

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 825**

51 Int. Cl.:

A61B 17/425 (2006.01)

C12M 3/00 (2006.01)

A61D 19/02 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2013** **PCT/US2013/036801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013** **WO13158658**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2013** **E 13778930 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 2838987**

54 Título: **Sistema de fertilización asistida por inyección de espermia intracitoplasmática automatizada**

30 Prioridad:

16.04.2012 US 201261624490 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2019

73 Titular/es:

CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Cornell Center for Technology Enterprise &
Commercialization, 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US

72 Inventor/es:

PALERMO, GIANPIERO D.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 725 825 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

Sistema de fertilización asistida por inyección de espermatozoides intracitoplasmática automatizada

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 61/624.490, presentada el 16 de abril de 2012.

10 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a un dispositivo y sistema que usa una plataforma de microfluidos para la reproducción asistida. Más específicamente, la invención se refiere a un sistema de fertilización automatizado integrado que comprende un casete de dispositivo microfluídico para la extracción in vitro de cumulus de ovocitos, la maduración de ovocitos, la selección de espermatozoides y la inyección intracitoplasmática, y la fertilización in vitro y el cultivo y desarrollo de embriones. También se describen sus métodos de uso.

Antecedentes de la invención

20 En la década de los '70, la introducción de procedimientos in vitro permitió la creación del embrión humano fuera del cuerpo destinado al tratamiento de parejas con infertilidad por factor tubárico. Los primeros éxitos logrados con las tecnologías de reproducción asistida (ART), aunque modestas, motivaron la ambición de mejorar la eficiencia por un lado y de extender el tratamiento a otras indicaciones de infertilidad. Fue este intenso esfuerzo por abordar el fracaso de la fertilización que afectó a los ciclos de fertilización asistida temprana lo que trajo el desarrollo de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en 1992. Este procedimiento in vitro ha permitido a los médicos identificar los pasos iniciales involucrados en la interacción de los gametos de los padres.

La fiabilidad de las prácticas de inyección de espermatozoides en términos de tasas de fertilización altas y constantes ha permitido la aplicación generosa en todo el mundo de este método de inseminación de gametos. La ICSI ahora se lleva a cabo en al menos 53 países y actualmente ha generado cerca de 2 millones de bebés. Lamentablemente, esta utilización popular no se ha visto acompañada por una mayor asequibilidad ni por un mejor acceso a través de los seguros de salud. Además, la inconsistencia del resultado para los datos informados de diferentes países requeriría una mejor estandarización con un mejor control de calidad. Sin embargo, aunque la ICSI se desarrolló como un tratamiento para la infertilidad masculina, se ha convertido en el método preferido de inseminación que se realiza en grandes centros a una tasa superior al 70 %. Por lo tanto, es deseable el desarrollo de un sistema automatizado para que la ICSI se convierta en el único método de inseminación in vitro.

Cho et al. han descrito un sistema de bombeo por gravedad para clasificar las muestras de espermatozoides (Cho et al. 2003, Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm, Anal Chem. 75 (7): 1671-1675). El dispositivo, denominado clasificador de espermatozoides integrado en microescala (MISS), contiene puertos de entrada/salida, depósitos de fluidos, fuentes de energía impulsadas por gravedad y microcanales convergentes con flujo laminar, todos los componentes integrados trabajan juntos para facilitar la clasificación de espermatozoides. Este dispositivo fue diseñado para que un flujo convergente de semen y medios fluyera en paralelo, de manera laminar dentro de un microcanal. Las dos corrientes paralelas sólo se mezclan por difusión en la interfaz entre las corrientes, pero los espermatozoides móviles pueden nadar a través de la línea de corriente de contacto y en el medio para su recolección. El espermatozoides no móvil, los desechos celulares y el plasma seminal no cruzan esta barrera y son transportados a un depósito de desechos.

Suh et al. han descrito los esfuerzos iniciales para crear algunos componentes microfluídicos, como la selección de espermatozoides, el manejo de ovocitos, la microinseminación (pero no ICSI) y la manipulación y cultivo de embriones, así como la necesidad y los beneficios de los sistemas integrados (Suh et al. 2003, Rethinking gamete/embryo isolation and culture with microfluidics, Hum Reprod Update. 9 (5): 451-61; Suh et al. 2005, Microfluidic Applications Andrology, J Androl. 26(6):664-70).

Smith et al. han proporcionado una revisión en 2011 que analiza la selección de espermatozoides y especula sobre la microinseminación de ovocitos de ratón y el cultivo de embriones (Smith et al. 2011, Microfluidics for gametes, embryos, and embryonic stem cells, Semin Reprod Med. 29 (1): 5-14). Smith es cofundador de la compañía de dispositivos médicos Incept BioSystems™, que utiliza su "Sistema para la Tecnología de Reproducción Asistida por Microfluidos (SMART)" para crear sistemas de FIV microfluídicos. Su primer producto es un dispositivo para el cultivo de embriones.

Unisense FertiTech A/S comercializa una incubadora de embriones automatizada que incorpora un entorno de incubación completamente estable con respiración integrada y adquisición de imágenes de lapso de tiempo; este último permite la valoración embrionaria (Raty et al. 2004, Lab on a Chip, 4: 186-190).

5

Lu et al. han descrito un chip desechable colocado en un microscopio donde los espermatozoides y los ovocitos se colocan en 2 cámaras separadas; se selecciona un espermatozoide y se realiza una ICSI robotizada en todos los ovocitos ejecutados por un operador humano (Lu et al. 2011, Robotic ICSI, IEEE Trans Biomed Eng, 58: 2102-2108). Adamo y Jensen también demostraron pruebas de concepto para la microinyección de un tinte fluorescente en una sola célula (Adamo y Jensen 2008, Lab on a Chip, 8: 1258-1261).

10

Meseguer et al. Han descrito la mecanización en laboratorio de fertilización total por in vitro: hacia la reproducción asistida por robot (Fertility and Sterility, vol. 97, no. 6, páginas 1277 - 1286).

15

El documento WO 03/014291 describe aparatos y métodos para detectar al menos un analito de interés producido o consumido por una pluralidad de células. En una realización de la presente invención, el método incluye las etapas de proporcionar un alojamiento que define una cámara, colocar una pluralidad de células en la cámara y detectar simultáneamente al menos dos analitos de interés producidos o consumidos por la pluralidad de células en el cámara.

20

Los dispositivos descritos en la técnica anterior realizan diferentes aspectos de la inseminación in vitro que van desde la preparación de espermatozoides y ovocitos hasta la inseminación real seguida por el cultivo de embriones. Aunque la técnica anterior mencionada anteriormente describe los esfuerzos para generar componentes de un sistema automatizado completo, no se ha creado tal sistema.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un sistema automatizado integrado para realizar la fertilización asistida utilizando ICSI a partir de la extracción de cumulus de ovocitos, la selección e inmovilización de espermatozoides, la inyección de ICSI y el cultivo y selección de embriones. Este sistema automatizado proporciona una distribución generalizada de la inseminación in vitro al favorecer la asequibilidad.

30

Las reivindicaciones, adjuntas al presente documento, se refieren, en una primera realización, a un dispositivo de casete de microfluidos incluido para la fertilización asistida por inyección de esperma intracitoplasmático; y, en una segunda realización, a un sistema para la fertilización intracitoplasmática automatizada por inyección asistida. También se describe un método para la fertilización intracitoplasmática automatizada con fertilización asistida por inyección, con la condición de que tanto el espermatozoide como el ovocito no sean humanos.

35

En una realización, la invención proporciona un dispositivo de casete de microfluidos incluido para la fertilización intracitoplasmática asistida por inyección que comprende: a) un reserva de ovocitos que comprende una cámara de ovocitos, una entrada y una salida; b) un canal de extracción de cumulus de ovocitos en comunicación de fluido selectivo con la salida de la reserva de ovocitos; c) una estación de inmovilización de ovocitos en comunicación fluida selectiva con el canal de extracción de cumulus de ovocitos; d) una reserva de espermatozoides que comprende una cámara de espermatozoides, una entrada y una salida; e) un canal de aislamiento de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de espermatozoides; f) una estación de inmovilización de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con el canal de aislamiento de espermatozoides móviles y en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; y g) una cámara de cultivo de embriones en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; donde la comunicación fluida selectiva está controlada por una o más puertas piezoeléctricas que comprenden módulos de nanoelectrodos, y donde el canal de eliminación de cumulus de ovocitos comprende una o más puertas piezoeléctricas configuradas para facilitar la eliminación de células cumulus.

50

En ciertas realizaciones, una parte corriente abajo del canal de extracción de cumulus de ovocitos del dispositivo de casete de microfluidos incluido puede tener un ancho más estrecho que la cámara de ovocitos que permite la progresión individual de ovocitos. En ciertas realizaciones, una parte del canal de extracción de cumulus de ovocitos tiene una anchura de aproximadamente 200 µm. En otras realizaciones, el canal de eliminación de cumulus de ovocitos tiene una o más vueltas de 90° que permiten la rotación de un ovocito para eliminar células de cumulus. En ciertas realizaciones, el canal de eliminación de cumulus de ovocitos del dispositivo de casete microfluídico incluido tiene una salida de residuos de cumulus con válvula en comunicación de fluido selectivo con el mismo.

55

En ciertas realizaciones, el canal de aislamiento de espermatozoides móviles en el dispositivo de casete microfluídico

60

incluido de la invención tiene una salida de espermatozoides no móvil o cámara de retención en comunicación de fluido selectiva con el mismo. En otras realizaciones, la estación de inmovilización de espermatozoides móviles comprende un sistema de inyección de esperma intracitoplasmática.

- 5 En otras realizaciones, el dispositivo de casete microfluido incluido también comprende una pluralidad de reservas de ovocitos corriente arriba en comunicación fluida selectiva corriente abajo con una pluralidad de canales de eliminación de cumulus de ovocitos que, a su vez, están en comunicación fluida selectiva corriente abajo con la estación de inmovilización de ovocitos. En ciertas realizaciones, el dispositivo de casete de microfluidos incluido comprende además una pluralidad de cámaras de cultivo de embriones corriente abajo en comunicación fluida
10 selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos.

La comunicación fluida selectiva en cada componente del dispositivo de casete de microfluidos incluido está controlada por una o más puertas piezoeléctricas que comprenden módulos de nanoelectrodos. En ciertas realizaciones, se incluyen una o más estaciones de observación para monitorear y evaluar ovocitos, espermatozoides y embriones en
15 cada canal, reserva, cámara, entrada, salida, estación o componente en el dispositivo de casete de microfluidos incluido.

La invención proporciona, además, un sistema para la fertilización asistida intracitoplasmática automatizada por inyección de esperma (ICSI) que comprende el dispositivo de casete de microfluidos incluido en la invención y una
20 máquina para activar funcionalmente el dispositivo de casete de microfluidos que comprende una unidad central de procesamiento (CPU) y un software para monitoreo y control automatizados del proceso ICSI, incluida la comunicación selectiva entre canales conectados, cámaras, reservas, entradas, salidas, para la progresión de los microfluidos, ovocitos, eliminación de cumulus de ovocitos, selección e inmovilización de ovocitos, aislamiento de espermatozoides móviles, inmovilización de espermatozoides móviles, inyección de espermatozoides intracitoplasmática y cultivo de
25 embriones.

En ciertas realizaciones, la máquina del sistema automatizado de la invención para la fertilización asistida por inyección de esperma intracitoplasmática comprende, además, una pluralidad de cámaras de vídeo digitales y monitores de vídeo remotos asociados conectados a la CPU. En ciertas realizaciones, la CPU y el software relacionado controlan
30 automáticamente la temperatura y la presión interna del dispositivo y la adición de medios celulares, como a través de la entrada de la reserva de ovocitos, la entrada de la reserva de espermatozoides o la cámara de desarrollo de embriones.

En algunas realizaciones, la máquina del sistema automatizado de la invención para la fertilización asistida por inyección intracitoplasmática de espermatozoides controla la estación de inmovilización de ovocitos creando una
35 presión negativa a través de un microcanal en la estación de inmovilización de ovocitos. En algunas realizaciones, la máquina del sistema automatizado de la invención para la fertilización asistida por inyección intracitoplasmática de esperma controla la inyección intracitoplasmática de esperma aplicando un campo eléctrico de una pipeta piezoeléctrica para penetrar en el ovocito y luego aplicando presión microfluídica dentro de la pipeta piezoeléctrica
40 para posicionar el espermatozoide en el ovocito.

También se describe un método para la fertilización automatizada por inyección de esperma intracitoplasmática que comprende: combinar un espermatozoide y un ovocito en un dispositivo de casete de microfluidos de trayectoria continua acoplado a la máquina para su funcionamiento dentro del sistema descrito, con la condición de que tanto el
45 espermatozoide como el ovocito sean no humanos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra un esquema de una realización de la invención en una vista desde arriba, que comprende cámaras de espermatozoides y ovocitos, un dispositivo piezoeléctrico, una región en la que el complejo cúmulo-ovocito está decoronado y se eliminan las células del cúmulo; una región en la que se desmoviliza el ovocito (una configuración del canal de vacío para dicha desmovilización) y se inyecta el esperma, y una cámara de monitoreo y desarrollo de embriones. Además, se muestra una pipeta para inyectar el esperma; un dispositivo láser de inmovilización de esperma; y un dispositivo láser de captura y posicionamiento de esperma.
50
55

La Figura 2 muestra el sistema de la Figura 1 en vista ortogonal.

