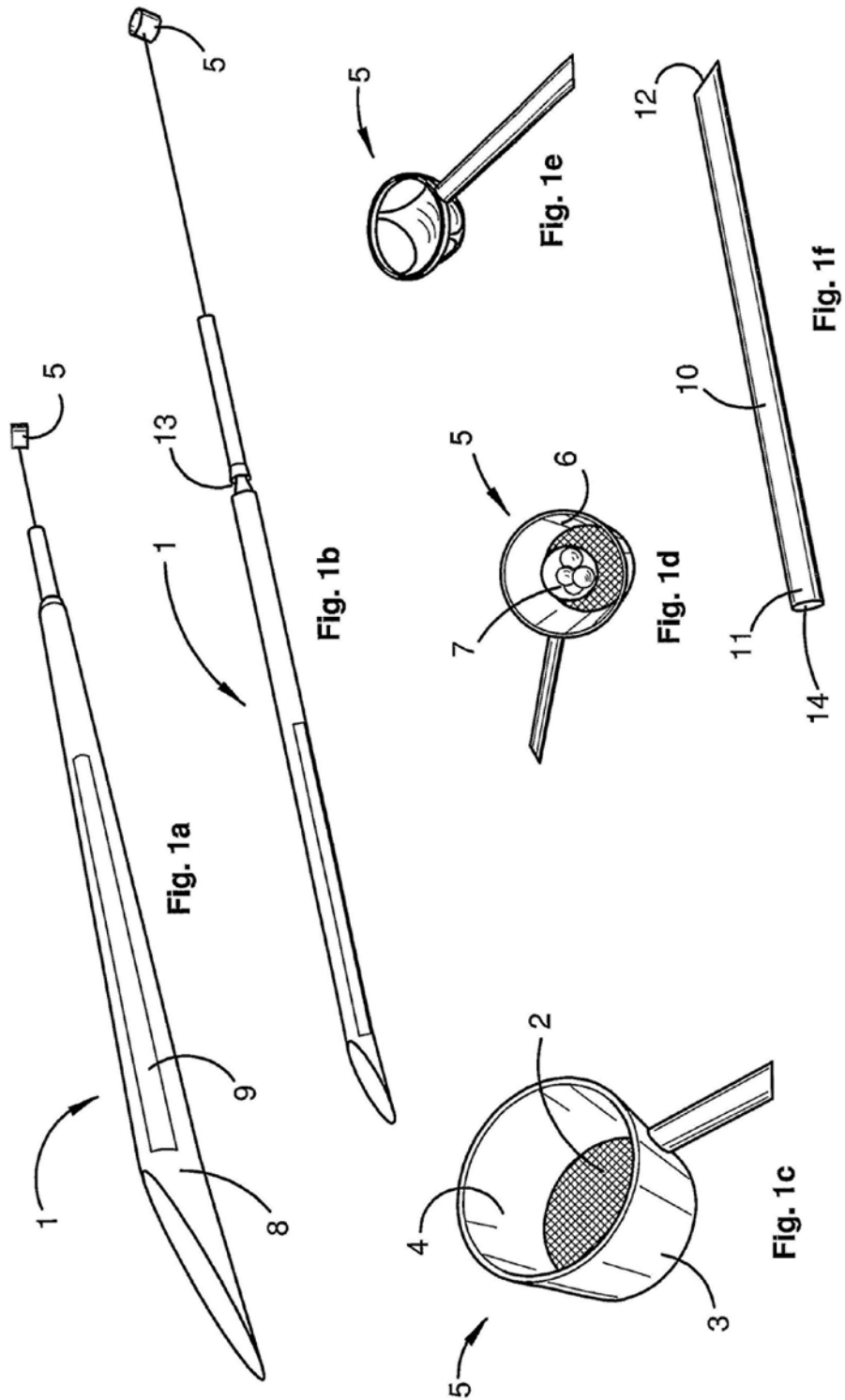
15

11. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, donde el recipiente celular (1) incluye al menos una pared lateral (3), formando así un receptáculo con forma de taza (4) y delimitando una entrada abierta (5).

