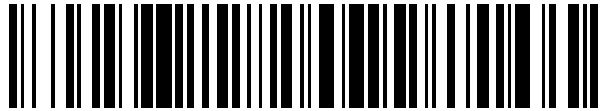


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 800**

21 Número de solicitud: 201930351

51 Int. Cl.:

C12N 5/073 (2010.01)
C12N 5/075 (2010.01)
A01N 1/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.04.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.05.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
(100.0%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación,
Innovación y Transferencia (I2T) Edificio Nexus
(6G) Camí de Vera, s/n
46022 Valencia ES**

72 Inventor/es:

**MARCO JIMÉNEZ, Francisco;
VICENTE ANTÓN, José Salvador;
GARCÍA VALERO, Luis y
GARCÍA DOMÍNGUEZ, Ximo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **DISPOSITIVO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE UNA MUESTRA DE ÓVULOS
Y EMBRIONES POR VITRIFICACIÓN**

57 Resumen:

Dispositivo para la criopreservación de una muestra de óvulos o embriones por vitrificación que comprende un soporte (1) que presenta una única pieza y comprende una porción de sujeción (2) esbelta configurada para sujetar y etiquetar la muestra y que une con una porción intermedia (3) que conecta con una punta (4), donde dicha punta (4) presenta un extremo distal (5) de forma puntiaguda y comprende un agujero pasante (6) con una configuración elíptica que comprende un ancho máximo de 0.6 mm destinado a formar una fina película de medio de vitrificación sobre la cual se depositan los óvulos o embriones a vitrificar por contacto directo con nitrógeno líquido. El dispositivo por su geometría, genera una fuerza tangencial aprovechando las debido a la tensión superficial del líquido para retener y envolver a las células, favoreciendo aún más alcanzar velocidades ultrarrápidas de enfriamiento y calentamiento.

ES 2 713 800 A1

DESCRIPCIÓN

DISPOSITIVO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE UNA MUESTRA DE ÓVULOS Y EMBRIONES POR VITRIFICACIÓN

5

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer un dispositivo para la crioconservación de óvulos y embriones basado en la técnica de vitrificación. Durante la vitrificación, óvulos y embriones se manejan en el seno del medio de vitrificación, cuyo volumen ha de reducirse al máximo para garantizar el éxito de la técnica. Así, el dispositivo presentado, por su geometría, genera una fuerza tangencial sobre la muestra depositada que permite generar una fina película de medio de vitrificación para el almacenamiento de los óvulos o embriones en los biobancos. Asimismo, el dispositivo permite el almacenamiento tanto individual como en grupo, así como la visualización del proceso bajo un microscopio óptico para verificar la deposición y morfología de las células.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 La preservación de óvulos, embriones y tejidos es una técnica requerida en diversos campos. En la medicina reproductiva, desde el nacimiento del primer ser humano concebido a través de la fecundación in vitro en 1978, son más de 6.5 millones de bebés los que han nacido con el uso de las técnicas de reproducción asistida (TRA).

25 En los últimos años, y de la mano de la mejora en la eficacia de la técnica de vitrificación, se ha observado un incremento notable de los ciclos de ART que incluyen la vitrificación, maximizando así la eficacia de los ciclos de estimulación ovárica, al permitir el almacenamiento del exceso de óvulos o embriones para un uso posterior.

30 En el tratamiento de fertilidad humana, tanto los óvulos como los embriones son sometidos a vitrificación y almacenados hasta el momento más apropiado para su trasplante. Entre otras cosas, el uso de la crioconservación permite evitar el denominado endometrio “subóptimo” que se produce tras la aplicación de los tratamientos de estimulación ovárica como consecuencia de los niveles hormonales supra-fisiológicos, mejorando así las tasas de implantación y embarazo. Por todo esto, la crioconservación de embriones humanos es actualmente más importante que nunca para la tasa de embarazo acumulada en los TRA. En ganadería, y más