La Figura 3 muestra un esquema de una realización de la invención en una vista desde arriba, que comprende cámaras de espermatozoides y ovocitos, un dispositivo piezoeléctrico, una cámara en la que el complejo cúmulo-ovocito está decoronado y las células del cúmulo se eliminan, con salida a una cámara de desechos; una configuración y región
60

en la que se desmoviliza el ovocito y se inyecta el esperma, y una cámara de monitoreo y desarrollo de embriones. Además, se muestra un sistema de configuración y válvulas para permitir que los ovocitos fertilizados se muevan a la cámara de monitoreo y desarrollo del embrión. Además, se muestra una pipeta para inyectar el esperma; un dispositivo láser de inmovilización de esperma; y un dispositivo láser de captura y posicionamiento de esperma.

5

La Figura 4 muestra una vista ortogonal de una realización del sistema, que comprende cámaras de espermatozoides y complejos de ovocitos de cúmulo, un dispositivo piezoeléctrico, una cámara en la que el complejo de cumulus-ovocitos está decoronado y se eliminan las células de los cumulus, con salida a una cámara de desechos; una cámara de residuos una configuración y región en la que el ovocito se desmoviliza y el esperma se inyecta; un dispositivo de succión para inmovilizar el ovocito; y una cámara de control y desarrollo de embriones. También se muestra un dispositivo láser de inmovilización de esperma y un dispositivo láser de captura y posicionamiento de esperma. Además, se muestra una pipeta para inyectar el esperma; un dispositivo láser de inmovilización de esperma; y un dispositivo láser de captura y posicionamiento de esperma.

10

15 La Figura 5 es una vista desde arriba de una realización del sistema, que comprende cámaras de esperma y complejos de ovocitos de cúmulo, una cámara de denudación de tres válvulas con un canal de desechos y un canal para agregar y eliminar medios; un dispositivo piezoeléctrico; una configuración y región en la que el ovocito se desmoviliza y el esperma se inyecta; un dispositivo de succión para inmovilizar el ovocito; y una cámara de control y desarrollo de embriones. También se muestra una pipeta para inyectar esperma y un dispositivo láser de inmovilización de esperma y un dispositivo láser de captura y posicionamiento de esperma. También se representan dos electrodos (círculos que contienen una X).

20

La Figura 6 es una vista ortogonal de una realización del sistema que se muestra en la Figura 5. Más notable desde esta perspectiva es el componente de inmovilización y alineación de los espermatozoides asistido por láser, que se facilita mediante dispositivos de emisión de luz a lo largo de la longitud de la pipeta de inyección antes de la inyección.

25

La Figura 7 ilustra la extracción de cumulus. En esta cámara, la hialuronidasa se enjuaga para iniciar la eliminación de las células del cúmulo del huevo. La forma de embudo de la cámara de salida de ancho ~200 µm permitirá la progresión individual de las células del huevo. La progresión a través del canal es ejecutada por flujo microfluídico.

30

La Figura 8 ilustra la cámara de extracción de células del cúmulo secundario. En esta sección, las compuertas piezoeléctricas se utilizan para crear una cámara aislada en la que la finalización de la eliminación de la celda del cúmulo se realiza mediante succión. Los módulos de nanoelectrodos incorporados en el PDMS inducen un estrechamiento/cierre del canal. La progresión a través del canal es sostenida por flujo microfluídico.

35

La Figura 9 ilustra la evaluación de la maduración del huevo. En esta sección se evalúa la madurez de los ovocitos a través de un vídeo. La cámara conectada a un procesador de ordenador y el software está equipado con un sistema de reconocimiento de morfología que puede distinguir si las células llevan un cuerpo polar o no. Este sistema, posteriormente, envía una señal al software que controla la selección. La retención en el lugar y la orientación del huevo se logra a través de un par de electrodos que están contrapuestos dentro de la pared del canal y permitirán el suministro de corriente alterna. La asignación a la cámara inmadura o la progresión a la sección de inyección está modulada por el movimiento fluídico.

40

La Figura 10 ilustra la selección de esperma. La selección de esperma se obtiene a través de un sistema de bombeo por gravedad. La muestra se carga en la cámara A, y los medios de comunicación frescos se colocan en la cámara B. Solo el esperma móvil puede cruzar la interfaz de la corriente de flujo laminar y salir a la cámara C. El esperma inmóvil, los residuos y algún esperma inmóvil se recogen en la cámara D.

45

La Figura 11 ilustra la inyección de ICSI. El ovocito MII movido por el flujo microfluídico se inmoviliza por vacío mediante un microcanal lateral. La inyección de la única célula espermática se logra con una pipeta piezoeléctrica aplicando primero un campo eléctrico para penetrar en el ovocito y, posteriormente, una presión de flujo dentro de la microherramienta para colocar el esperma en el ovocito. Se utiliza un sistema de cámara para controlar la inyección de principio a fin. El ovocito se recupera por presión de succión mecánica. La progresión del ovocito inyectado a través del microcanal es por flujo microfluídico.

50

La Figura 12 ilustra el cultivo del embrión. Después de la inyección, los ovocitos se mueven al extremo del microcanal a través del flujo microfluídico y se asignan a las secciones del canal. Se utiliza un sistema de cámara para evaluar su desarrollo hasta el momento en que se seleccionará y se usará para la transferencia.

55

La Figura 13 ilustra todo el sistema de chip de casete microfluídico que comprende el compartimiento inferior para las

60

cámaras de extracción del cumulus de ovocitos, el compartimento central para la evaluación de la maduración de los ovocitos, el compartimento izquierdo para la selección de esperma, la inyección ICSI y un compartimento superior para el cultivo de embriones.

5 La Figura 14 ilustra el compartimento para cámaras y puertas de eliminación del cumulus de ovocitos.

La Figura 15 ilustra el compartimento para la selección de esperma, la inmovilización, la inyección de ICSI y el cultivo de embriones.

10 La Figura 16 ilustra la asignación de ovocitos individuales para la eliminación de cumulus secundarios a través de múltiples microcanales o microcámaras con puertas.

La Figura 17 ilustra el monitoreo y la evaluación de embriones individuales a través de múltiples microcanales o cámaras.

15

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción, se puede hacer referencia a los dibujos adjuntos que forman parte del presente documento, y en los que se muestran a modo de ilustración realizaciones específicas que pueden ponerse en práctica. Estas realizaciones se describen en detalle para permitir a los expertos en la técnica practicar la invención, y debe entenderse que pueden utilizarse otras realizaciones y que pueden realizarse cambios lógicos sin apartarse del alcance de la presente invención. Por lo tanto, la siguiente descripción de las realizaciones de ejemplo no debe tomarse en un sentido limitado, y el alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

20 25 El Resumen se proporciona para cumplir con 37 CFR §1.72 (b) para permitir al lector determinar rápidamente la naturaleza y la esencia de la descripción técnica. El resumen se presenta en el entendimiento de que no se utilizará para interpretar ni limitar el alcance o significado de las reivindicaciones.

La invención proporciona un sistema automatizado microfluídico ICSI que proporciona una configuración de fertilización asistida completa desde la preparación de esperma hasta el cultivo de los embriones. Este sistema automatizado proporciona una distribución generalizada de la inseminación in vitro al favorecer la asequibilidad. Ciertas realizaciones de la invención incluyen, pero no sin limitación, características de una cámara de lavado de ovocitos COC-MII para facilitar la decoronización y eliminación de células de cumulus; inmovilización y alineación de gametos asistida por láser junto con un sistema de inyección automatizado y una alineación celular facilitada por corriente eléctrica.

En una realización, la invención proporciona un dispositivo de casete de microfluidos incluido para la fertilización intracitoplasmática asistida por inyección que comprende: a) una reserva de ovocitos que comprende una cámara de ovocitos, una entrada y una salida; b) un canal de extracción de cumulus de ovocitos en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de ovocitos; c) una estación de inmovilización de ovocitos en comunicación fluida selectiva con el canal de extracción de cumulus de ovocitos; d) una reserva de espermatozoides que comprende una cámara de espermatozoides, una entrada y una salida; e) un canal de aislamiento de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de espermatozoides; f) una estación de inmovilización de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con el canal de aislamiento de espermatozoides móviles y en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; y g) una cámara de cultivo de embriones en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; donde la comunicación fluida selectiva está controlada por una o más puertas piezoeléctricas que comprenden módulos de nanoelectrodos, y donde el canal de eliminación de cumulus de ovocitos comprende una o más puertas piezoeléctricas configuradas para facilitar la eliminación de células cumulus.

50

Para facilitar la comprensión de la presente invención, se define una serie de términos a continuación. Como se usa en este documento, "un" o "una" significa uno o más de uno, dependiendo del contexto en el que se usó.

Tal como se usa en el presente documento, los microfluidos abordan el comportamiento, el control específico y la manipulación de los volúmenes de microlitro y nanolitro de fluido. Los sistemas microfluídicos están diseñados para un flujo unidireccional de ovocitos, embriones, espermatozoides, medios y componentes medios en varias estrategias discretas del proceso ICSI. Ejemplos no limitados ilustrativos de dispositivos microfluídicos y los materiales y técnicas utilizados para la construcción de componentes de los dispositivos microfluídicos se describen, por ejemplo, Smith et al., 2011, Microfluidic for Gametes, Embryos, and Embryonic Stem Cells, Semin Reprod Med 29(1):5-14; y documento US 2013/0034906 de Smith et al.

60

Tal como se usa en el presente documento, el término "ovocito" se refiere a un gametocito femenino, gameto femenino, célula germinal involucrada en la reproducción, un óvulo inmaduro o célula de huevo. Los espermatozoides preferidos para usar en la invención son de mamíferos, que incluyen, pero sin limitación, de humanos, ganado (que incluye, pero sin limitación, bovinos, porcinos y ovinos) y animales de compañía (que incluyen, pero sin limitación, caninos y felinos).

Como se usa en el presente documento, la expresión "célula cumulus" se refiere a una célula en los folículos ováricos en desarrollo que está en proximidad directa o cercana de un ovocito. Las células del cúmulo son células de la granulosa que rodean al ovocito tanto en el folículo ovárico como después de la ovulación. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "complejo cúmulo-ovocito" se refiere a al menos un ovocito y al menos una célula de cúmulo en asociación física entre sí.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "maduración de ovocitos" se refiere a eventos bioquímicos que preparan un ovocito para la fertilización. Dichos procesos pueden incluir, entre otros, la finalización de la meiosis II. La expresión "maduración nuclear del ovocito" se refiere específicamente a dicha terminación de la meiosis II. La expresión "maduración citoplásmica del ovocito" se refiere específicamente a los eventos citoplasmáticos que ocurren para inculcar en el ovocito una capacidad para completar la maduración nuclear, la inseminación y/o la embriogénesis temprana. Los eventos de maduración citoplásmica de los ovocitos pueden incluir, entre otros, la acumulación de ARNm, proteínas, sustratos y nutrientes que se requieren para lograr la competencia de desarrollo de ovocitos que fomenta la competencia del desarrollo embrionario.

Como se usa en el presente documento, el término "esperma" o "espermatozoide" se refiere a un gameto reproductivo masculino o gametocito masculino. Una célula espermática uniflagelar que es móvil también se conoce como un espermatozoide, mientras que una célula espermática no móvil también se conoce como un espermatozoide. Los espermatozoides preferidos para usar en la invención son de mamíferos, que incluyen, pero sin limitación, de humanos, ganado (que incluye, pero sin limitación, bovinos, porcinos y ovinos) y animales de compañía (que incluyen, pero sin limitación, caninos y felinos).

Como se usa en el presente documento, el término "embrión" se refiere a un ovocito fertilizado con esperma. Un embrión es un eucariota diploide multicelular en su etapa más temprana de desarrollo, desde el momento de la primera división celular hasta el nacimiento o la germinación. En los organismos que se reproducen sexualmente, una vez que un espermatozoide fertiliza una célula de óvulo u ovocito, la célula resultante se llama cigoto, que posee la mitad del ADN de cada uno de sus dos padres. El cigoto comenzará a dividirse por mitosis para producir un organismo multicelular llamado embrión.

Como se usa en el presente documento, el término "célula" se refiere a cualquier célula eucariota, incluidas las células de mamíferos, células aviares, células de anfibios, células vegetales, células de peces y células de insectos, ya sea que se encuentren in vitro o in vivo. Como se usa en este documento, la expresión "cultivo celular" se refiere a cualquier población de células in vitro. Se incluyen dentro de este término líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas) y cualquier otra población celular mantenida in vitro.

Como se usa en este documento, la expresión "in vitro" se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que ocurren dentro de un ambiente artificial. Los entornos in vitro pueden consistir, pero sin limitación, en tubos de ensayo y cultivo celular. La expresión "in vivo" se refiere al ambiente natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a los procesos o reacciones que ocurren dentro de un ambiente natural.

Como se usa en este documento, la expresión "medio" o "medio fluido" se refiere a cualquier fluido dentro de un sistema. En algunas realizaciones, el medio o medio fluido es compatible con el cultivo celular (por ejemplo, apoya la viabilidad celular; apoya el crecimiento celular; apoya el desarrollo celular; no causa toxicidad ni letalidad a una célula).

Tal como se usa en el presente documento, el término "canal", "microcanal", "cámara", "microcámara" y "depósito" se pueden usar indistintamente, y se refieren a una vía o contenedor microfluídico estructural. En algunas realizaciones, un canal puede comprender una protuberancia tridimensional en la superficie de un material. En algunas realizaciones, un canal tiene forma alargada (por ejemplo, prisma rectangular). El canal es capaz de contener o transmitir fluidos que contienen células u otros componentes biológicos. Como se usa en el presente documento, la expresión "flujo dinámico" se refiere a un estado en un sistema de fluidos donde los fluidos experimentan un movimiento cinético a través del sistema.