12. Un equipo de acuerdo con la reivindicación 11, donde dicha pared lateral, al menos una, incluye dicho
20 mecanismo de filtración (2).

13. Un equipo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 10 a la 12, donde dicho mecanismo de filtración (2) incluye al menos una malla, una membrana, un material fibroso, o una sección perforada.

25 14. Un equipo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 13, que incluye además un mango alargado (8) para manipular el recipiente celular (1).



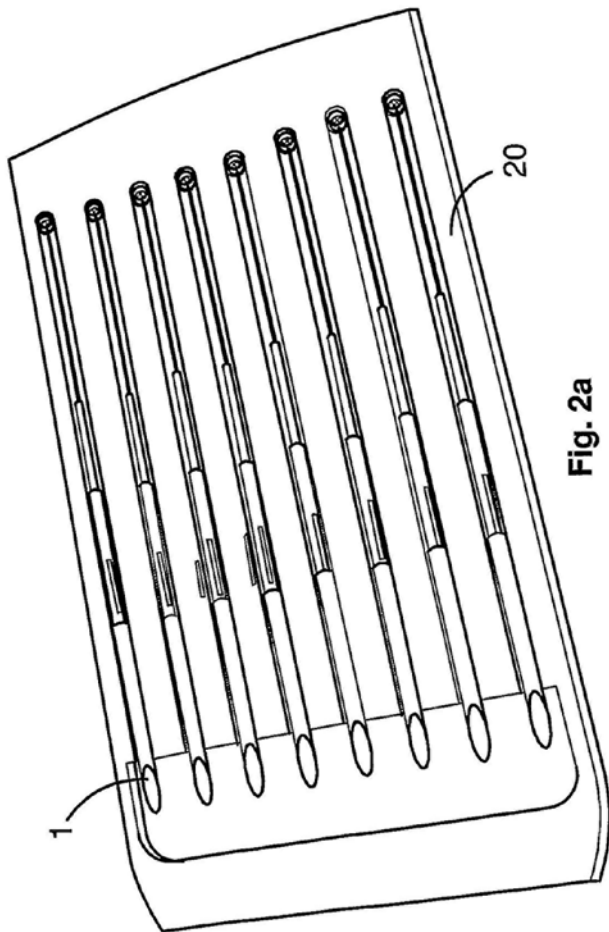


Fig. 2a

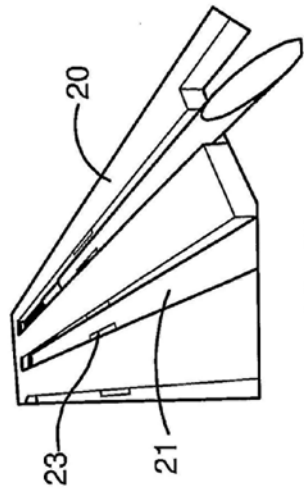


Fig. 2b

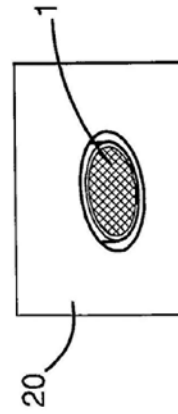