concretamente en vacuno, anualmente se obtienen más de 900.000 embriones, siendo en su mayor parte comercializados tras su crioconservación. En porcino, y a diferencia del ganado vacuno, hasta el momento no se comercializa ningún dispositivo que permita el uso comercial de embriones. Los soportes de tipo pajueta de diferente diámetro y capacidad, asa o lengüeta han sido ampliamente divulgados en el estado de la técnica. Estos fueron desarrollados con el fin de obtener velocidades ultra rápidas en el intercambio de temperatura que favorecieran la vitrificación de óvulos y embriones. Esto se consiguió minimizando el volumen del medio de vitrificación, pasando del uso clásico de las pajuelas de 250-125 microlitros a volúmenes de 1 microlitro. Así, en 1985, Rall y Fahy lograron por primera vez vitrificar embriones de ratones, convirtiéndose desde entonces la vitrificación en el procedimiento óptimo para la crioconservación de óvulos y embriones. Fue, poco después, cuando el Dr. Arav y sus colegas introdujeron la idea de utilizar la técnica de vitrificación, pero en una pequeña gota que terminarían definiendo cómo el "tamaño mínimo de gota esencial" (Arav, 1989: 1992: 2014; Arav et al., 1987: 2002). Actualmente todos los dispositivos de vitrificación se basan en este concepto (Cobo et al., 2008). Actualmente, y bajo nuestro conocimiento, este mismo concepto es empleado por otros dispositivos comerciales tales como, Cryotop, Cryolock, Cryotech, avalados por el incremento de sus resultados de supervivencia, pero que no emplean la solución técnica de un asa. Asimismo, hasta la fecha los dispositivos conocidos por el solicitante que permiten operar con mínimos volúmenes poseen una capacidad de almacenamiento limitada a un número reducido de óvulos o embriones.

Así, por ejemplo, Mavrides & Morroll mencionan un dispositivo de este tipo fabricado para la criopreservación de óvulos bovinos, describiendo un lazo de 1mm de diámetro con forma circular. Otras modificaciones permiten incrementar el número de células a depositar en el soporte, como ocurre con el dispositivo divulgado por Cardona-Costa y Garcia-Ximenez (si bien el volumen utilizado es de 250 microlitros), o redundan en la reducción de costes de fabricación proporcionando a la vez una mayor facilidad de manejo o etiquetado de la muestra, como se recoge en el modelo de utilidad chino CN205196832U.

Se desconoce un soporte de vitrificación con mínimo volumen esencial en un sistema cerrado que permita además almacenar un número considerable de óvulos y embriones, para uso en especies polítopas cómo porcino o conejo. Además, en los dispositivos existentes hasta la fecha, la reducción del volumen de vitrificación hasta dicho "mínimo volumen esencial" requiere de una capacidad técnica elevada por parte del manipulador.

35

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un dispositivo de fácil uso para la crioconservación de óvulos y embriones mediante vitrificación que, además, aumenta el número de óvulos o embriones que pueden ser almacenados. Es decir, la tensión superficial generada por la solución de vitrificación que contiene a las células al depositarlas en el dispositivo objeto de la patente garantiza un volumen mínimo alrededor de éstas, evitando así la necesidad de hacer más operaciones para eliminar el exceso de solución de vitrificación (por ejemplo, succión directa en una micropipeta, o por contacto con elementos absorbentes). El dispositivo permite además una desvitrificación fácil, confiable y eficiente de las células. Mas concretamente, el dispositivo permite una mínima capa de medio de vitrificación entorno al óvulo y el embrión, aprovechando las fuerzas debidas a la tensión superficial del líquido, para retener y envolver a las células por una mínima capa de medio de vitrificación, favoreciendo aún más alcanzar velocidades ultrarrápidas de enfriamiento y calentamiento, lo que supone una notable mejora técnica frente a las soluciones en el estado de la técnica.

La presente invención consta de un soporte que presenta una única pieza y comprende una porción de sujeción esbelta configurada para sujetar y etiquetar la muestra, la cual con la porción intermedia que conecta con una punta, un extremo distal con forma puntiaguda que comprende un agujero con una configuración elíptica cuyos ejes internos presentan unas medidas de 0.6 mm y 8.8 mm. Ésta geometría es la que permite formar una fina película de medio de vitrificación, donde se incluyen los óvulos o embriones a vitrificar por contacto directo con nitrógeno líquido.

Preferentemente el dispositivo comprende, además, una funda protectora destinada a sellar el soporte herméticamente, protegiendo así la muestra de contaminación microbiológica durante el almacenamiento. El extremo distal con forma puntiaguda del objeto facilita la introducción del soporte en la funda cuando se opera bajo nitrógeno líquido.