Como se usa en este documento, la expresión "comunicación selectiva de fluidos" significa que existe una vía de

fluidos entre dos estructuras de referencia para el paso de materiales (es decir, células en un medio fluido), el pasaje a través del cual puede abrirse, estrecharse, ampliarse o cerrarse selectivamente por un operador o un algoritmo automatizado controlado por una CPU y un software. La comunicación fluida selectiva de un canal microfluídico (o entre canales, reservas, cámaras, estaciones, etc.) se puede lograr a través de sistemas conocidos y desarrollados posteriormente, que incluyen compuertas piezoeléctricas, abrazaderas físicas, campos eléctricos y generación de presión fluidica.

Como se usa en este documento, "cerrado" significa un sistema microfluídico que está contenido de forma hermética y continua, aunque varias entradas y salidas sellables pueden disponerse a lo largo de la vía, y oclusiones temporales, como las creadas por puertas piezoeléctricas, pueden impedir selectivamente el flujo de fluido entre las etapas, como se describe aquí.

La invención proporciona un dispositivo de casete de microfluidos incluido para la fertilización asistida por inyección de espermatozoides intracitoplasmática que comprende uno o más canales de eliminación de cumulus y cámara de ovocitos. En ciertas realizaciones, una parte del canal de extracción de cumulus de ovocitos del dispositivo de casete de microfluidos incluido tiene un ancho más estrecho que la cámara de ovocitos que permite la progresión individual de los ovocitos. En ciertas realizaciones, la parte del canal de extracción de cumulus de ovocitos tiene una anchura de aproximadamente 200 μm . En otras realizaciones, el canal de eliminación de cumulus de ovocitos tiene al menos una vuelta de 90° que permite la rotación de un ovocito para eliminar células de cumulus. En ciertas realizaciones, el canal de eliminación de cumulus de ovocitos del dispositivo de casete microfluídico incluido tiene una salida de residuos en comunicación de fluido selectivo con el mismo. En ciertas realizaciones, el dispositivo de casete microfluídico incluido también comprende una pluralidad de depósitos de ovocitos en comunicación fluida selectiva con una pluralidad de canales de extracción de cumulus de ovocitos en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos. En ciertas realizaciones, el dispositivo de casete de microfluidos incluido comprende además una pluralidad de cámaras de cultivo de embriones en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos.

La invención proporciona un dispositivo de casete de microfluidos incluido para la fertilización asistida por inyección de esperma intracitoplasmática que comprende una reserva de espermatozoides que comprende una cámara de espermatozoides, una entrada y una salida; un canal de aislamiento de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de esperma; y una estación de inmovilización de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con el canal de aislamiento de espermatozoides móviles y en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos. En ciertas realizaciones, el canal de aislamiento de espermatozoides móviles en el dispositivo de casete de microfluidos incluido de la invención tiene una salida de espermatozoides inmóviles (o no móviles) en comunicación fluida selectiva con el mismo. En otras realizaciones, la estación de inmovilización de espermatozoides móviles comprende un sistema de inyección de esperma intracitoplasmática.

El dispositivo microfluídico de la invención se puede diseñar como un casete de productos biológicos desechables, y se puede construir de cualquier material adecuado, ahora conocido y desarrollado más adelante en la técnica. En ciertas realizaciones, el dispositivo microfluídico de la invención puede fabricarse con un polímero de organosilicio polimérico inerte tal como el poli(dimetilsiloxano) (PDMS) donde las técnicas de estratificación/rotación de composiciones pueden forjar túneles y cámaras celulares. Se pueden utilizar técnicas fotolitográficas suaves para imprimir las cámaras necesarias directamente en el chip. Los materiales de manejo de fluidos pueden ser no tóxicos, aislantes y permeables a los gases. El PDMS permite una fidelidad submicrométrica con el moldeado, se cura a bajas temperaturas y puede sellarse fácilmente. Los sistemas de válvulas necesarios para crear la separación de la cámara pueden ser membranas manipuladas por características neumáticas, con los canales de aire perforados en la matriz de PDMS.

En ciertas realizaciones, los fluidos se suministran o se eliminan del dispositivo mediante cualquier método adecuado. Los fluidos pueden ser suministrados o eliminados, por ejemplo, mediante jeringas o unidos a microtubos o unidos a los canales de entrada, etc. Los espermatozoides y los ovocitos pueden suministrarse al dispositivo a través de canales de entrada u otras aberturas de puertos que se pueden volver a sellar, por ejemplo.

El flujo de fluidos se puede establecer por cualquier método adecuado. Por ejemplo, hay disponibles bombas externas adecuadas para bombear pequeñas cantidades de líquidos. Las bombas también se pueden proporcionar en el propio dispositivo, impulsadas por gradientes térmicos, campos magnéticos y/o eléctricos, presión aplicada, etc. Todos estos dispositivos son conocidos por los expertos en la técnica. La integración de sistemas de bombeo pasivos y canales de microfluidos se describe por Weigl et al., Proceedings of MicroTAS 2000, Enshede, Netherlands, pp. 299-302 (2000).

En otras realizaciones, el flujo de fluido se establece mediante una bomba de flujo por gravedad, por acción capilar o por combinaciones de estos métodos. Una bomba de flujo por gravedad simple consiste en un depósito de fluido, ya sea externo o interno al dispositivo, que contiene líquido a un nivel más alto (con respecto a la gravedad) que la salida del dispositivo correspondiente. Dichas bombas de gravedad tienen la deficiencia de que la cabeza hidrostática, y por lo tanto la velocidad de flujo, varía a medida que cae la altura del líquido en la reserva. Para muchos dispositivos, se desea un flujo relativamente constante y no pulsátil.

Se puede usar una bomba de gravedad como se describe en la publicación PCT publicada N.º WO 03/008102. En tales dispositivos, se utiliza una reserva horizontal donde el fluido se mueve en forma horizontal, evitando que se colapse verticalmente en la reserva por la tensión superficial y las fuerzas capilares entre el líquido y las paredes del depósito. Dado que la altura del líquido permanece constante, no hay variación en la cabeza hidrostática.

El flujo también puede ser inducido por la acción capilar. En tal caso, el fluido en el canal o depósito de salida respectivo exhibirá mayores fuerzas capilares con respecto a su canal o paredes de la reserva en comparación con las fuerzas capilares en el dispositivo asociado. Esta diferencia en la fuerza capilar puede ser provocada por varios métodos. Por ejemplo, las paredes de los canales de salida y de entrada o los depósitos pueden tener una hidrofobicidad o hidrofilia diferente. Alternativamente, el área de la sección transversal del canal de salida o del depósito se hace más pequeña, por lo que exhibe una mayor fuerza capilar.

En algunas realizaciones, el flujo se facilita por válvulas de capacitor incluidas que bombean fluidos en un canal separado cuando se presurizan. Esto se logra al tener una serie de válvulas en la parte inferior que dirigen un gas o líquido presurizado que hace que la membrana se deforme y exprima el fluido en el canal superior hacia adelante. Se suministra un control adicional al tener válvulas en la capa superior que pueden abrirse secuencialmente.

La comunicación fluida selectiva en cada componente del dispositivo de casete de microfluidos incluido se controla mediante una o más compuertas piezoeléctricas en los canales de microfluidos que comprenden módulos de nanoelectrodos conectados a la CPU y al controlador de software del sistema general, que se describe con más detalle a continuación. En ciertas realizaciones, una o más estaciones de observación para monitorear y evaluar ovocitos, espermatozoides y embriones están comprendidos en uno o más componentes o estaciones en el dispositivo de casete de microfluidos incluido.

La invención proporciona, además, un sistema para la fertilización asistida intracitoplasmática automatizada por inyección de esperma (ICSI) que comprende el dispositivo de casete de microfluidos incluido en la invención y una máquina para activar funcionalmente el dispositivo de casete de microfluidos que comprende una unidad central de procesamiento (CPU) y un software para monitoreo y control automatizados del proceso ICSI, incluida la comunicación selectiva entre canales conectados, cámaras, reservas, entradas, salidas, para la progresión de los microfluidos, ovocitos, eliminación de cumulus de ovocitos, selección e inmovilización de ovocitos, aislamiento de espermatozoides móviles, inmovilización de espermatozoides móviles, inyección de espermatozoides intracitoplasmática y cultivo de embriones.

En ciertas realizaciones, la máquina del sistema automatizado de la invención para la fertilización asistida por inyección de esperma intracitoplasmático contiene un receptáculo, o estación de acoplamiento, para integrar el dispositivo de casete de microfluidos desechable. La máquina puede comprender además una pluralidad de cámaras de vídeo digitales y monitores de vídeo remotos conectados a la CPU y software para visualizar y grabar celdas en las diversas estaciones correspondientes dentro del casete. En ciertas realizaciones, la CPU y el software controlan automáticamente la temperatura, el pH y la presión del dispositivo y la adición de medios celulares a la reserva de ovocitos y a la reserva de espermatozoides, o en cualquier punto seleccionado a lo largo de la ruta.

En algunas realizaciones, la máquina del sistema automatizado de la invención para la fertilización asistida por inyección intracitoplasmática de esperma controla la estación de inmovilización de ovocitos creando una presión negativa (al vacío) a través de un microcanal en la estación de inmovilización de ovocitos del casete microfluídico. En algunas realizaciones, la máquina del sistema automatizado de la invención para la fertilización asistida por inyección intracitoplasmática de esperma controla la inyección intracitoplasmática de esperma aplicando un campo eléctrico de una pipeta piezoeléctrica para penetrar en el ovocito y luego aplicando presión microfluídica dentro de la pipeta piezoeléctrica para posicionar el espermatozoide en el ovocito.

También se describen métodos para la fertilización asistida automatizada por inyección de esperma intracitoplasmática que comprende combinar un espermatozoide y un ovocito en un dispositivo de casete de microfluidos de trayectoria continua con el sistema descrito aquí, con la condición de que tanto el espermatozoide como el ovocito no sean humanos. También se describen los métodos para la fabricación de dispositivos de casete, máquinas y sistemas para

ICSI, como se describe en este documento.

Varias realizaciones no limitativas de los dispositivos se representan en las Figuras 1-17, que se mencionan en este documento. El dispositivo de casete de microfluidos incluido en la invención para la fertilización asistida por inyección intracitoplasmática comprende: a) una reserva de ovocitos (100) que comprende una cámara de ovocitos (101), una entrada (102) y una salida (103); b) un canal de extracción de cumulus de ovocitos (104) en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de ovocitos; c) una estación de inmovilización de ovocitos (120) en comunicación fluida selectiva con el canal de eliminación de cumulus de ovocitos; d) una reserva de espermatozoides (200) que comprende una cámara de espermatozoides (201), una entrada (202) y una salida (203); e) un canal de aislamiento de espermatozoides móviles (204) en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de esperma; f) una estación de inmovilización de espermatozoides móviles (220) en comunicación fluida selectiva con el canal de aislamiento de espermatozoides móviles y en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; y g) una cámara de cultivo de embriones (300) en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos, en la que la comunicación fluida selectiva está controlada por una o más puertas piezoeléctricas que comprenden módulos de nanoelectrodos, y en la que el canal de extracción de cumulus de ovocitos comprende una o más puertas piezoeléctricas configuradas para facilitar la eliminación de células de cúmulo.

Una vez que los ovocitos y el esperma se colocan en sus respectivas cámaras (101, 201) del dispositivo, el sistema se puede sellar y activar, y los siguientes pasos se pueden llevar a cabo a través de un sistema automatizado, por lo que también se pueden monitorear los pasos individuales para verificar la maniobra manual.

Los complejos de cúmulo-ovocitos (COC) (106) se cultivan y monitorean hasta que alcanzan la metafase II, en cuyo punto deben decoronizarse y retirarse las células del cúmulo. Una cámara modular de denudación o vibración (109) se puede crear temporalmente por medio de una o más válvulas (112), como se muestra en diferentes realizaciones en las Figuras 3, 4 y 5, o una región del dispositivo como se muestra en la Figura 1. La hialuronidasa (110) se puede agregar a la cámara de denudación para decoronar los ovocitos. El tiempo de incubación con la solución de hialuronidasa puede ser, por ejemplo, de entre 2 minutos y 15 minutos; de entre 5 minutos y 12 minutos, y de entre 7 minutos y 11 minutos. La hialuronidasa puede ser recombinante. La concentración de hialuronidasa por ovocito puede estar entre 10 UI por ml y 40 UI por ml. La cámara o región de denudación se puede vibrar para limpiar aún más el ovocito, y se puede aplicar vacío (113) (como se muestra en las Figuras 1, 3 y 5) para eliminar los residuos, que se pueden depositar en una cámara de desechos (105) como se muestra en la Figura 4, o a través de la salida del canal de cúmulo (115), como se muestra en las Figuras 3, 5, 8, 13 y 14.

La decoronización se puede ayudar aún más mediante el paso a través de un canal estrecho (104) controlado por gradiente de presión a través de una o más compuertas piezoeléctricas (400), como se muestra en las Figuras 8, 13 y 14. Después de que la solución de hialuronidasa se enjuague, el ovocito desnudo (107) se deja reposar en medio fresco durante un período de aproximadamente 2 horas. Los ovocitos desnudos también pueden ser guiados a una cámara modular (109) en la que una inundación de gradientes de crioconservación permitiría la vitrificación de la cámara modular con la muestra en ella.

Las células pueden ser impulsadas a través del chip a través del flujo microfluídico, por medio de una bomba peristáltica, por activación por presión o controlando un campo electromagnético. Si el dispositivo está hecho de un compuesto elástico, que incluye, entre otros, PDMS, las secciones seleccionadas del mismo pueden comprimirse o liberarse mecánicamente para controlar las válvulas, facilitar el paso y facilitar la progresión peristáltica.