Fig. 2c

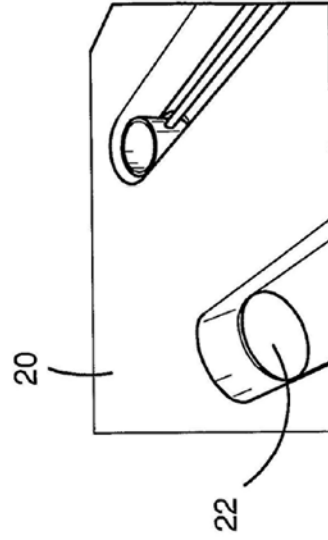
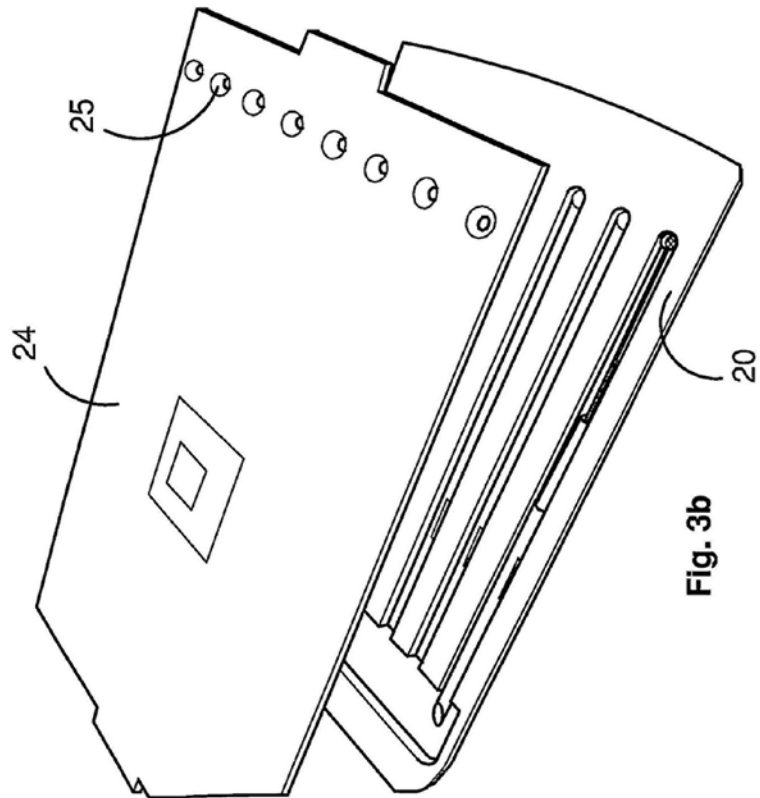
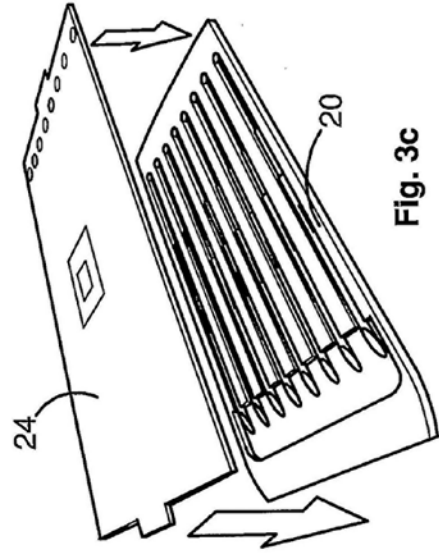
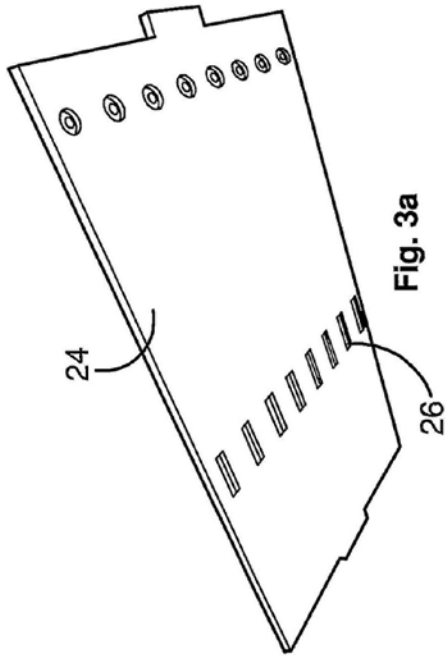
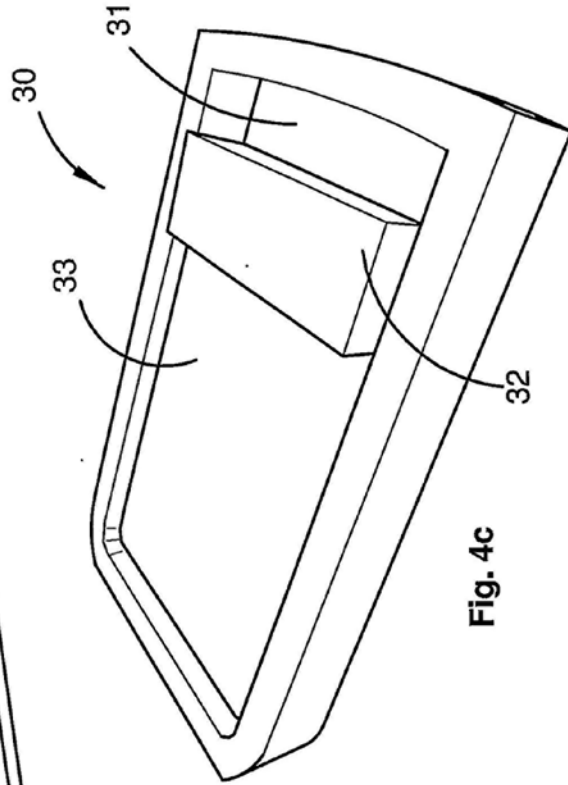
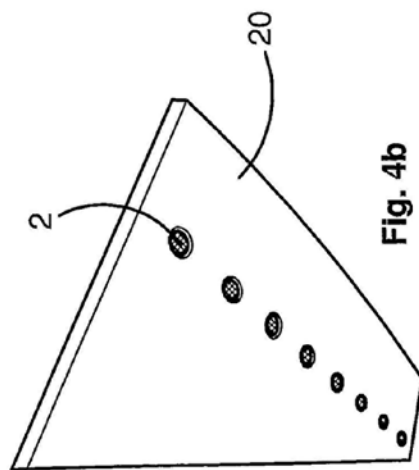
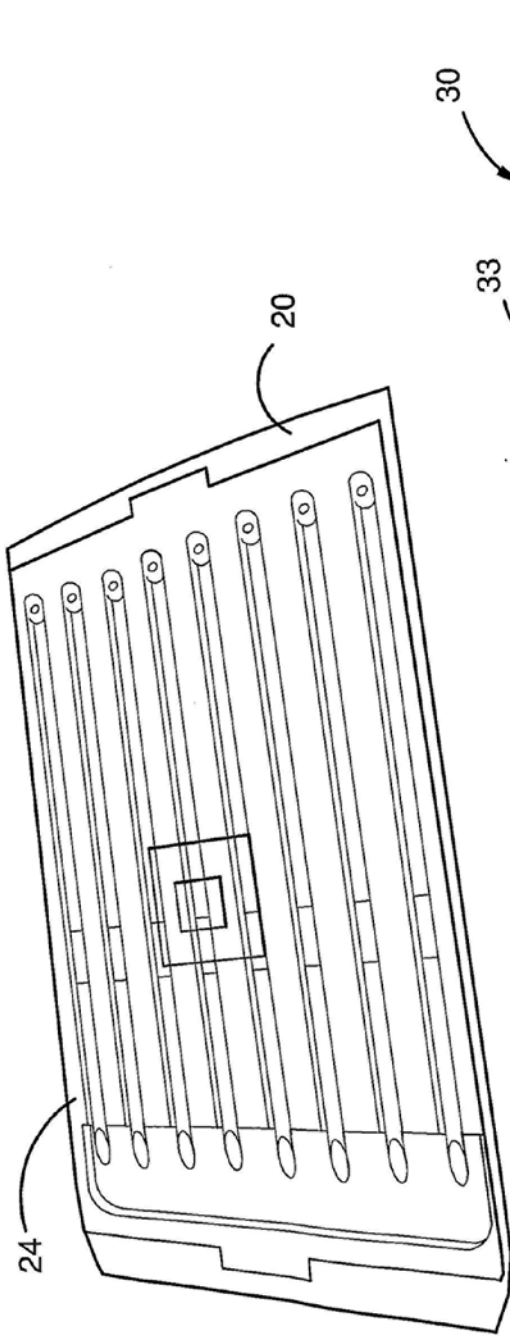