El dispositivo aporta como ventaja fundamental la capacidad del soporte de alojar múltiples óvulos y embriones con un mínimo volumen de solución de vitrificación sin necesidad de llevar a cabo operaciones de eliminación del exceso de dicha solución, lo que permite obtener altas velocidades de enfriamiento y de calentamiento. Además, es de fácil manejo y permite realizar un etiquetado sencillo de la muestra en la zona de sujeción.

35

Preferentemente el agujero pasante de configuración elíptica cuyos ejes externos presentan unas medidas de 1.8 mm y 10 mm. El soporte mide longitudinalmente entre 60 y 140 mm, donde la porción intermedia mide aproximadamente el 30-50% de la longitud del soporte y la porción de sujeción esbelta mide aproximadamente entre el 30-40 % de la longitud del soporte.

5

Preferentemente, la porción de sujeción esbelta es rectangular con una relación longitud/ancho de una magnitud 10. El ancho puede ser de 3 mm y el largo de 30 mm. La porción intermedia puede ser troncocónica.

10 Preferentemente el agujero pasante de configuración elíptica en la punta presenta una anchura de 0.6 mm y una longitud de 10 mm, con un recubrimiento por su exterior con un ancho de 1.8 mm, la porción intermedia troncocónica mide 65 mm y la porción de sujeción 30 mm.

Además, el soporte comprende una funda protectora destinada al cierre hermético del dispositivo para evitar su infección/contaminación microbiana y viral durante el almacenamiento. Además, la terminación del soporte en forma de flecha facilita la introducción de la funda protectora bajo el nitrógeno líquido.

El dispositivo es de fácil uso y por su geometría permite que los óvulos y los embriones estén rodeadas por el mínimo volumen (volumen mínimo esencial), lo que contribuye a generar elevadas velocidades para alcanzar el estado vítreo. Esto además conlleva una gran facilidad de uso por parte del manipulador, ya que, una vez depositada la muestra en el soporte, no se requieren pasos adicionales para reducir el volumen de solución crioprotectora. Asimismo, el dispositivo permite el almacenamiento tanto individualizado como de un elevado número de óvulos o embriones. La porción de sujeción del soporte permite un etiquetado con la información relevante de fácil visualización. Además, la geometría de la porción de sujeción garantiza un cierre hermético con la funda protectora. De esta forma, se evita el contacto directo de la muestra biológica con el nitrógeno líquido del biobanco durante su almacenamiento evitando así su potencial contaminación microbiológica/viral.

30

EJEMPLO

El soporte ha sido validado con embriones de conejo, demostrando su funcionalidad tanto en el desarrollo in vitro de éstos, como en el número de animales nacidos. Para ello, se utilizaron 15 hembras donantes que tras recibir un tratamiento de superovulación (3 µg of Corifollitropin alfa) fueron inseminadas artificialmente (AI). A los 3 días, los embriones fueron recuperados y

35

crioconservados mediante vitrificación de acuerdo con el protocolo desarrollado por Vicente et al. (1999), empleando tanto el dispositivo objeto de la patente, como 2 dispositivos comerciales: Cryotop (Kitazato Co., Fuji, Japón) como sistema más ampliamente empleado en humanos y mini-pajuela de 0.125 mL (French ministraw, IMV, L'Aigle, France) como sistema convencional
5 utilizado en conejo. De forma breve, la vitrificación se realizó en dos pasos. En el primer paso, los embriones se depositados en una solución que contiene 12.5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) y 12.5% (v/v) de etilenglicol (EG) como agentes crioprotectores durante 2 minutos. En el segundo paso, los embriones son depositados en una solución que contiene una concentración de crioprotectores de 20% de DMSO y 20% de EG, siendo estos recuperados a
10 los 45 segundos para ser depositados en los dispositivos de vitrificación, y a continuación ser sumergidos directamente en nitrógeno líquido, asegurando que la incubación con la solución de vitrificación no sobrepasa 1 minuto. Después del almacenamiento en los tanques de nitrógeno líquido, los embriones fueron desvitrificados, evaluando el efecto del dispositivo tanto en condiciones in vitro (desarrollo embrionario) como in vivo (individuos nacidos). El medio de vitrificación fue eliminado lavando los embriones en una solución salina fosfatada de
15 Dulbecco's (DPBS) con sacarosa (0.33 M) durante 5 minutos, seguido de un baño en una solución única de DPBS durante otros 5 minutos.