Después de la metafase II, los ovocitos desnudos alcanzan la estación de inmovilización de ovocitos para inyección, que puede formarse por una depresión en la pared de una cámara o por al menos una proyección desde la pared o paredes de la cámara, como se muestra en las Figuras 1, 2, 3, 5 y 6, pueden alinearse a través de la corriente eléctrica, como la alineación de corriente continua (DC) (111) a lo largo de una trayectoria de inyección. El ovocito de la metafase II completamente desnudo (108) puede inmovilizarse por medio de un dispositivo de succión (113) como se muestra en las Figuras 1, 4, 5 y 11 o por la fuerza del flujo de fluido como se muestra en la Figura 3. El cuerpo polar del ovocito de metafase II completamente desnudo (108) puede alinearse para la inyección apropiada aplicando una corriente alterna a través de los electrodos (121) como se muestra en la Figura 5. Estos electrodos también se pueden ubicar a través de la diagonal ortogonal del ovocito o en cualquier otra orientación para permitir la orientación adecuada del ovocito.

Con respecto a los espermatozoides, después de la deposición en la cámara de esperma (200), las células de esperma se clasifican y el esperma seleccionado se agrupa en la cámara de inyección (201) que tiene una entrada (202) y una salida (203). La cámara de inyección de esperma (201) puede ser una cámara macular de aproximadamente 5 micrones de profundidad, en la que el esperma reside en una sola capa. Los espermatozoides individuales se pueden

seleccionar observándolos usando una cámara (407) y un software de análisis asistido por computadora que identifica al espermatozoide con la mejor morfología (forma) y motilidad. Los espermatozoides seleccionados pueden atraparse con láseres y guiarse en la pipeta. Alternativamente, se puede crear un flujo laminar en la cámara de espermatozoides y solo los espermatozoides que pueden cruzar la lámina se dirigen a la pipeta, como se muestra en la Figura 10.

5

En la pipeta, los espermatozoides se pueden capturar y alinear utilizando un sistema de control de movimiento y captura con láser (425), tal como se conoce en la técnica; dicho sistema puede alinearse a lo largo de la longitud de la pipeta. El espermatozoide puede inmovilizarse usando un láser para dañar el flagelo o la membrana del espermatozoide capturado.

- 10 El ovocito inmovilizado y alineado se inyecta con una pipeta roma que se muestra en la Figura 11, que actúa bajo el control de un dispositivo piezoeléctrico (430) que facilita la penetración del ovocito, que se muestra en las Figuras 1-6, 11 y 15. El dispositivo piezoeléctrico y la pipeta se montan a su vez en una plataforma deslizante (no mostrada) que puede hacer avanzar la pipeta a la superficie del ovocito y luego aproximadamente 75 micrones al ovocito humano (30 micrones para ratón), bajo el control de la CPU y software. La penetración exitosa a través del oolemma se confirma
- 15 mediante tecnologías conocidas de abrazaderas de parche (no se muestra).

- La región de la pared de la cámara donde la pipeta entra en la cámara de microfluidos puede estar hecha de un material diferente al resto de la pared de la cámara para permitir la penetración de la pared de la cámara y el resellado de la pared de la cámara después de que se retire la pipeta. Alternativamente, la pared de la cámara puede estar
- 20 compuesta de un material autosellante.

- Una vez que todos los ovocitos fertilizados han avanzado hacia la cámara de cultivo de embriones (300), los embriones fertilizados se cultivan durante un período de tiempo, que puede ser de aproximadamente 16 a 18 horas. Al final de dicho período, se examinan los embriones para determinar si se han desarrollado en cigotos que comprenden dos
- 25 cuerpos polares distintos y dos pronúcleos. Los ovocitos que no fertilizaron pueden seleccionarse y eliminarse automáticamente del sistema de cultivo de embriones a través de un puerto de desechos (no mostrado), por ejemplo, mediante un sistema de captura y movimiento por láser.

- Los embriones restantes (301) se cultivan a través de sus diversas etapas dentro de la misma cámara porque la actualización de diferentes tipos de medios se puede lograr a través de otros puertos microfluídicos. El cultivo de medio embrionario condicionado puede evaluarse utilizando matrices metabólicas. Si se aíslan embriones individuales y se realiza una biopsia quirúrgica en una cámara con una herramienta similar a la microinyección, el embrión biopsiado se puede analizar genéticamente. Los embriones también se pueden separar en diferentes cámaras para la maduración y la criopreservación.
- 35

- El dispositivo de casete microfluídico debe estar controlado por temperatura y el medio que fluye debe controlarse para detectar variaciones de pH y osmolaridad. El sistema incluye sensores para temperatura, pH, osmolaridad y tránsito iónico. Los sensores se pueden conectar a través de cables, o de manera inalámbrica, a la CPU y al sistema de control de software que monitorea cada parámetro para garantizar que estén dentro de los rangos fisiológicos
- 40 humanos, y si el rango se supera en cualquier dirección, el sistema de control actúa en consecuencia para aumentar o disminuir la temperatura, el pH, la osmolaridad y el tránsito de iones para mantener el sistema dentro de los parámetros fisiológicos humanos.

- El sistema incluye depósitos para al menos tres fluidos. Una solución de hialuronidasa para la eliminación de cumulus; una solución básica como G1, disponible comercialmente de Vitrolife; y una solución de cultivo de embriones, como G2, disponible comercialmente de Vitrolife.
- 45

- Antes de la etapa de inyección, el sistema se llena con solución G1 o su equivalente. Luego de completar todas las inyecciones, el sistema se llena con G2 o una solución equivalente. El reemplazo de la primera solución por la segunda
- 50 solución puede ser gradual, por ejemplo, se lleva a cabo en el transcurso de una hora.

- Lo siguiente proporciona además descripciones más detalladas para cada compartimento de la totalidad del casete de microfluidos de la invención, como se muestra en la Figura 13, que comprende el compartimento inferior para las cámaras de eliminación de cumulus de ovocitos; el compartimento central para la evaluación de la maduración de los
- 55 ovocitos; y el compartimento izquierdo para la selección de espermatozoides e ICSI, y un compartimento para el cultivo de embriones que se muestra en la parte superior de la Figura.

- Las cámaras y puertas de eliminación de cumulus de ovocitos se muestran en las Figuras 7, 8 y 14. Las figuras 7 y 8 ilustran con más detalle la eliminación de cumulus, incluyendo la primera y la segunda cámaras y puertas de
- 60 eliminación de cumulus. A continuación, se proporcionan ejemplos ejemplares y no limitativos de extracciones de

cumulus. En la cámara que se muestra en la Figura 7 para la eliminación de cumulus primera/inicial, la hialuronidasa (110) se enjuaga para iniciar la eliminación de las células de cumulus del huevo. En ciertas realizaciones, la forma de embudo de la cámara de salida (103) de ancho ~200 µm permitirá la progresión individual de las células del huevo. La progresión a través del canal de extracción de cumulus (104) se ejecuta mediante un flujo microfluídico. La Figura 8 ilustra la cámara de eliminación de células del cúmulus secundaria, en la que las puertas piezoeléctricas (400) se usan para crear una cámara aislada donde la eliminación de la célula del cúmulus se realiza mediante succión. Los módulos de nanoelectrodos incorporados en el PDMS inducen un estrechamiento/cierre del canal. La progresión a través del canal es sostenida por flujo microfluídico. Como se discutió, el flujo microfluídico se puede lograr mediante cualquier método adecuado a través de medios pasivos o activos, que incluyen, entre otros, el bombeo peristáltico en modo de intercambio unidireccional o inverso. El flujo microfluídico puede ser pulsátil o continuo, y no está limitado por la velocidad del flujo dinámico.

En ciertas realizaciones, cada ovocito individual puede asignarse en cada canal o cámara microfluídica con puertas, como se muestra en la Figura 16, para extracciones de cumulus iniciales y/o secundarias. En ciertas realizaciones, el proceso de eliminación del cúmulus se puede monitorear a través del vídeo (405) con un programa asistido por ordenador. Para ejemplos de dispositivos microfluídicos para la eliminación del cúmulus de un ovocito, ver Patente de Estados Unidos N.º 6.695.765 de Beebe, Publicación de Estados Unidos N.º 2007/0264705 a Dodgson; y Publicación de Estados Unidos N.º 2011/0250690 de Craig.

La Figura 9 ilustra la evaluación de la maduración del huevo, donde la madurez del ovocito se evalúa a través de un vídeo (405). La cámara (406) conectada a un procesador de ordenador y el software está equipado con un sistema de reconocimiento de morfología que puede distinguir si las células llevan un cuerpo polar o no. Este sistema, posteriormente, envía una señal al software que controla la selección. La retención en el lugar y la orientación del huevo se logra a través de un par de electrodos (121) que están contrapuestos dentro de la pared del canal y permitirán el suministro de corriente alterna. La asignación a la cámara inmadura (119) a través de una salida de rechazo de ovocitos (118) o la progresión a la sección de inyección se modula mediante un movimiento fluídico. Para obtener descripciones más detalladas de los dispositivos y métodos de microfluidos para el cultivo y la maduración de ovocitos de mamíferos in vitro, ver Publicación de los Estados Unidos N.º 2013/0034906.

La selección de espermatozoides, la inmovilización, la inyección de ICSI y el cultivo de embriones se muestran en las Figuras 10, 11, 12 y 15. La Figura 10 ilustra la selección de espermatozoides. En esta realización, la selección de espermatozoides se obtiene a través de un sistema de bombeo por gravedad. La muestra se carga en la cámara de inyección de espermatozoides (201) que tiene una entrada (202) para aceptar medios frescos, y una salida (203) para permitir que el espermatozoides móvil atraviese el canal de interfaz (204) de la corriente de flujo laminar, saliendo a la cámara de espermatozoides móvil (210). Los espermatozoides inmóviles, los residuos y algunos espermatozoides inmóviles se recogen en la cámara inmóvil (215). Para obtener descripciones más detalladas del aislamiento, clasificación y selección de espermatozoides, ver Publicación de los Estados Unidos N.º 2006/0270021 de Takayama et al..

La Figura 11 ilustra la inmovilización de espermatozoides y la inyección de ICSI. En esta realización, el ovocito MII (108) movido antes por el flujo microfluídico se inmoviliza luego en la estación de inmovilización (120) por vacío (410) por un microcanal lateral. Los espermatozoides pueden capturarse en la estación de inmovilización (220) y alinearse mediante un sistema de control de movimiento y captura con láser, como la inmovilización de espermatozoides asistida por láser (LASI) (425) y el posicionamiento de espermatozoides asistido por láser (LASP) (420) conocido en la técnica. La inyección de la única célula espermática se logra con una pipeta piezoeléctrica aplicando primero un campo eléctrico para penetrar en el ovocito y, posteriormente, una presión de flujo dentro de la microherramienta para colocar el espermatozoides en el ovocito. Se utiliza un sistema de cámara (405, 407) para controlar la inyección de principio a fin. El ovocito se recupera por presión de succión mecánica. La progresión del ovocito inyectado a través del microcanal es por flujo microfluídico. Para obtener descripciones más detalladas de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), ver Lu et al. 2011, Robotic ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection), IEEE Transactions of Biomedical Engineering, 58:2102-2108.

La Figura 12 ilustra el cultivo del embrión. Después de la inyección, los ovocitos se mueven al extremo del microcanal a través del flujo microfluídico y se asignan a las secciones del canal. Se utiliza un sistema de cámara (405, 408) para evaluar su desarrollo hasta el momento en que se recogerá y se usará para la transferencia. El monitoreo y la evaluación de embriones individuales a través de múltiples microcanales o cámaras se ilustran en la Figura 17. Los medios de cultivo y los métodos para el desarrollo de embriones son bien conocidos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de casete de microfluidos incluido para la fertilización intracitoplasmática asistida por inyección que comprende:
5
a) una reserva de ovocitos que comprende una cámara de ovocitos, una entrada y una salida;
b) un canal de extracción del cúmulus de ovocitos en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de ovocitos;
c) una estación de inmovilización de ovocitos en comunicación fluida selectiva con el canal de extracción del cumulus de ovocitos;
10 d) una reserva de espermatozoides que comprende una cámara de espermatozoides, una entrada y una salida;
e) un canal de aislamiento de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de espermatozoides;
f) una estación de inmovilización de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con el canal de
15 aislamiento de espermatozoides móviles y en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; y
g) una cámara de cultivo de embriones en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos;

donde la comunicación fluida selectiva es controlada por una o más puertas piezoeléctricas que comprenden módulos
20 de nanoelectrodos, y donde el canal de eliminación de cumulus de ovocitos comprende una o más puertas piezoeléctricas configuradas para facilitar la eliminación de células del cumulus.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, donde una parte del canal de extracción de cumulus de ovocitos tiene una anchura más estrecha que la cámara de ovocitos que permite la progresión individual de un ovocito; donde,
25 opcionalmente, una parte de dicho canal de eliminación del cumulus de ovocitos tiene una anchura de aproximadamente 200 µm.
3. El dispositivo de la reivindicación 1, donde el canal de eliminación del cumulus de ovocitos tiene un giro de 90° que permite la rotación de un ovocito para eliminar células del cumulus.
30
4. Dispositivo según la reivindicación 1, donde el canal de eliminación del cumulus de ovocitos tiene una salida de residuos en comunicación fluida selectiva con el mismo.
5. Dispositivo según la reivindicación 1, donde el canal de aislamiento de espermatozoides móviles tiene
35 una salida de espermatozoides inmóvil en comunicación fluida selectiva con el mismo.
6. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además una pluralidad de cámaras de cultivo de embriones en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos.
- 40 7. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además una o más estaciones de observación de embriones en comunicación fluida selectiva con la estación de cultivo y desarrollo de embriones; o que comprende además una o más estaciones de observación de espermatozoides en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de espermatozoides; o que comprende además una o más estaciones de observación de ovocitos en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos.
45
8. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende, además, una pluralidad de reservas de ovocitos en comunicación fluida selectiva con una pluralidad de canales de eliminación del cumulus de ovocitos en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos.
- 50 9. Dispositivo según la reivindicación 1, donde la estación de inmovilización de espermatozoides móviles comprende un sistema de inyección de esperma intracitoplasmática.
10. Dispositivo según la reivindicación 1, adaptado para su inserción en una máquina para el monitoreo y el control automatizados de la eliminación del cumulus de ovocitos, la selección e inmovilización de ovocitos, el
55 aislamiento de espermatozoides móviles, la inmovilización de espermatozoides móviles, la inyección de espermatozoides intracitoplasmática y el monitoreo de embriones.
11. Un sistema para la fertilización automatizada asistida por inyección de esperma intracitoplasmática que comprende:
60

un dispositivo de casete de microfluidos incluido para la fertilización asistida por inyección intracitoplasmática que comprende:

- a) una reserva de ovocitos que comprende una cámara de ovocitos, una entrada y una salida;
- 5 b) un canal de extracción del cúmulus de ovocitos en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de ovocitos;
- c) una estación de inmovilización de ovocitos en comunicación fluida selectiva con el canal de extracción del cumulus de ovocitos;
- d) una reserva de espermatozoides que comprende una cámara de espermatozoides, una entrada y una salida;
- 10 e) un canal de aislamiento de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con la salida de la reserva de espermatozoides;
- f) una estación de inmovilización de espermatozoides móviles en comunicación fluida selectiva con el canal de aislamiento de espermatozoides móviles y en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; y
- 15 g) una cámara de cultivo de embriones en comunicación fluida selectiva con la estación de inmovilización de ovocitos; y

- una máquina para activar funcionalmente el dispositivo de casete de microfluidos que comprende una unidad central de procesamiento (CPU) y un software para el monitoreo y control automático de la comunicación selectiva para la
- 20 progresión de los microfluidos, la eliminación del cumulus de ovocitos, la selección e inmovilización de ovocitos, el aislamiento de espermatozoides móviles, la inmovilización de espermatozoides móviles, inyección de esperma intracitoplasmática y monitoreo de embriones;

- donde la comunicación fluida selectiva es controlada por una o más puertas piezoeléctricas que comprenden módulos
- 25 de nanoelectrodos, y

donde el canal de eliminación de cumulus de ovocitos comprende una o más puertas piezoeléctricas configuradas para facilitar la eliminación de células del cumulus.

- 30 12. Sistema según la reivindicación 11, donde la máquina comprende además una pluralidad de cámaras de vídeo y monitores de vídeo remotos conectados a la CPU; o donde la CPU controla automáticamente la temperatura del dispositivo y la adición de medios celulares a la entrada de la reserva de ovocitos y la entrada de la reserva de espermatozoides; o donde la máquina controla la estación de inmovilización de ovocitos creando una presión negativa a través de un microcanal en la estación de inmovilización de ovocitos.

- 35 13. Sistema según la reivindicación 11, donde la máquina controla la inyección de esperma intracitoplasmática aplicando un campo eléctrico desde una pipeta piezoeléctrica para penetrar en el ovocito y luego aplicando presión microfluídica dentro de la pipeta piezoeléctrica para colocar los espermatozoides en el ovocito.

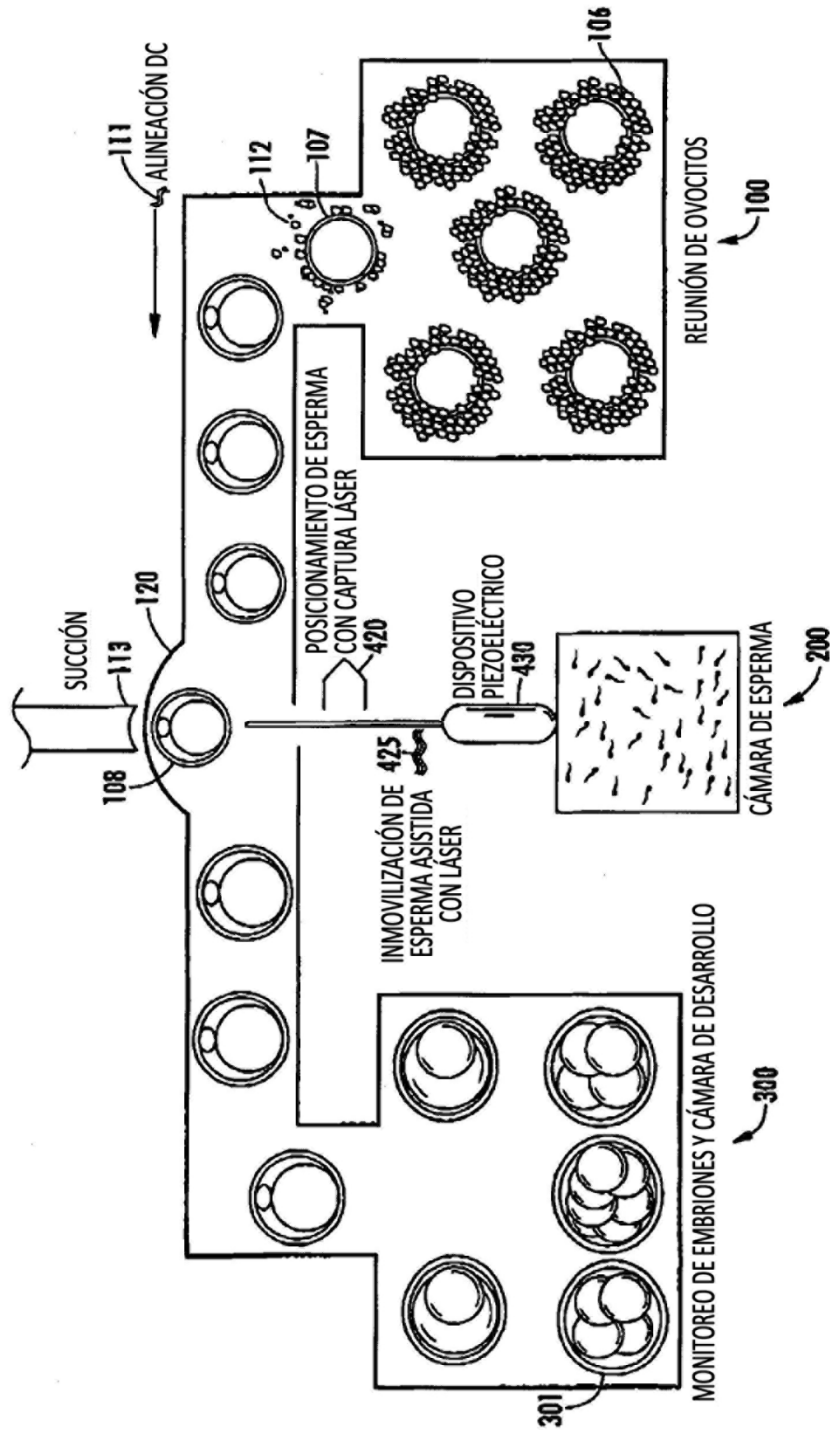


FIG. 7

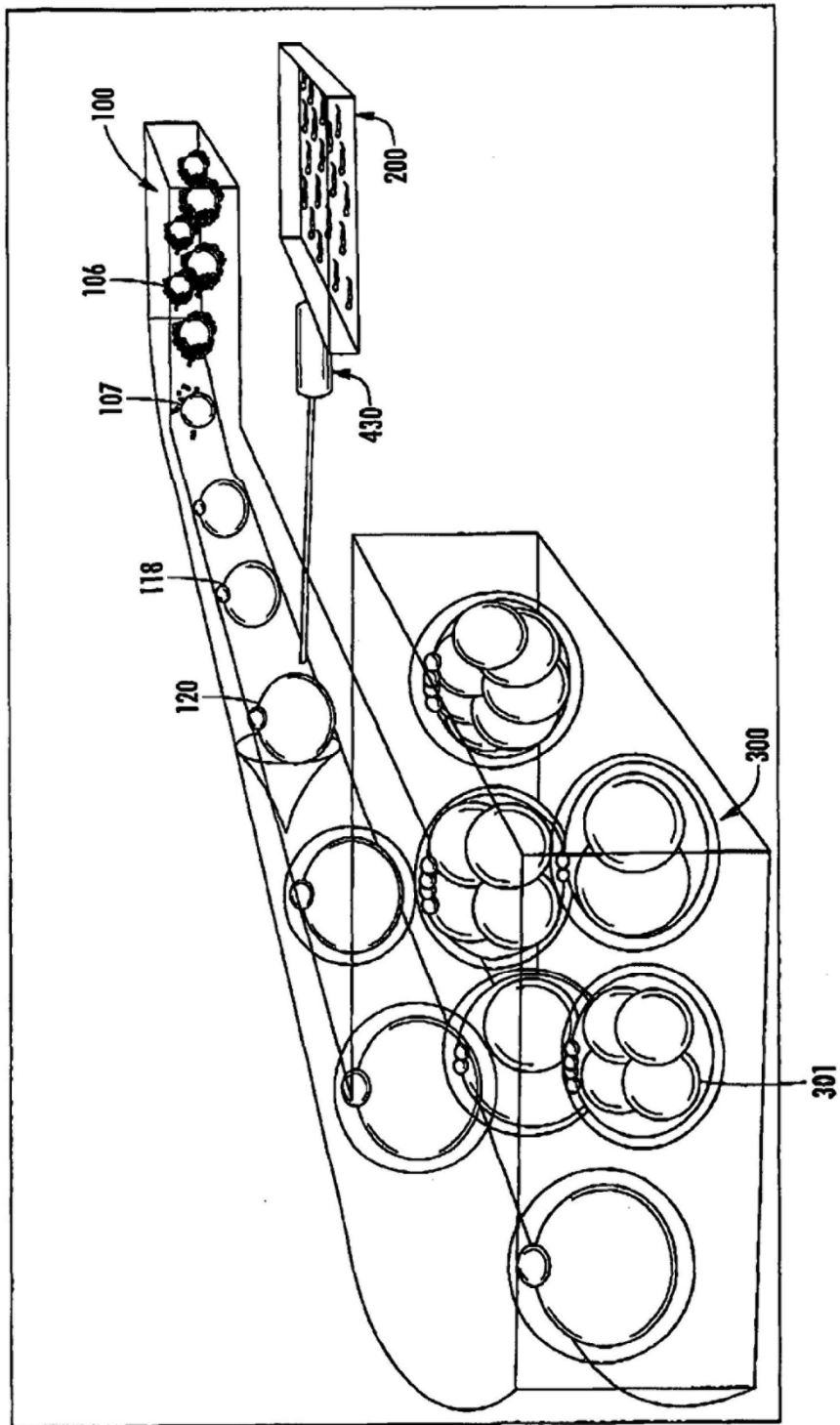


FIG. 2

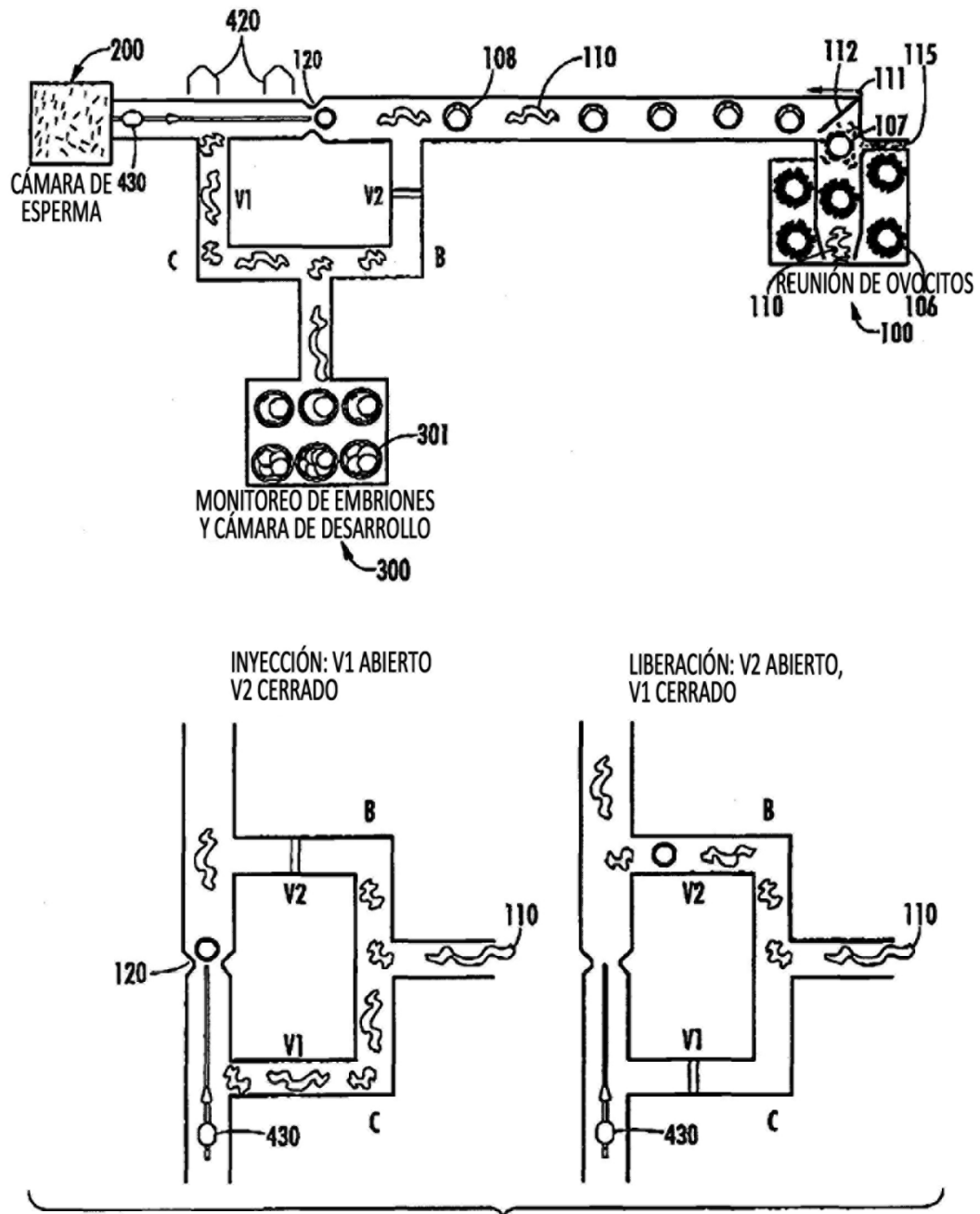


FIG. 3

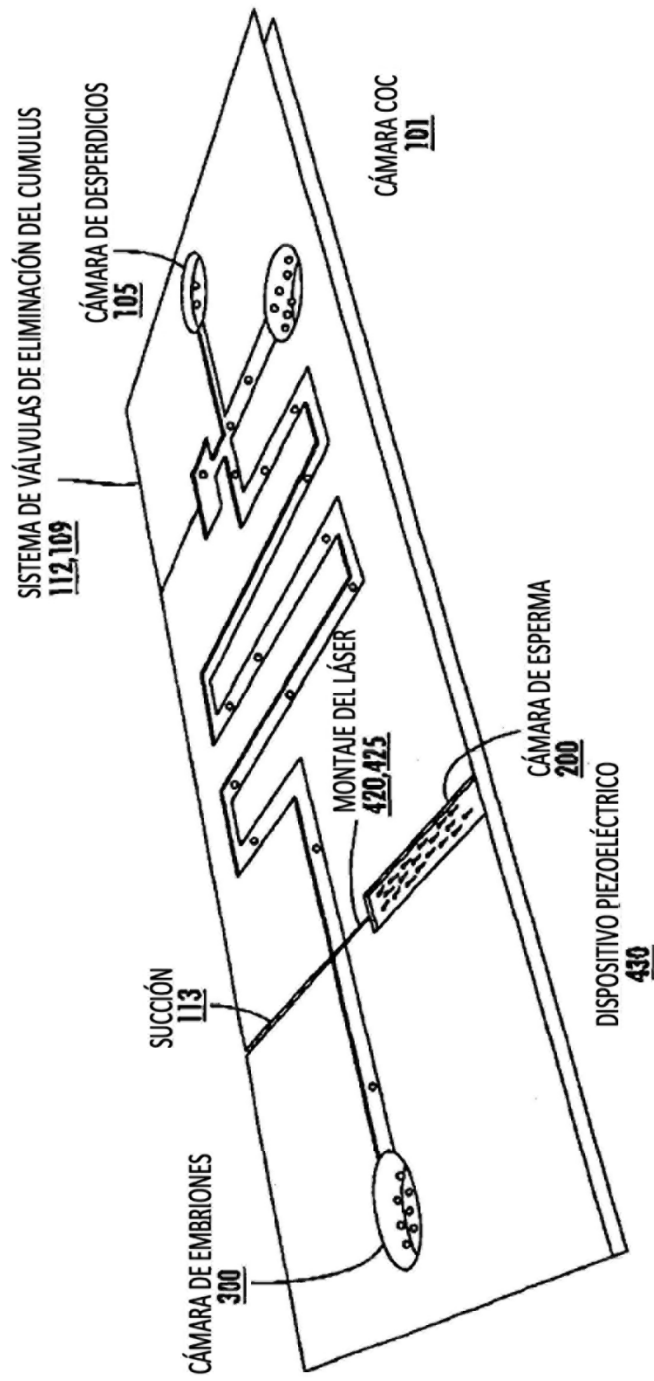


FIG. 4

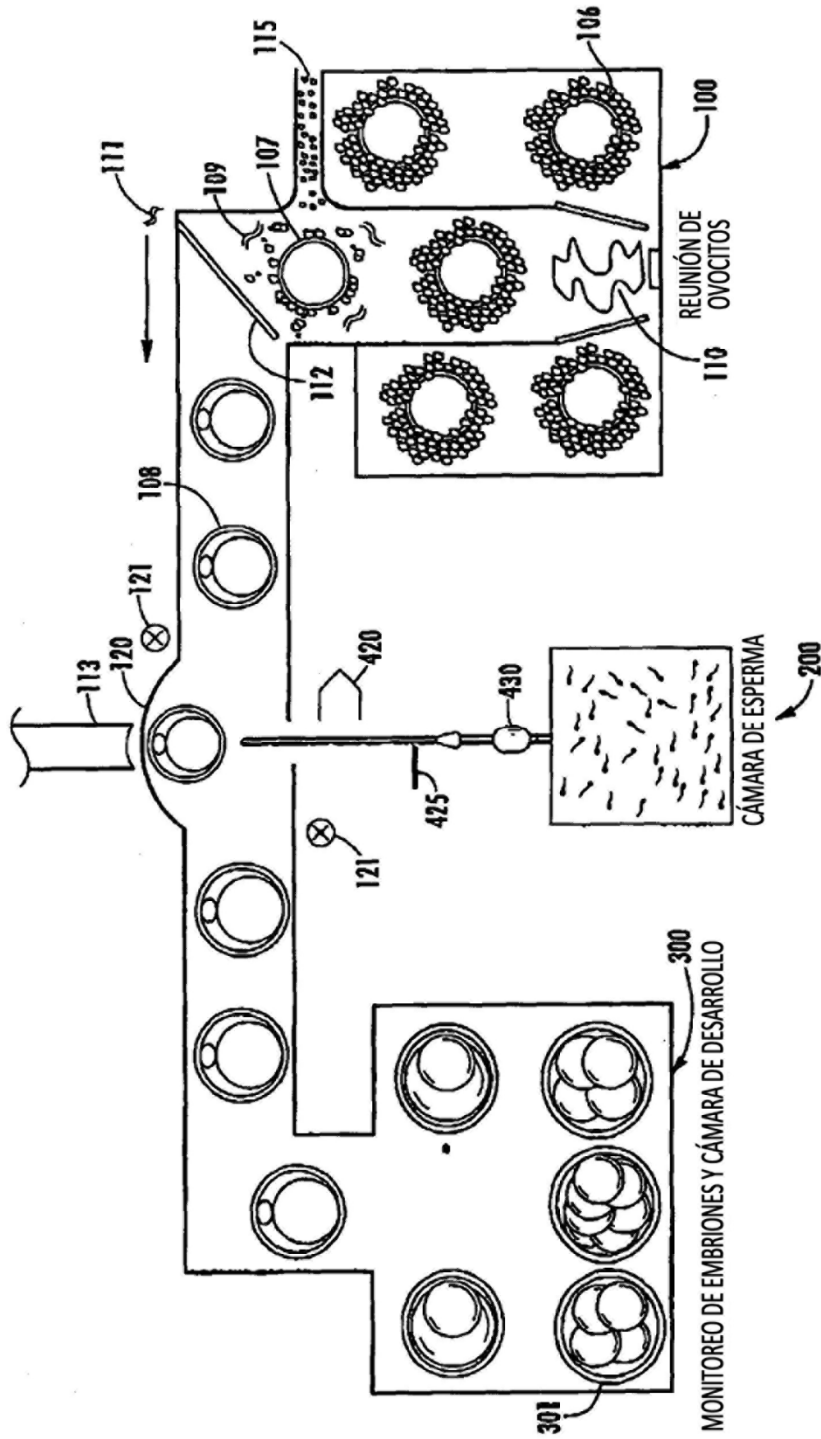


FIG. 5

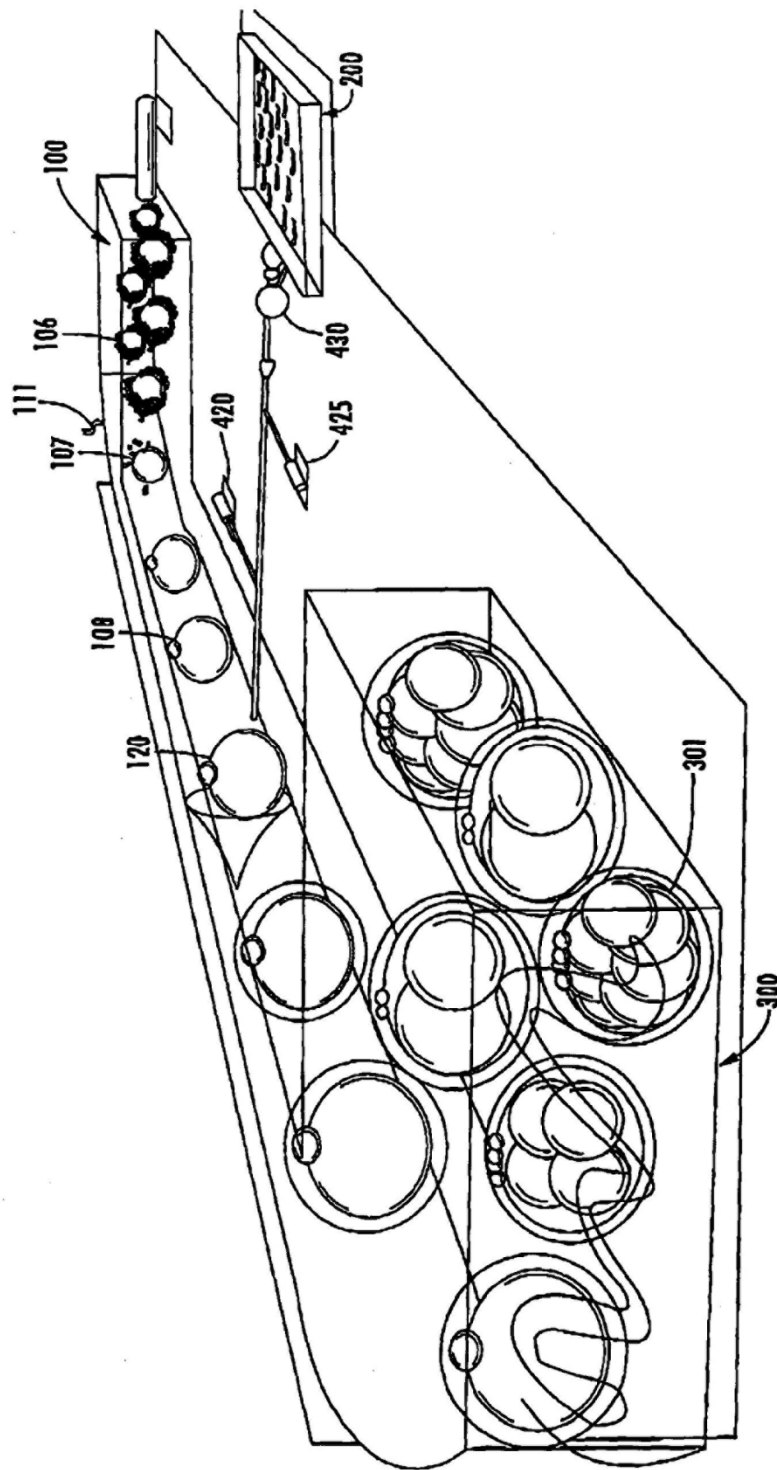


FIG. 6

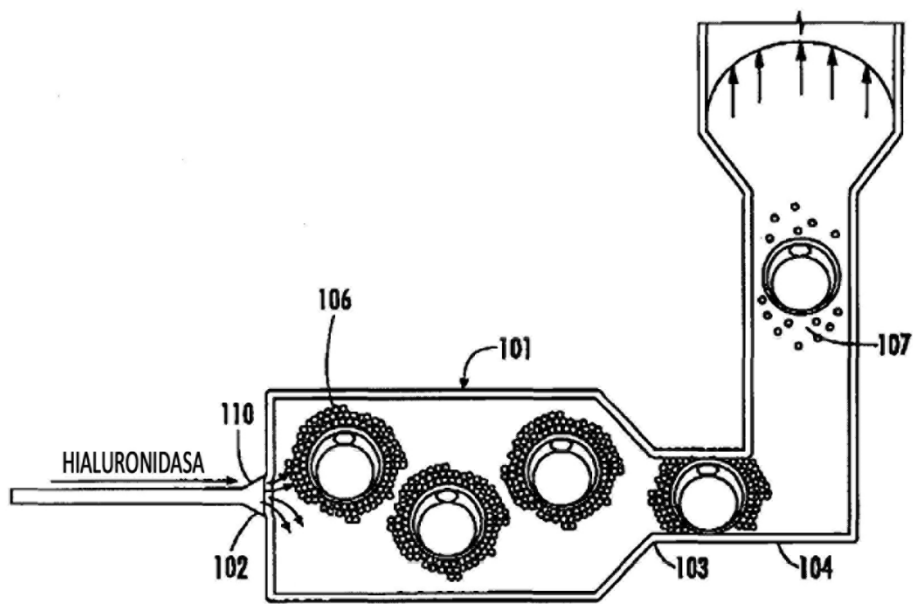


FIG. 7

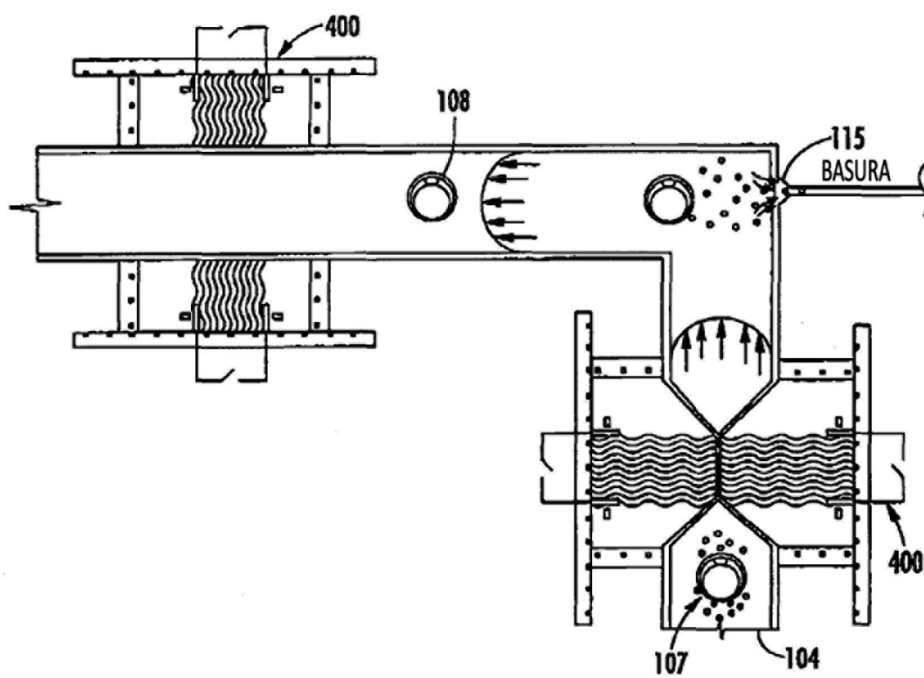


FIG. 8

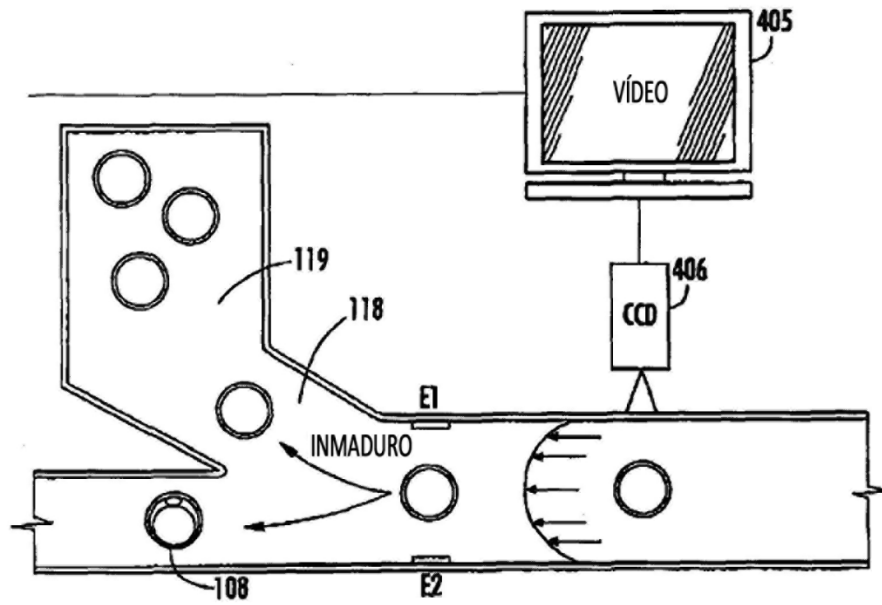


FIG. 9

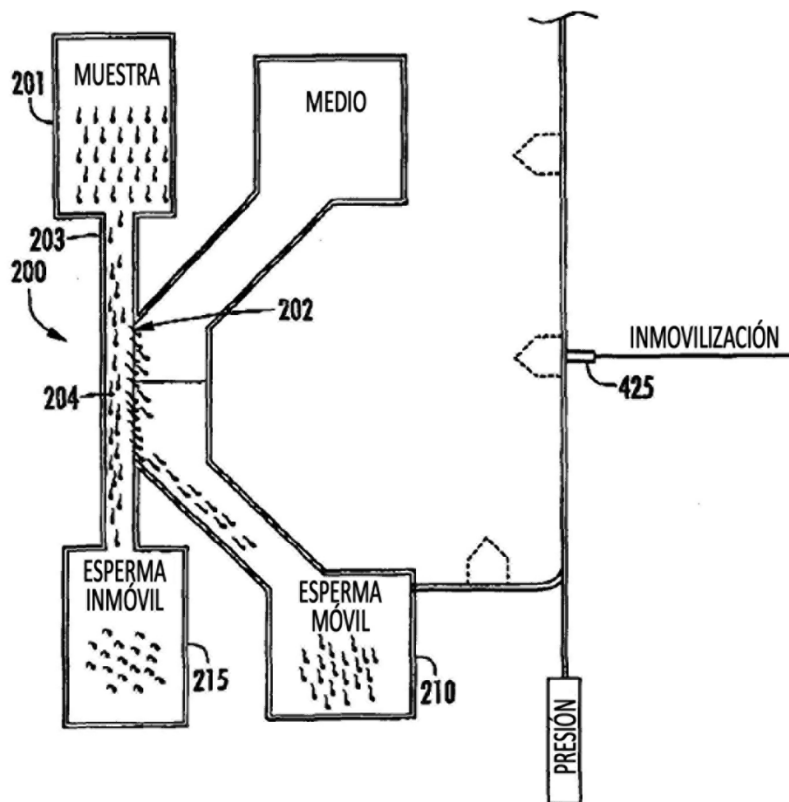


FIG. 10

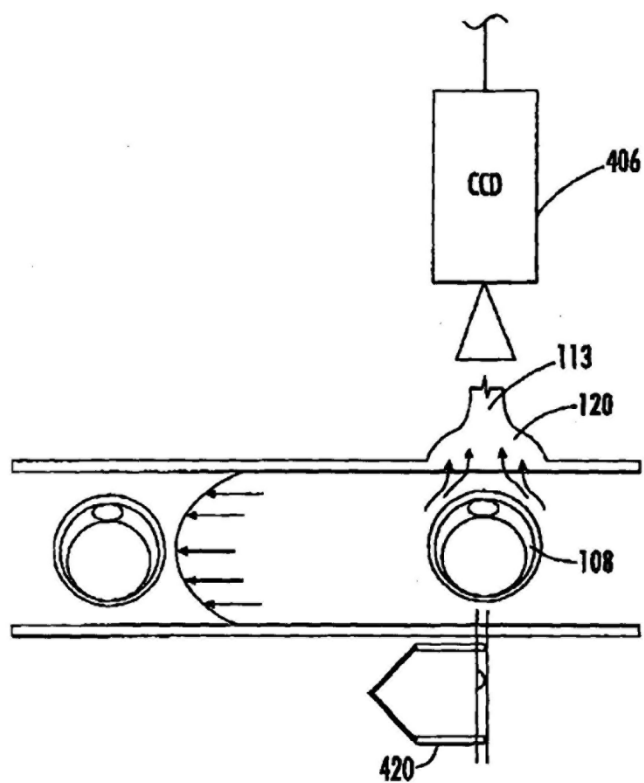


FIG. 11

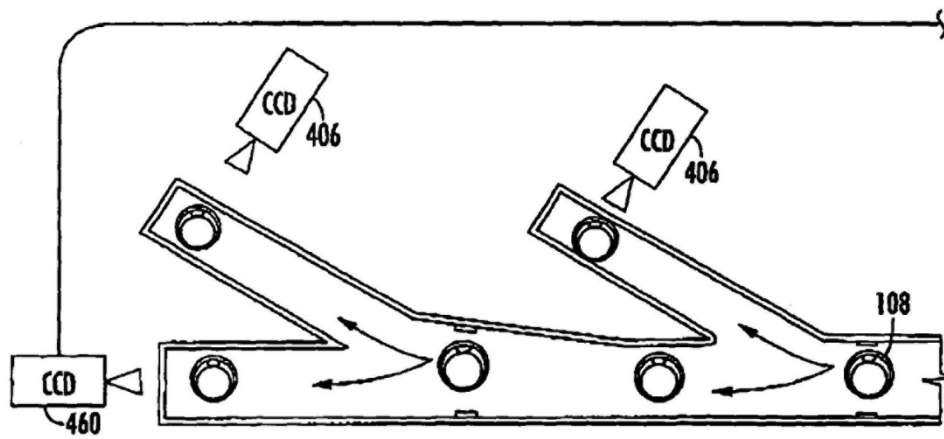


FIG. 12

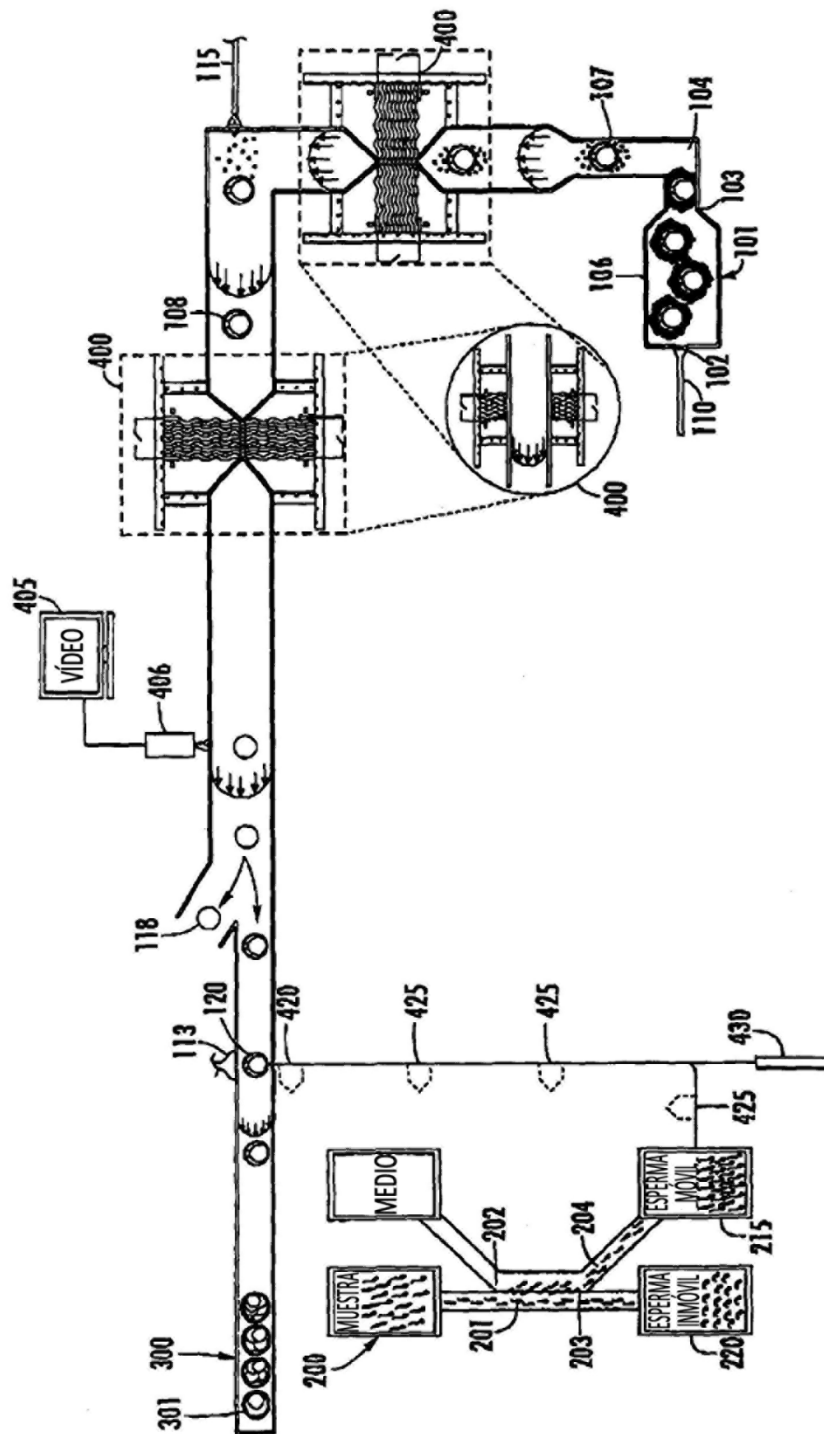


FIG. 13

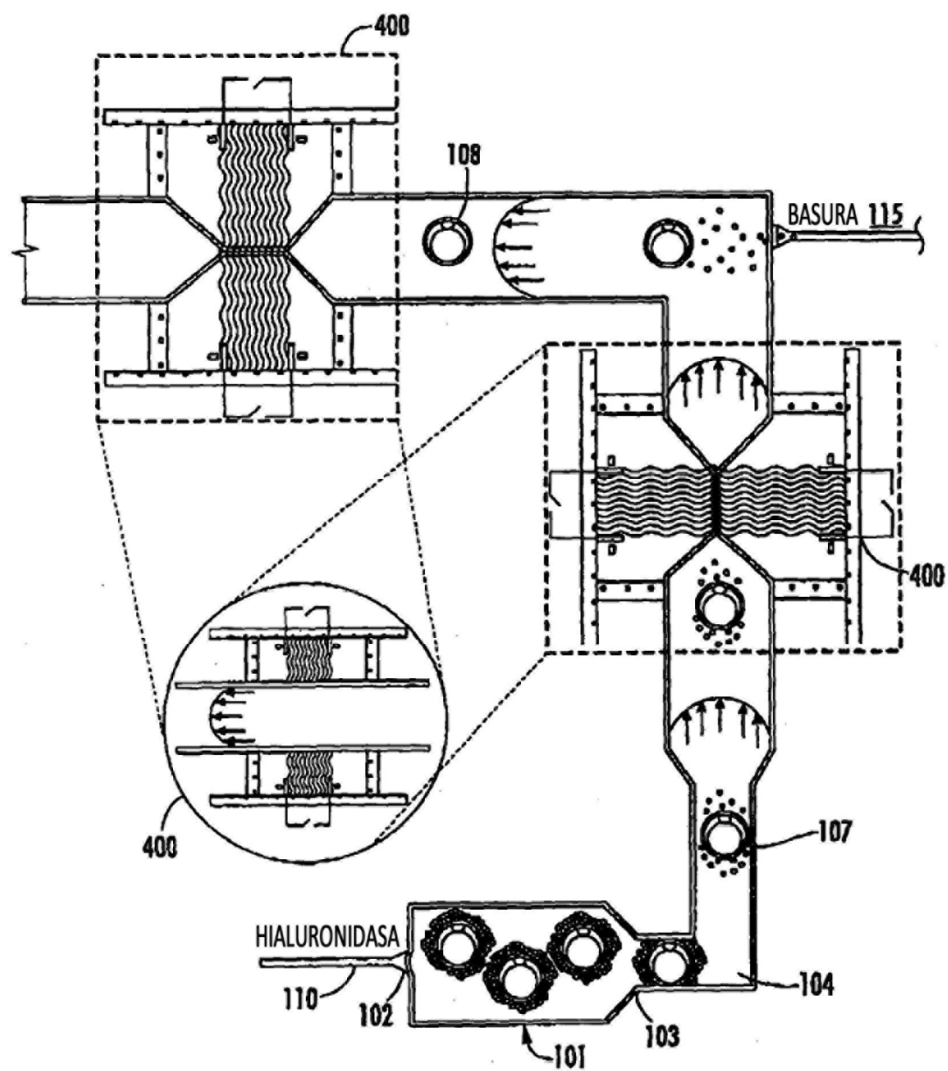


FIG. 14

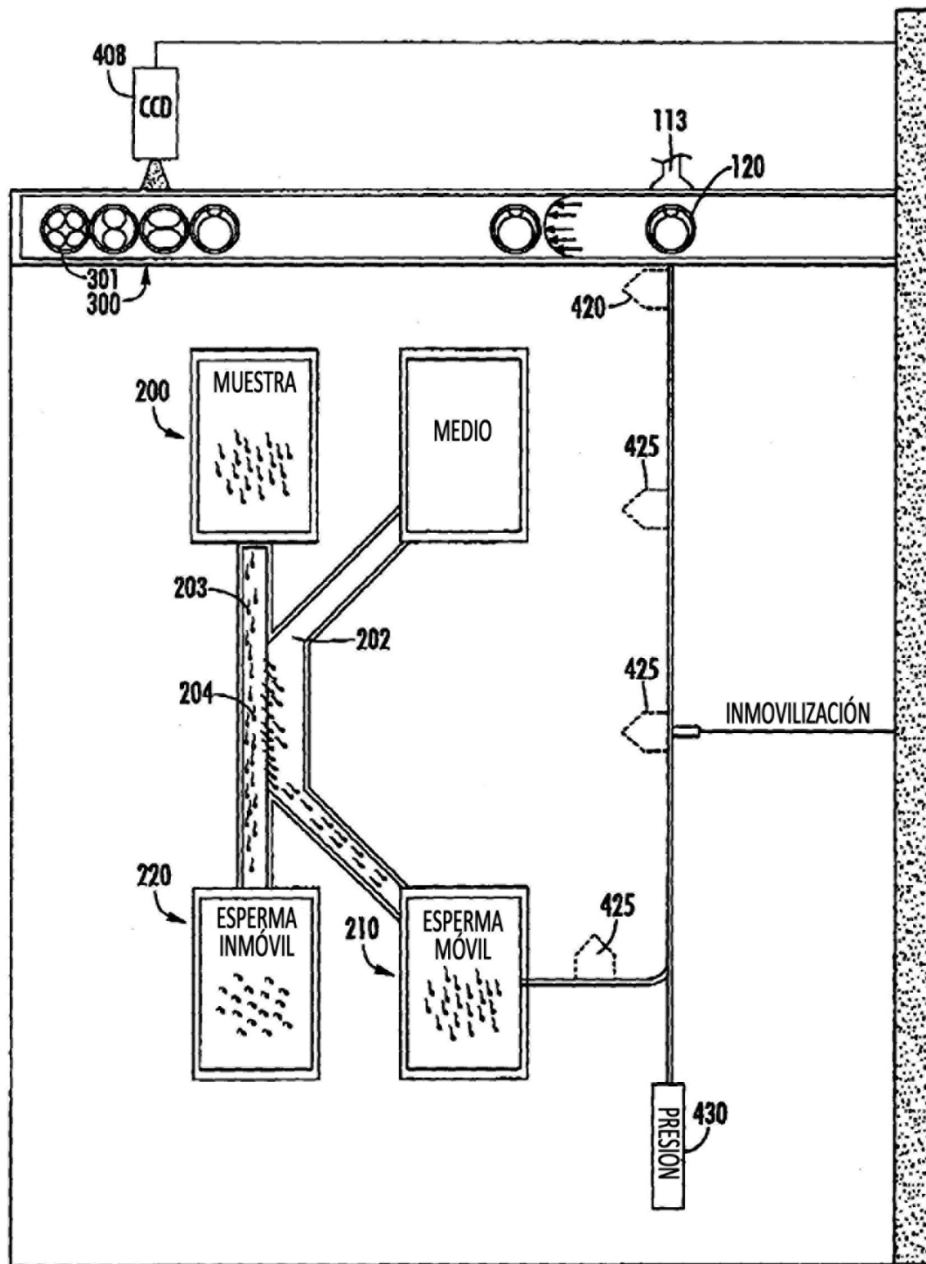


FIG. 15

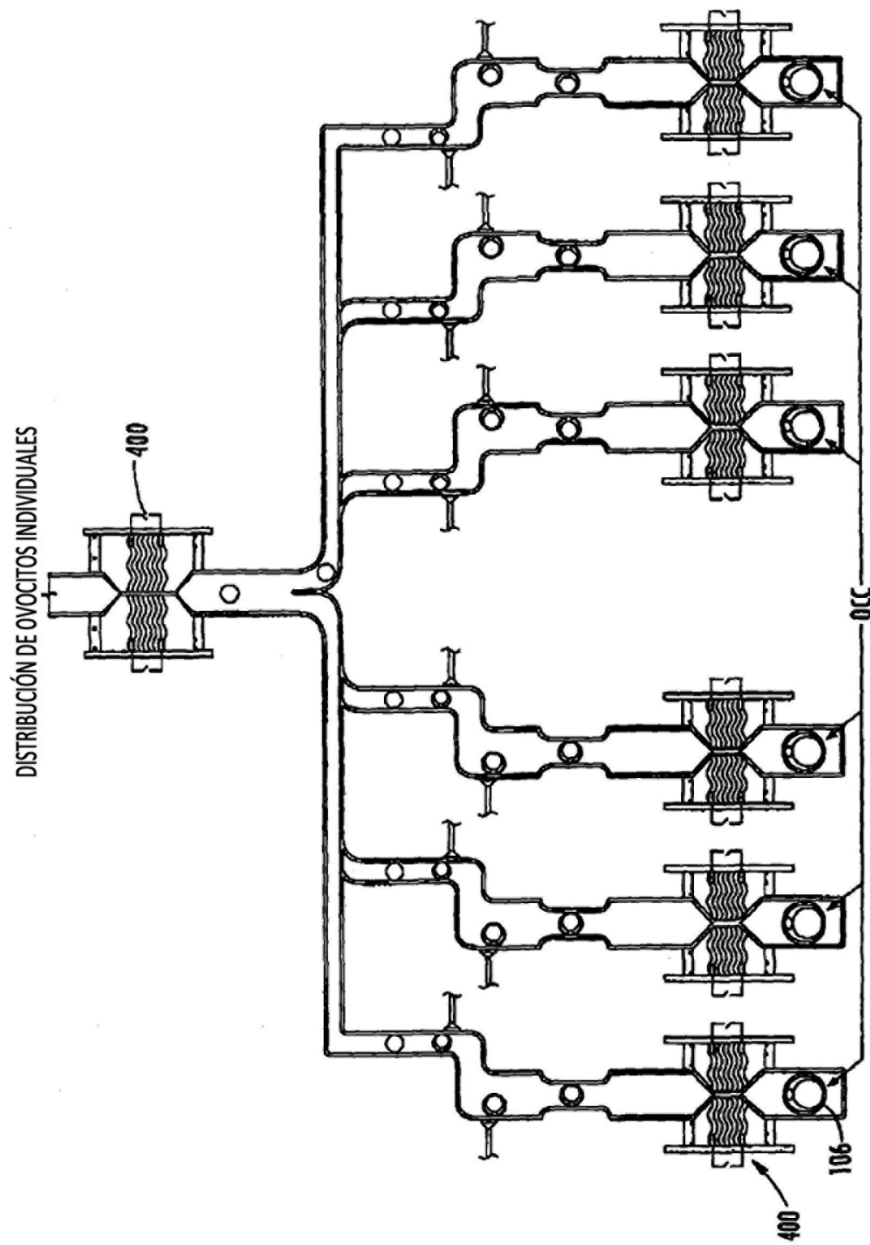


FIG. 16

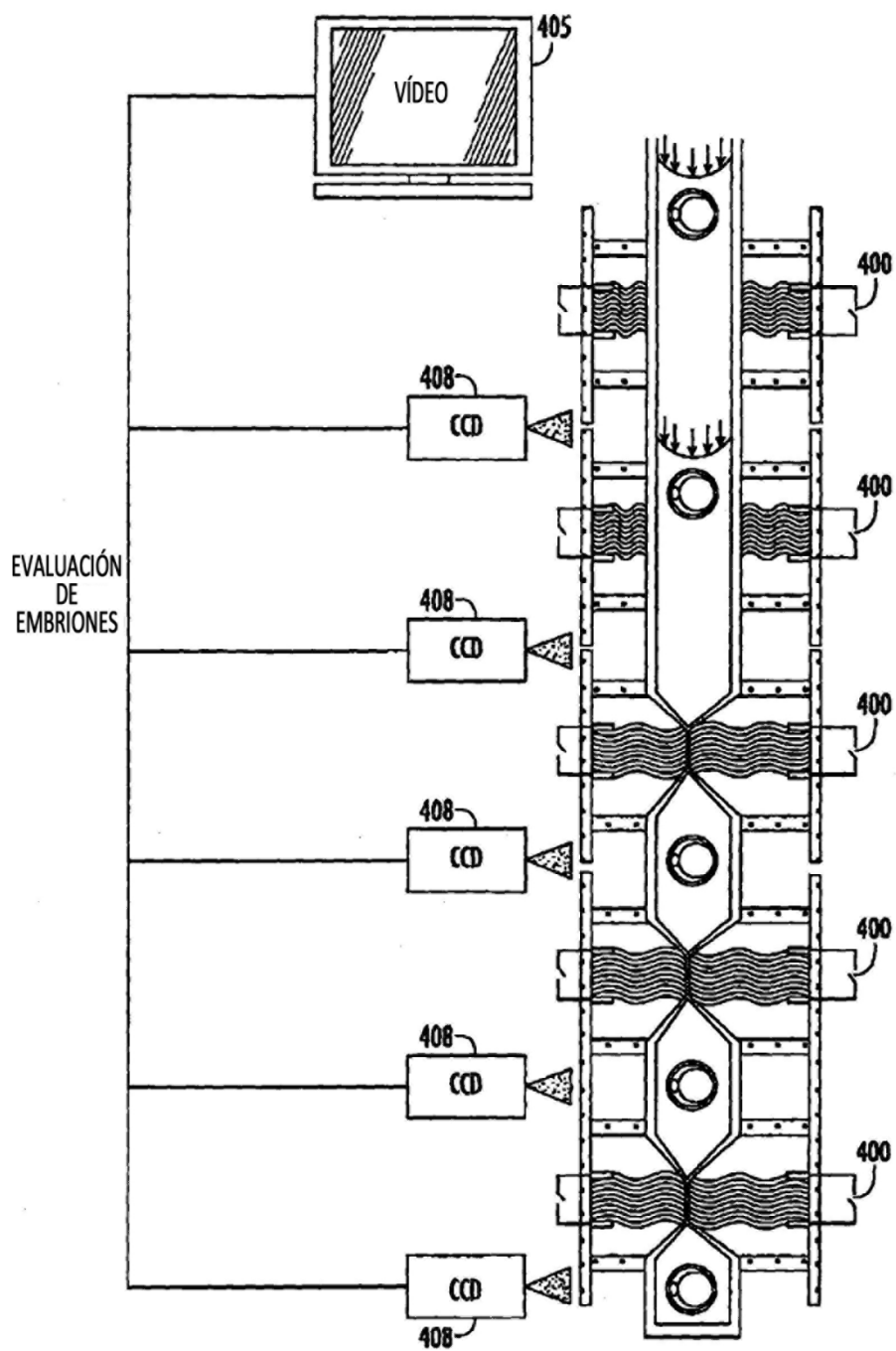


FIG. 17