Fig. 2d





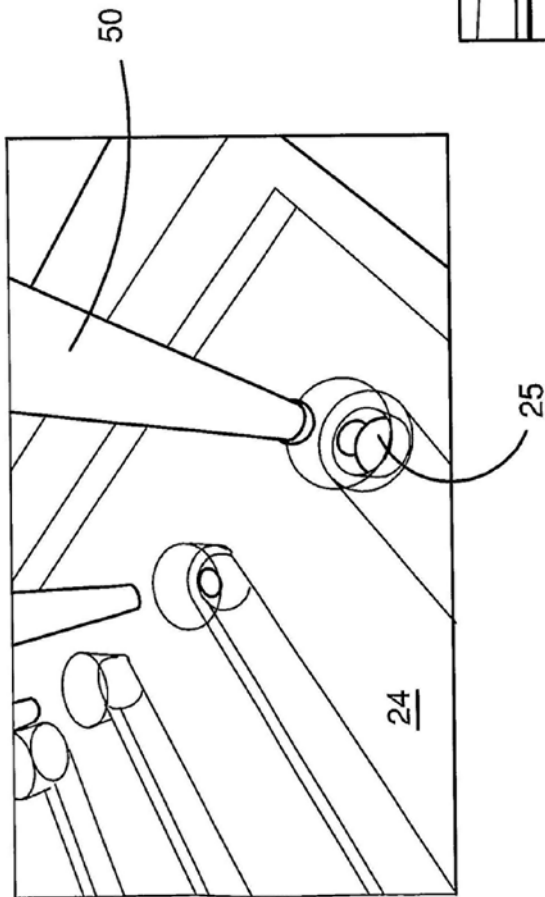


Fig. 5a