A continuación, se detallan los efectos del dispositivo sobre el desarrollo in vitro durante
20 experimentación. El número de embriones que se cargaron en cada uno de los dispositivos fue de 25 para el dispositivo objeto de la patente, 6 para cada Cryotop® y 25 en cada mini-pajuela. Así, se cultivaron un total de 216 embriones vitrificados (65 dispositivo objeto de la patente, 68 Cryotop® y 61 mini-pajuela) y 22 embriones no vitrificados (control) a través de 7 sesiones experimentales durante 48 h en medio de cultivo TCM199 que contenía suero fetal bovino al
25 10% (vv) (FBS) y 1% (vol / vol) de antibióticos (penicilina G de sodio 300 000 UI / L, penicilina G procaína 700 000 UI / L y dihidrostreptomocina sulfato 1250 mg / L; Divasa Farmavic, Barcelona, España) a 38.5°C y 5% de CO₂ en atmósfera humidificada. La capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto eclosionado fue registrada para el análisis.

A continuación, se detallan los efectos del dispositivo sobre el porcentaje de animales nacidos
30 durante experimentación. Un total de 288 embriones vitrificados (102 dispositivo objeto de la patente, 100 Cryotop® y 86 mini-pajuela) y 96 embriones frescos fueron transferidos a 25 hembras núlparas. Los embriones fueron transferidos vía oviductal mediante laparoscopia (Besenfelder y Brem, 1993). Durante la laparoscopia, las receptoras fueron anestesiadas con
35 una inyección intramuscular de xilazina (5 mg/kg), seguida a los 5 minutos de una inyección intravenosa de clorhidrato de ketamina (35 mg/kg). Durante la laparoscopia, se administró por

vía intramuscular una dosis de clorhidrato de morfina (3 mg/kg). Al finalizar la cirugía, los animales fueron tratados con antibióticos (4 mg/Kg de gentamicina cada 24 h) y analgésicos (0.03 mg/kg de clorhidrato de buprenorfina cada 12 h y 0.2 mg/kg de meloxicam cada 24 h) durante 3 días.

5

Las tasas de desarrollo de embriones hasta la etapa de blastocistos eclosionados tras 48 h de cultivo in vitro fueron similares entre los grupos experimentales (89.2%, 88.2%, 90.9% y 93.4%, para el dispositivo objeto de la patente, Cryotop®, mini-pajuela y grupo control, respectivamente, $P < 0.05$).

10

En cuanto a la tasa de descendencia, ésta fue similar entre los grupos de los dispositivos de vitrificación, pero como cabe esperar, significativamente inferiores al grupo control ($61 \pm 4.8\%$, $65 \pm 4.8\%$, $52 \pm 4.5\%$ vs $74 \pm 5.2\%$, para el dispositivo objeto de la patente, Cryotop®, mini-pajuela vs embriones control, respectivamente, $P < 0.05$).

15

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

20

25

Figura 1.- Muestra una vista en perspectiva del soporte del dispositivo para la criopreservación de una muestra de óvulos o embriones por vitrificación.

Figura 2.- Muestra una vista en perspectiva del soporte y de la funda protectora del dispositivo para la criopreservación de una muestra de óvulos o embriones por vitrificación.

30

Figura.3.- Muestra una vista en detalle de la zona de deposición de las células en la punta del soporte en el agujero pasante de configuración elíptica.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

35

La figura 1 muestra una vista en perspectiva del soporte (2) del dispositivo para la criopreservación de una muestra de óvulos o embriones por vitrificación según una realización

preferente donde se observa claramente que el soporte es de una única pieza de plástico inyectado o impreso en 3D, y que comprende una porción de sujeción (2) esbelta configurada para sujetar y etiquetar la muestra que une con una porción intermedia (3) que conecta con una punta (4).

5

Se muestra, además, que la punta (4) presenta un extremo distal (5) de forma puntiaguda y comprende un agujero pasante (6) que presenta una configuración elíptica que comprende un ancho máximo en uno de sus ejes de 0.6 mm destinado a formar una fina película de medio de vitrificación sobre la cual se depositan los óvulos o embriones a vitrificar por contacto directo con nitrógeno líquido.

10

Según la realización preferente descrita en la figura 2, el agujero pasante (6) de configuración elíptica (4) presenta una longitud de 10 mm, con un recubrimiento (8) exterior con un ancho de 1.8 mm y definiendo también una configuración elíptica. La porción intermedia es troncocónica y mide substancialmente 40 mm. La porción de sujeción (2) esbelta es rectangular y presenta una longitud de 30 mm y un ancho de 3 mm. La longitud total del soporte es de 70 mm.

15

La figura 2 muestra una vista en perspectiva del soporte (1) y de la funda (7) protectora del dispositivo donde se observa que la funda (7) protectora está destinada a alojar el soporte (1) herméticamente y el extremo distal (5) con forma puntiaguda facilita la introducción del soporte en la funda (7) cuando se opera bajo nitrógeno líquido y dicha funda (7) protegiendo además a la muestra de una potencial infección/contaminación microbiana y viral durante su almacenamiento en el biobanco.

20

La figura 3 muestra una vista en detalle de la zona de deposición de los óvulos o embriones en la punta del soporte (1) en el agujero pasante (6) de configuración elíptica, aprovechando la tensión superficial generada por la solución de vitrificación que contiene los óvulos o embriones al depositarlos en el dispositivo, garantizando un volumen mínimo alrededor de éstas y evitando la necesidad de hacer más operaciones para eliminar el exceso de solución de vitrificación (por ejemplo, succión directa en una micropipeta, o por contacto con elementos absorbentes). Además, el dispositivo permite una descongelación fácil, confiable y eficiente de los óvulos y embriones.

25

30

El dispositivo permite una mínima capa de medio de vitrificación en torno al óvulo y el embrión, aprovechando las fuerzas debidas a la tensión superficial del líquido, para retener y envolver a las células por una mínima capa de medio de vitrificación, favoreciendo aún más alcanzar

35

velocidades ultrarrápidas de enfriamiento y calentamiento lo que supone una notable mejora técnica frente a las soluciones en el estado de la técnica.

5 El dispositivo es de fácil uso y por su geometría permite que los óvulos o embriones estén rodeados por el mínimo volumen (volumen mínimo esencial), lo que contribuye a generar elevadas velocidades para alcanzar el estado vítreo. Esto además conlleva una gran facilidad de uso por parte del manipulador, ya que, una vez depositada la muestra en el soporte, no se requieren más pasos para reducir el volumen de solución crioprotectora. Asimismo, el dispositivo permite el almacenamiento tanto individualizado como de un elevado número de 10 óvulos o embriones. En la Figura 2, la porción de sujeción (2) del soporte (1) permite un etiquetado con la información relevante de fácil visualización. Además, la geometría de la porción de sujeción (2) garantiza un cierre hermético con la funda (7) protectora. De esta forma, se evita el contacto directo de la muestra biológica con el nitrógeno del banco de almacenamiento previniendo así una potencial infección/contaminación microbiana y viral 15 durante su almacenamiento en el biobanco. El acabado del dispositivo en forma de puntiaguda en la punta (5) facilita su introducción en la funda cuando se opera bajo inmersión del nitrógeno líquido empleado para la vitrificación.

REIVINDICACIONES

1.- Dispositivo para la criopreservación de una muestra de óvulos o embriones por vitrificación que comprende un soporte (1) que presenta una única pieza y comprende una porción de sujeción (2) esbelta configurada para sujetar y etiquetar la muestra y que une con una porción intermedia (3) que conecta con una punta (4), **caracterizado por que** dicha punta (4) presenta un extremo distal (5) de forma puntiaguda y comprende un agujero pasante (6) con una configuración elíptica que presenta un ancho máximo de 2.5 mm y una longitud máxima de 20 mm destinado a formar una fina película de medio de vitrificación sobre la cual se depositan los óvulos o embriones a vitrificar por contacto directo con nitrógeno líquido.

2.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende una funda (7) protectora destinada a alojar el soporte (1) herméticamente donde el extremo distal (5) con forma puntiaguda facilita la introducción del soporte en la funda (7) cuando se opera bajo nitrógeno líquido y protegiendo dicha funda (7) de una potencial infección/contaminación microbiana y viral de la muestra durante el almacenamiento.