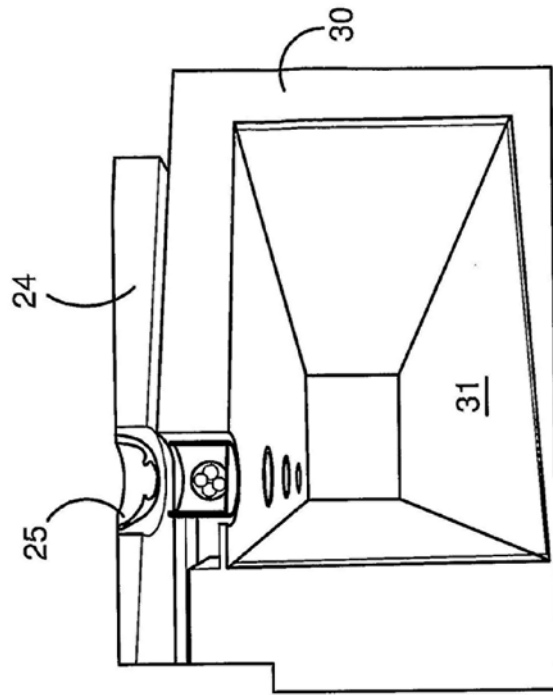
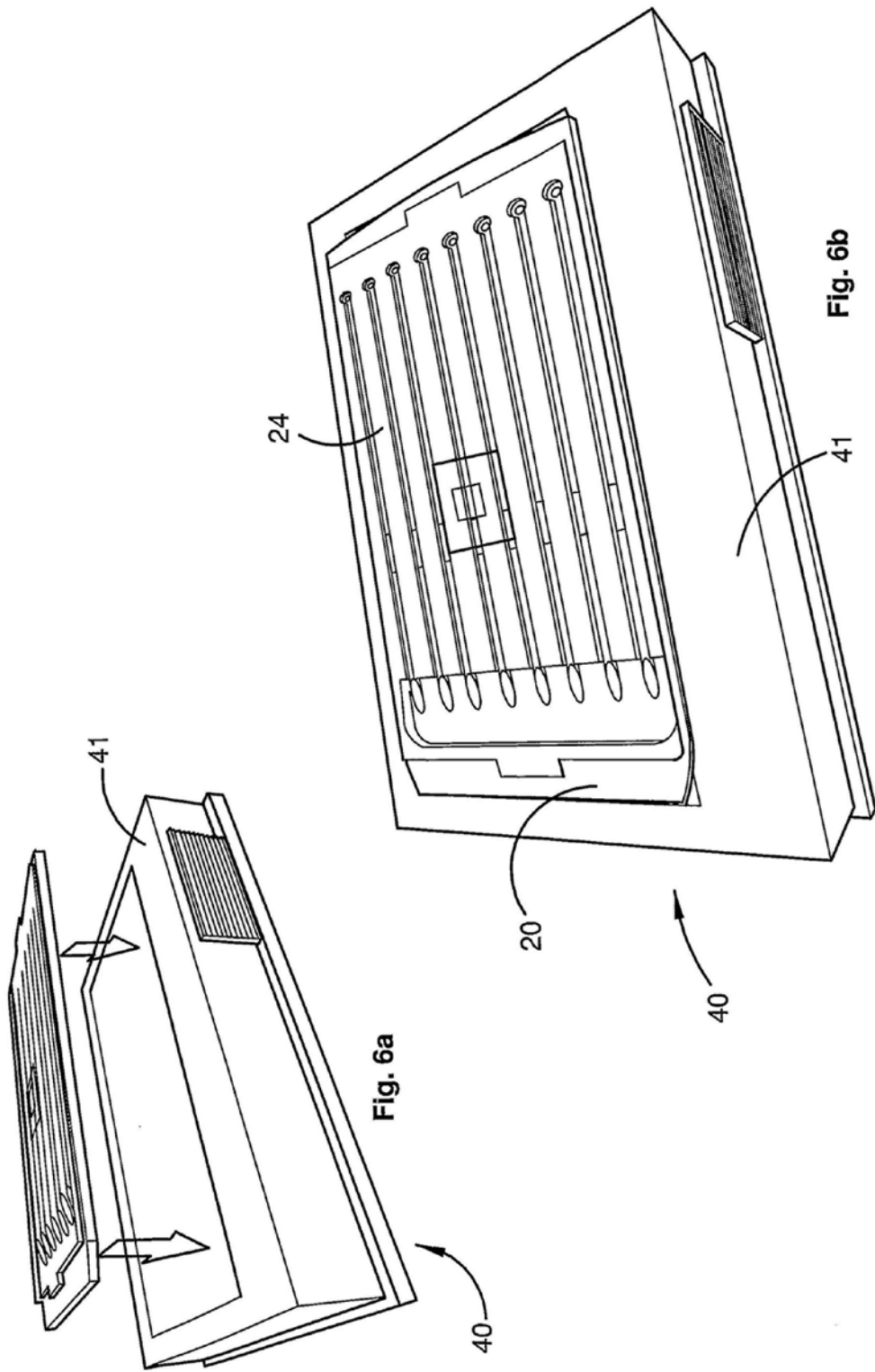


Fig. 5b



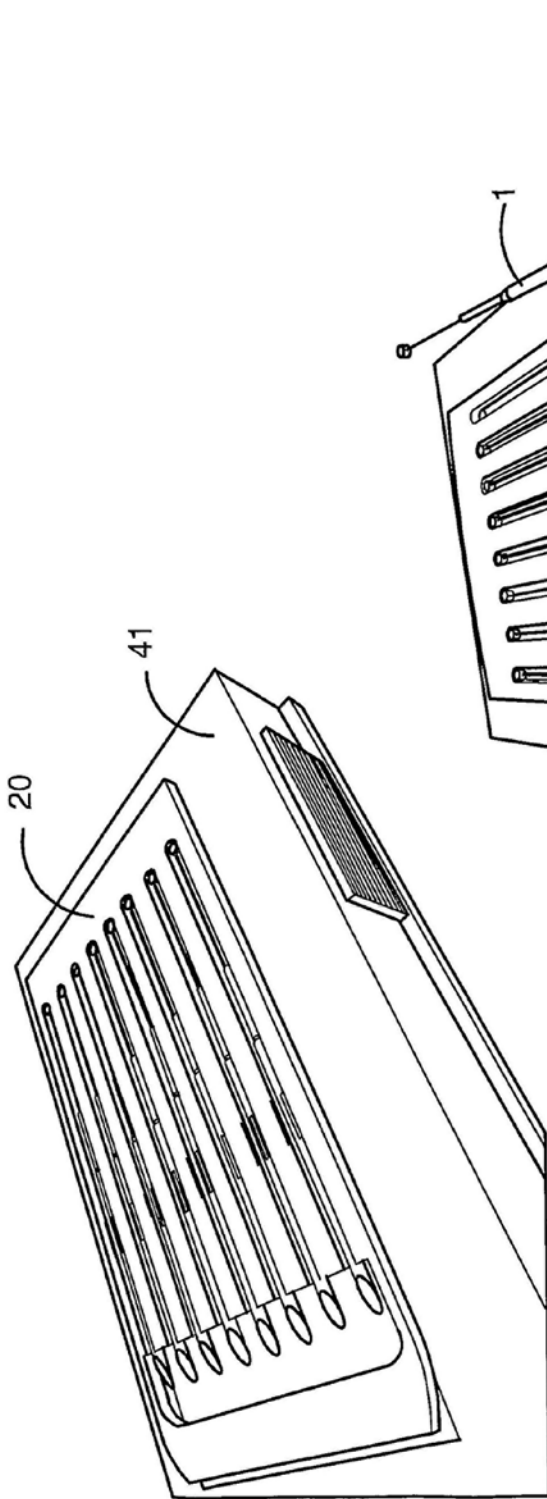


Fig. 7a

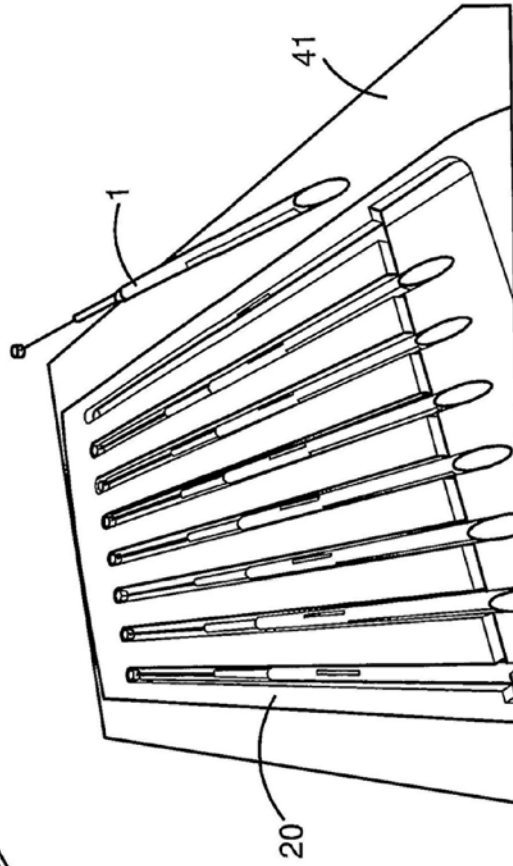


Fig. 7b