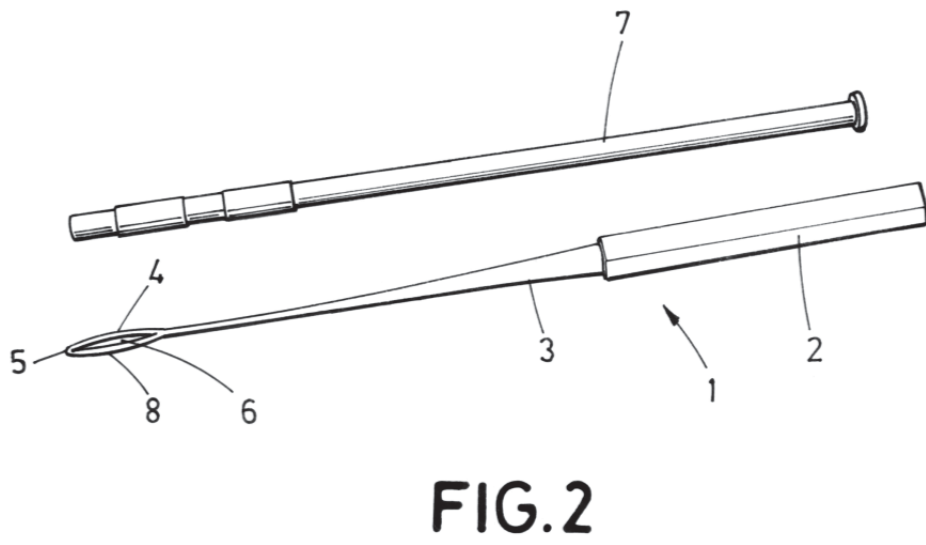
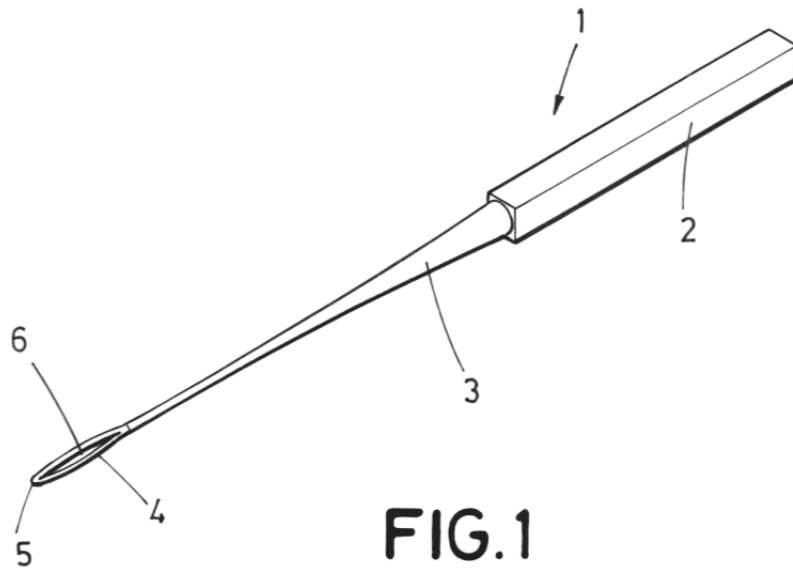
3.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado por que el agujero pasante (6) con configuración elíptica presenta una longitud de 8.8 mm.

4.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 3, caracterizado por que el agujero pasante (6) con configuración elíptica presenta un ancho de 0.6 mm.

5.-Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado por que la punta (4) presenta un recubrimiento del agujero pasante (6) y presenta una configuración elíptica con una anchura máxima de 2.5 mm y una longitud mínima de 20 mm.

6.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado por que la punta (4) presenta un recubrimiento del agujero pasante (6) y presenta una configuración elíptica con una anchura de 1.8 mm y una longitud de 10 mm.

- 7.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado por que el soporte (1) es de material plástico apto para su inyección y/o impresión en 3D.
- 5 8.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado por que el soporte (1) longitudinalmente mide entre 60-140 mm.
- 9.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 8, caracterizado por que la porción intermedia (3) es troncocónica y mide longitudinalmente el 30-
10 50% de la longitud total del soporte.
- 10.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 8, caracterizado por que la porción de sujeción (2) esbelta mide substancialmente el 30-40% de la
15 longitud del soporte.
- 11.- Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado por que la porción de sujeción (2) esbelta es rectangular con una relación longitud/ancho de una magnitud 8-12.
- 20 12. Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, caracterizado porque la porción de sujeción (2) esbelta rectangular comprende un ancho de 3 mm y una longitud de 30 mm.
- 25 13. Dispositivo para la criopreservación de óvulos o embriones según la reivindicación 1, que además permite la criopreservación de espermatozoides y células somáticas.



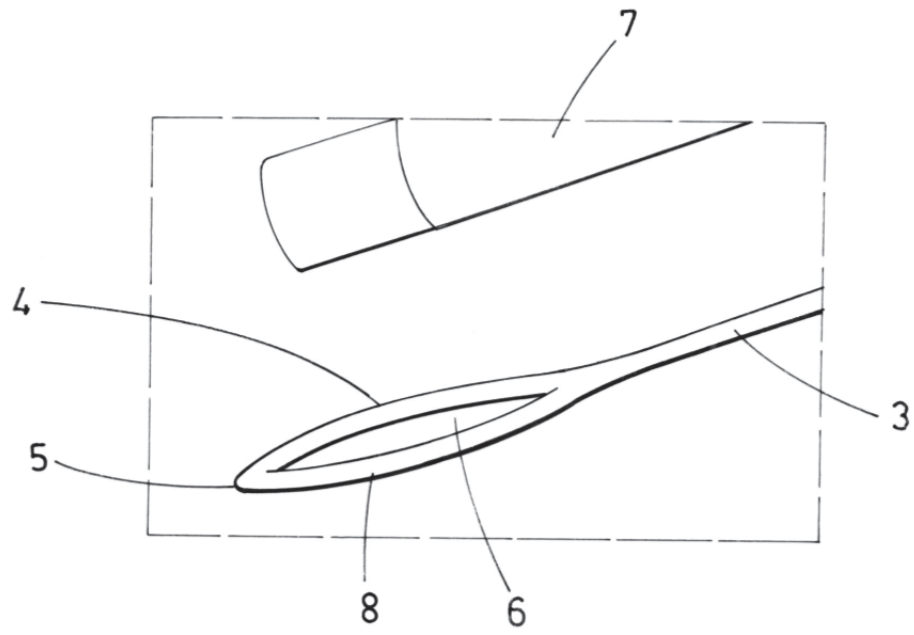


FIG.3a

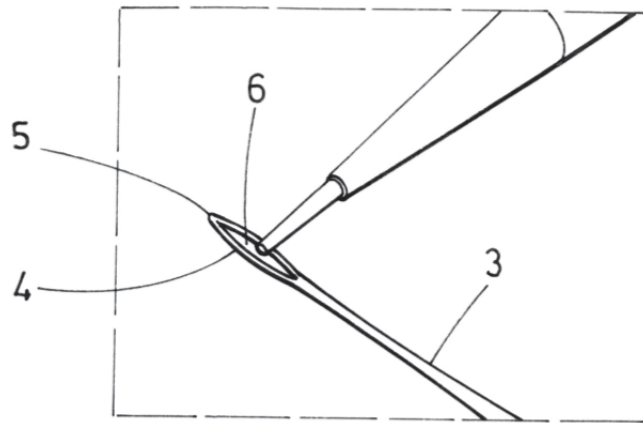


FIG.3b



- ②① N.º solicitud: 201930351
②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.04.2019
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
D,Y	CN 205196832U U (UNIV CHINA AGRICULTURAL) 04/05/2016, especialmente resumen y párrafos 5-26	1-13
D,Y	CARDONA-COSTA J et al. Vitrification of zebrafish embryo blastomeres in microvolumes. CryoLetters JUL-AUG 2007, 30/06/2007, vol. 28, nº 4, páginas. 303-308, especialmente páginas 304-307	1-13
A	MARCO-JIMENEZ FRANCISCO et al. Development of Cheaper Embryo Vitrification Device Using the Minimum Volume Method. PLoS One FEB 5 2016, 31/01/2016, Vol. 11, Nº 2, Article No.: e0148661, <DOI: doi:10.1371/journal.pone.0148661>, especialmente resumen y página 3.	1-13
A	ES 2212641T T3 (FOREST KATRINA T et al.) 16/07/2004, Especialmente páginas 5-19.	1-13
D,A	MAVRIDES ANDREAS et al. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. Reproduction, nutrition, development France, 31/12/2001, vol. 42, nº 1, págs. 73 - 80, <DOI: pubmed:12199378>, especialmente página 74.	1-13

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

D: citados por el solicitante en la descripción de la solicitud
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.05.2019

Examinador
J. Collado Martínez

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N5/073 (2010.01)

C12N5/075 (2010.01)

A01N1/02 (2006.01)

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

C12N, A01N

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

EPODOC, INVENES, WPI, TXPCN, TXPSPJ, TXPSPK, TXPUS, TXPFA, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR