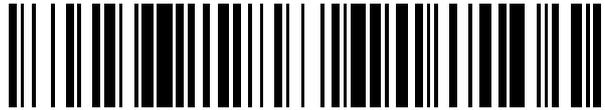


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 681**

21 Número de solicitud: 201830694

51 Int. Cl.:

A01N 1/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/073 (2010.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

11.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.01.2020

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (75.0%)
Paseo de las Delicias s/n (Pabellón de Brasil)
41013 Sevilla ES y
FUNDACIÓN GINEMED (25.0%)

72 Inventor/es:

RISCO DELGADO, Ramón Jesús;
GALLARDO MOLINA, Miguel y
SÁENZ CUESTA, Jaime Luis

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **DISPOSITIVO Y PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE CÉLULAS PARA VITRIFICACIÓN ULTRA-RÁPIDA POR DESHIDRATACIÓN**

57 Resumen:

Dispositivo y procedimiento de preparación de células para vitrificación ultra-rápida por deshidratación. La vitrificación es muy empleada en el área de la medicina reproductiva para la criopreservación de óvulos y embriones. La reducción del tiempo requerido para completar el proceso de vitrificación evita exponer a las muestras a condiciones de cultivo sub-óptimas, y permite mejorar el flujo de trabajo. En la presente invención se establece que la duración óptima de la exposición de óvulos y embriones humanos a las soluciones hipertónicas de crioprotectores empleadas para preparar a estos para la vitrificación, es aquella en que las células alcanzan el punto máximo de deshidratación, correspondiente al punto mínimo de la excursión volumétrica. Dos exposiciones consecutivas de 60 segundos a dos soluciones hipertónicas estándar con una concentración creciente de crioprotectores (20% v/v y 45% v/v, respectivamente) es suficiente para preparar estas células para su vitrificación con el dispositivo cerrado SafeSpeed.

ES 2 737 681 A1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y procedimiento de preparación de células para vitrificación ultrarápida por deshidratación

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

El procedimiento descrito se centra en el sector biotecnología y la criopreservación de material biológico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Cuando los líquidos presentes en sistemas biológicos son sometidos a un enfriamiento por debajo de su punto de fusión, se generará un ambiente termodinámico favorable para que se produzca un cambio de fase al estado sólido, habitualmente por cristalización (Wowk, 2010). Sin embargo, esta formación de cristales hielo puede causar daños en las estructuras biológicas y comprometer su viabilidad.

20 Es por ello que para la criopreservación de células se pretende, con diferentes técnicas, que su contenido acuoso celular (citosol) vitrifique, es decir, alcance la transición vítrea, minimizando o evitando por completo la nucleación y crecimiento de cristales de hielo. La vitrificación permite que las moléculas de agua del citosol queden inmovilizadas manteniendo la configuración desordenada propia del estado líquido, permitiendo preservar las estructuras celulares intactas. Que se produzca esta transición vítrea intracelular dependerá de las características del citosol, como la viscosidad y la concentración de solutos, y de las velocidades a las que se produzca el enfriamiento y recalentamiento. Actualmente se emplean principalmente 3 técnicas para la criopreservación celular que permiten alcanzar la transición vítrea del citosol: el slow-freezing, la vitrificación basada en el equilibrio y la vitrificación ultrarápida (MAZUR, 1963; Pegg, Wang, & Vaughan, 2006; Rall & Fahy, 1985).

30 La técnica que atañe a la presente invención es la vitrificación ultrarápida, no basada en el equilibrio termodinámico. Mediante un enfriamiento y recalentamiento a altas velocidades (miles o cientos de miles de grados por minuto, de ahí su nombre), se pretende alcanzar la temperatura de transición vítrea (T_g) sin que se produzca nucleación o crecimiento de cristales de hielo, ni dentro ni fuera de la célula. A pesar

35

de que durante el enfriamiento la formación de hielo es termodinámicamente favorable, simplemente, por falta de tiempo, las moléculas de agua no consiguen formar la estructura cristalina. Estas permanecen en estado desorganizado hasta que alcanzan el estado de sólido amorfo característico de la vitrificación y se detienen las reacciones biológicas, quedando criopreservada la célula (Baudot, Alger, & Boutron, 2000; Rall, 1987)

Durante un proceso de vitrificación ultrarápida, que se produzca o no la indeseada formación de hielo dependerá de las velocidades de enfriamiento y recalentamiento alcanzadas, y de ciertas características de la solución, como la concentración de solutos y su viscosidad. Dichas características determinarán las propiedades coligativas de la solución y la tendencia a la nucleación de cristales de hielo, es decir, la habilidad de las moléculas para organizarse y formar una estructura cristalina. Por último, el volumen y geometría de la solución donde están suspendidas las células determinará la eficiencia de la transferencia de calor durante el enfriamiento y recalentamiento (Risco, Elmoazzen, Doughty, He, & Toner, 2007)

Los procedimientos actuales de criopreservación de células por vitrificación ultrarápida se pueden dividir, en general, en 6 fases:

i) preparación de las células para su vitrificación. Es la fase del procedimiento de vitrificación que se mejora en la presente invención. Las células son expuestas a soluciones hipertónicas para modificar por osmosis las características del citosol de modo a favorecer la tendencia a la vitrificación del mismo. Los mecanismos principales que intervienen son la evacuación de agua intracelular y la permeación de crioprotectores. El objetivo es alcanzar la concentración intracelular de solutos crítica: aquella que permite una vitrificación exitosa a unas determinadas velocidades de enfriamiento y recalentamiento.

Por lo general, esta fase se subdivide en 2 etapas: i) la etapa de equilibrado, en la cual las células se exponen de forma gradual o directa a una o más soluciones, denominadas de equilibrado, durante un tiempo prolongado. La duración de la exposición, generalmente entre 8 y 15 minutos, pretende permitir que se alcance el equilibrio osmótico entre el citosol y dicha solución. En la etapa ii), las células se suspenden en una solución de vitrificación, con una concentración de crioprotectores elevada (normalmente superior al 45% w/w), donde se realiza la carga en el dispositivo de vitrificación. La exposición a esta solución de vitrificación tiene una duración muy

limitada, por lo general 60 segundos. Los crioprotectores permeables más empleados son: etilenglicol, dimetil sulfóxido, 1-2 propanodiol, glicerol. Los crioprotectores no permeables más empleados son: sacarosa, trehalosa y ficoll.

5 ii) carga de la(s) células a criopreservar, suspendas en la solución de vitrificación, en un dispositivo de vitrificación. El volumen de solución en el que las células son cargadas en dicho dispositivo, y las características del mismo, determinarán las velocidades de enfriamiento y recalentamiento;

10 iii) enfriamiento. Por lo general es realizado mediante inmersión en nitrógeno líquido. Determinará la velocidad de enfriamiento alcanzada, y por ende, si ésta es suficientemente rápida para alcanzar la temperatura de transición vítrea (T_g) sin que se produzca la nucleación y crecimiento de cristales de hielo;

iv) almacenamiento a temperaturas criogénicas. Es imprescindible para mantener el estado vítreo durante el mismo;

15 v) recalentamiento. El modo en que sea realizado determinará la velocidad de recalentamiento, que debe ser lo más elevada posible para evitar el riesgo de nucleación y crecimiento de cristales de hielo;

vi) lavado. Las células se rehidratan de forma controlada por exposición a soluciones con agentes osmóticos no permeables, y son expulsados los crioprotectores permeables que hayan penetrado en el citosol.

20

Un proceso exitoso de vitrificación de una célula viva se define como aquel durante el cual las células vivas criopreservadas sobreviven al proceso sin ver afectada su competencia. Los factores que pueden dañar las células vivas durante su vitrificación son:

25 i) nucleación y crecimiento de hielo intracelular. Puede producirse durante el enfriamiento, aunque el riesgo es mayor durante el recalentamiento (Seki & Mazur, 2009). La cantidad y tamaño alcanzado por los cristales de hielo determinará el daño causado a las células.

30 ii) stress osmótico y mecánico. Durante la fase de preparación, las soluciones con crioprotectores provocan un stress osmótico que puede llegar a comprometer la supervivencia de las células vivas a criopreservar. La deshidratación durante la fase de preparación para la vitrificación, y la rehidratación posterior al recalentamiento durante la fase de lavado, provocan excursiones volumétricas de la membrana celular y un consecuente stress mecánico. Estos procesos de reducción y aumento del
35 volumen, denominados encogimiento e hinchamiento (shrinking y swelling, en inglés)

pueden comprometer la viabilidad de la célula, por ello el flujo acuoso debe ser controlado.

iii) Citotoxicidad de los crioprotectores. Dependerá de la concentración y el tiempo de exposición a los mismos.

5

En la presente invención se describe un dispositivo y procedimiento para reducir sensiblemente el tiempo de preparación de células para su vitrificación ultrarrápida, en comparación con las técnicas actualmente disponibles. Aplicada en el campo de la reproducción humana asistida, para la vitrificación de gametos y embriones, permite
10 reducir hasta en un 90% la duración de la fase de preparación de estas células para la vitrificación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 **Problema técnico planteado**

En la actualidad, los protocolos de preparación de óvulos y embriones humanos para su criopreservación por la técnica de vitrificación ultrarrápida, incorporan una fase de equilibrado de una duración de entre 8 a 15 minutos (Kuwayama, 2007; Medicine,
20 2012; Stoop et al., 2012; Vanderzwalmen et al., 2009). Durante esta fase, las células se exponen a una o más soluciones hipertónicas, denominadas por lo general soluciones de equilibrado. Al exponer a la célula a una concentración de solutos extracelular elevada, se produce en primer lugar una rápida deshidratación y penetración de crioprotectores, que se traduce en una reducción volumétrica de la
25 célula. A continuación, se produce una recuperación gradual del volumen, a medida que se avanza hacia el equilibrio osmótico. La duración total de esta fase es de entre 8 y 15 minutos, cuando se considera que se ha restablecido dicho equilibrio.

Tras esta primera fase, se emplea una segunda solución con mayor concentración de
30 crioprotectores: la solución de vitrificación. La exposición a esta solución es breve, no se prolonga hasta alcanzar el equilibrio osmótico. El tiempo de exposición a esta segunda solución se limita por lo general a un máximo de 60 segundos, tras el cual las células se cargan en el dispositivo de vitrificación y se procede al enfriamiento. Durante esta fase se produce una nueva deshidratación y permeación de
35 crioprotectores debido al gradiente osmótico. (Risco Delgado, R., Univ. Sevilla,

ES2459893B2; Kuwayama, M., & Inoue, F. Kitazato Biopharma, ES20040727428T; Vanderzwalmen, P., IVF Zentren Prof. Zech Bregenz GmbH, Grant EP2337449B1; Forest, K., Vitrolife Ab, US20060234204A1; Stachecki, J., Tyho-Galileo Research Laboratories US20060046243A1).

5

En el área de la medicina reproductiva, en los laboratorios de fecundación in vitro, la trazabilidad de las muestras a criopreservar es vital. Este factor hace que los procedimientos de vitrificación de óvulos y embriones humanos nunca se superpongan en un mismo puesto de trabajo; existe una limitación física y de recursos que
10 determina el número de procedimientos de vitrificación que se pueden realizar en un espacio de tiempo. Por tanto, la reducción del tiempo requerido para completar el proceso de vitrificación es deseable y objeto de interés científico.

Este es el problema técnico que se resuelve en la presente invención. En primer lugar,
15 la exposición prolongada a crioprotectores potencialmente citotóxicos supone un riesgo para las células vivas a criopreservar. Por otro lado, la duración prolongada de los procedimientos de preparación de células para su criopreservación limitan la escalabilidad y eficiencia de la técnica de vitrificación ultrarápida. A continuación se describe un dispositivo y procedimiento que permite alcanzar la concentración
20 intracelular crítica de solutos necesaria para una vitrificación exitosa con una reducción significativa del tiempo de preparación de las células para el proceso.

Resolución del problema técnico planteado

25 La conductividad hidráulica de la membrana plasmática y su permeabilidad específica ante crioprotectores como el etilenglicol o el dimetil sulfóxido es elevada en el rango de temperaturas (entre 21-37 °C) al que se lleva a cabo el proceso de preparación de células para la vitrificación (Paynter, Cooper, Gregory, Fuller, & Shaw, 1999). Por este motivo, la evacuación del contenido acuoso y la permeación de crioprotectores a
30 través de la membrana plasmática de óvulos y embriones humanos se produce de forma rápida. En un tiempo reducido, inferior a 60 segundos con las soluciones descritas en los ejemplos de la presente invención, se alcanza el punto mínimo de contenido acuoso intracelular. Este punto de máxima deshidratación presenta un aumento de la concentración de solutos nativos celulares (proteínas, polisacáridos,
35 ácidos nucleicos, sales, etc.) y una reducción de las moléculas libres de agua, lo que

aumenta la tendencia a la vitrificación del citosol. Además, en el tiempo de exposición a la solución hipertónica en el que se alcanza este punto de máxima deshidratación, los crioprotectores permeables presentes en dicha solución, si los hubiese, habrán penetrado en el citosol contribuyendo a la concentración de solutos intracelular total de forma significativa.

Por tanto, la acción osmótica relevante para alcanzar la concentración de solutos crítica intracelular necesaria para la vitrificación se produce en los primeros segundos de exposición de las células a dichas soluciones, mientras la célula reduce su volumen (figura 1). Una vez completado este primer tramo de reducción volumétrica, en el punto que denominamos de deshidratación máxima, la células comienzan a recuperar su volumen a medida que avanzan hacia el equilibrio osmótico (figura 1). Durante este segundo tramo de la curva no se mejora de forma sensible la concentración de solutos intracelular. Por tanto, las concentraciones de solutos en el punto de mínimo volumen de la curva de deshidratación-rehidratación, y en el punto final de la exposición de 8-15 minutos, considerado como el punto de equilibrio osmótico, pueden ser consideradas equivalentes. Consecuentemente, en la presente invención se establece que es innecesario prolongar la exposición de las células a las soluciones hipertónicas de preparación para alcanzar dicho equilibrio osmótico; la forma más eficiente de aumentar la concentración intracelular de solutos con objeto de preparar las células para su vitrificación es realizar una o más exposiciones a soluciones hipertónicas, con una duración limitada al punto de volumen mínimo de la resultante excursión volumétrica.

Se debe tener en consideración que la evacuación del contenido acuoso intracelular durante este procedimiento no debe producir una deshidratación de tal magnitud que comprometa la supervivencia de la célula. Se debe provocar un caudal volumétrico de agua y crioprotectores que permita mantener la integridad de la membrana plasmática y otras ultraestructuras biológicas relevantes de las células.

Las soluciones hipertónicas empleadas deben estar compuestas de crioprotectores permeables como etilenglicol, dimetilsulfóxido, una combinación de los mismos o similares y crioprotectores no permeables como sacarosa, trehalosa, ficoll o similares. Además deben tener una base de tampón fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) o cualquier solución vehículo similar que permita diluir los crioprotectores. Otro

componente de dichas soluciones es el polímero sintético hidroxipropil celulosa con masa molecular media de 80.000 Dalton o similar, o cualquier otro polímero o proteína que actúe como espesante para alcanzar una viscosidad adecuada y como agente surfactante para permitir la manipulación de las células vivas in vitro. La solución de vitrificación debe tener una tendencia a la vitrificación suficiente para evitar la formación de hielo extracelular lesivo durante el enfriamiento y recalentamiento.

El procedimiento descrito establece que la duración óptima de la exposición de las células a las soluciones hipertónicas empleadas en la preparación para la vitrificación es aquella en que estas alcanzan el punto de mínimo volumen y máxima deshidratación. De este modo, con una breve exposición a una o más soluciones hipertónicas, es posible alcanzar la concentración intracelular crítica de solutos necesaria para la vitrificación, a las velocidades de enfriamiento y recalentamiento actualmente alcanzables, por ejemplo, con el dispositivo SafeSpeed o similares (Risco Delgado, R., Univ. Sevilla, ES2459893B2), reduciendo el tiempo de preparación en hasta un 90%.

Este procedimiento debe de llevarse a cabo usando un dispositivo de vitrificación como SafeSpeed (Risco Delgado, R., Univ. Sevilla, ES2459893B2), que permita alcanzar unas velocidades de enfriamiento y recalentamiento suficientes para una vitrificación exitosa con la concentración intracelular de solutos resultante del protocolo de preparación de las células. Es con este dispositivo, usado anteriormente con protocolos de preparación convencionales, con el que se ha testado la presente invención. Algunos detalles relevantes del dispositivo de vitrificación SafeSpeed son se comentan a continuación.

SafeSpeed consiste en un contenedor compuesto por varias partes, fabricado en polímero termoplástico, optimizado como sistema cerrado para los procedimientos de criopreservación, para obtener, junto con el procedimiento descrito en la patente, velocidades de recalentamiento ultrarápidas. El dispositivo SafeSpeed presenta dos particularidades:

1) El almacenamiento del ovocito se produce en un contenedor cerrado que consigue la vitrificación de las muestras con unas tasas de recuperación iguales o superiores a las de cualquier dispositivo abierto. El procedimiento se basa en el uso de

un microcapilar de polímeros termoplásticos de reducidas dimensiones y cerrado por ambos extremos, llamado SafeSpeed.

2) La principal característica de este dispositivo es que, siendo cerrado, garantiza una velocidad de recalentamiento por encima de 200.000 °C/min (Gallardo et al., 5 2016).

Además, SafeSpeed cuenta con dos posibles extensiones: i) La existencia de una posible barrera interior dentro del microcapilar (que puede ser implementada mediante la colocación de otro microcapilar en su interior), que facilita el posicionamiento de la muestra biológica (embrión/ovocito); y ii) La existencia de un posible embudo en la punta del microcapilar que facilita la carga de la muestra biológica dentro del dispositivo y que evita cualquier contacto de la superficie exterior del microcapilar con el medio en que está dicha muestra, reduciendo a cero la posibilidad de portar agentes contaminantes dentro del tanque de almacenamiento, no sólo porque el contenedor es cerrado, sino también porque la superficie exterior del dispositivo nunca está en contacto con el medio que contiene la muestra biológica (Ramon Risco Delgado; 10 patente, ES2459893; adición: P201201020).

Así, el dispositivo SafeSpeed puede construirse en cuatro versiones:

- 20 - Versión 1: SAFESPEED: Sin barrera ni embudo
- Versión 2: SAFESPEED-BARRIER: Con barrera, pero sin embudo.
- Versión 3: SAFESPEED-FUNNEL: Con embudo, pero sin barrera.
- Versión 4: SAFESPEED-BARRIER-FUNNEL: Con barrera y embudo.

25 **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Figura 1: Simulación del volumen relativo y la concentración intracelular de solutos de unos óvulos humano en estado Metafase-II durante su exposición a soluciones hipertónicas. En el ejemplo A, se realiza la exposición siguiendo el procedimiento de la presente invención: la duración de la exposición de la célula a las soluciones hipertónicas se limita a 60 segundos cada una. En el caso B, se muestra uno los protocolos estándar actuales: la duración de la exposición a la primera solución de equilibrado (1) se prolonga durante 10 minutos, según los protocolos habituales, para permitir que se recupere el equilibrio osmótico. La exposición a la solución de vitrificación (2) dura 60 segundos. El volumen celular está representado por la línea 30 35

continua, y la concentración intracelular de solutos por la línea discontinua. La exposición a la solución 1 (7.5% v/v Me₂SO and 7.5% v/v EG) comienza en t=0, y el cambio a la solución 2 (15% v/v Me₂SO, 15% v/v EG and 0,5M sacarosa) están indicados en el eje X. La simulación se ha realizado en MatLab usando un modelo biofísico de permeabilidad de dos parámetros, similar al empleado por Saenz J. y cols. (2009).

Figura 2: Gráfico de la excursión volumétrica experimentada in vivo por un óvulo Metafase-II humano sujeto a DP: protocolo corto de preparación basado en la presente invención, según descrito en el Ejemplo 1, y EP: protocolo estándar basado en el equilibrado. El proceso se ha grabado con un sistema de adquisición de vídeo conectado a un microscopio invertido. Un fotograma cada 10 segundos se ha analizado para determinar la excursión volumétrica del óvulo relativa al volumen isotónico. El volumen se ha calculado a partir del área observada en el fotograma, asumiendo que el óvulo permanece en forma esférica perfecta durante el proceso. La exposición a la solución 1 (7.5% v/v Me₂SO and 7.5% v/v EG) comienza en t=0, y el cambio a la solución 2 (15% v/v Me₂SO, 15% v/v EG and 0,5M sacarosa) están indicados en el eje X.

Figura 3: Fotogramas de la excursión volumétrica de un óvulo humano en Metafase-II durante la exposición al siguiente régimen de deshidratación-rehidratación: (A) Solución isotónica base (fosfato salino tamponado e hidroxipropil celulosa); (B) óvulo tras 60 segundos de exposición a la solución hipertónica de deshidratación 1 (7.5% v/v Me₂SO and 7.5% v/v EG): se observa una reducción del volumen por la evacuación del contenido acuoso; (C) Óvulo tras 60 segundos de exposición a la solución hipertónica de deshidratación 2 (15% v/v Me₂SO, 15% v/v EG and 0,5M sacarosa): al aumentar el gradiente osmótico, el volumen se reduce hasta un nuevo punto mínimo, alcanzándose una concentración crítica de solutos apropiada para la vitrificación exitosa a las velocidades de enfriamiento y recalentamiento alcanzadas con el dispositivo SafeSpeed o similares. (D) Óvulo tras 60 segundos de exposición a solución de rehidratación 1 (solución base con sacarosa 1M), comenzando la rehidratación; (E) Óvulo tras 180 segundos de exposición a solución de rehidratación 2 (solución base, con sacarosa 0.5M), donde prosigue la rehidratación de forma controlada para evitar el hinchamiento excesivo. (F) Óvulo tras 5 minutos en solución de rehidratación 3 (solución base, sin agentes osmóticos), donde finaliza la

rehidratación. Nota: El Óvulo se expone de forma secuencial a las soluciones descritas. El tiempo total de deshidratación es de 120 segundos, y el de rehidratación de 540 segundos.

- 5 Figura 4: Representación del dispositivo SafeSpeed. Contiene las ideas del dispositivo básico sin extensiones. En la figura se aprecian sus distintas partes: el microcapilar, la pajuela principal, la pajuela exterior, el protector, la hendidura, la zona de escritura y el postizo. El microcapilar tiene un acabado cónico en su extremo. El protector también tiene acabado cónico, en este caso para impedir el desplazamiento del mismo cuando
10 son alcanzadas sus posiciones extremas.

Descripción detallada de la invención

La concentración de solutos del citosol debe alcanzar un punto crítico que permita una
15 vitrificación exitosa a determinadas condiciones de enfriamiento y recalentamiento. La tendencia a la vitrificación del citosol se verá determinada principalmente por el contenido acuoso libre del mismo y por la presencia y concentración de solutos, tanto propios del citosol como moléculas inhibitoras de la formación de hielo (crioprotectores) que hayan penetrado la membrana celular durante la preparación de
20 las células vivas para su criopreservación por exposición a soluciones hipertónicas.

Cuando las células son expuestas a soluciones hipertónicas se produce una rápida deshidratación debido a la elevada conductividad hidráulica de la membrana plasmática: como resultado, en un breve periodo de tiempo, la célula alcanza un
25 volumen mínimo en el que su contenido acuoso es mínimo. Sólo por este proceso de deshidratación, debido a la presencia de proteínas y polisacáridos celulares, la concentración citosólica de solutos aumenta considerablemente. Si la solución hipertónica en cuestión está compuesta por crioprotectores permeables, se producirá además una penetración de crioprotectores hacia el citosol, lo que contribuirá a la
30 concentración de solutos intracelular. Cuando la célula alcanza el volumen mínimo en una solución hipertónica, la concentración de solutos intracelular será, debido a estos dos fenómenos, muy similar a la de concentración de solutos extracelular. A partir de este punto bajo, el gradiente osmótico entre el interior y el exterior de la célula es bajo, por lo que se produce un flujo de caudal reducido hacia el interior celular de
35 crioprotectores y agua. Esto se observa como una recuperación volumétrica gradual, hasta que se alcanza aparentemente el volumen isotónico inicial de la célula viva a

criopreservar, coincidente con el restablecimiento del equilibrio osmótico. Esto se conoce como la 'Shrink-Swell curve' o curva de reducción y aumento volumétrico (Fahy, G. M., 2007).

5 La presente invención explota el hecho de que la concentración de solutos intracelular en el punto de volumen mínimo no mejora sensiblemente al aumentar el tiempo de exposición a la solución, es decir, por permitir el equilibrado osmótico. Por tanto, el punto de volumen mínimo de la curva de excursión volumétrica debe ser usado como referencia para la duración óptima de la exposición de las células a las soluciones
10 hipertónicas. Por este motivo, la forma más eficiente y rápida de preparar una célula para su vitrificación es por exposición a una o más soluciones hipertónicas, siendo la duración de la exposición más eficiente aquella en la que la célula a criopreservar alcanza su volumen mínimo. El uso de este paradigma permite reducir la duración de los procedimientos de preparación de las células para su vitrificación de forma
15 ostensible, como se ejemplifica a continuación.

EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1

20 En el presente ejemplo se ilustra una de las formas en las que se pueden preparar células vivas, en concreto óvulos humanos en estadio Metafase-II, para su criopreservación por vitrificación ultrarápida, por medio del procedimiento descrito, empleando el dispositivo SafeSpeed.

25 El procedimiento y las soluciones empleadas se realizan a temperatura de 23-27 °C. En primer lugar se traslada el óvulo (u óvulos) a preparar para la vitrificación del medio de cultivo a un volumen de 200 µL de una solución salina tamponada suplementada con 0.06-0.125 mg/mL de hidroxipropil celulosa (80 kDa), conteniendo una
30 combinación de 7.5% v/v de crioprotector permeable etilenglicol y 7.5% v/v dimetilsulfoxido.

Tras un minuto de exposición a esta solución (ver figura 1), se recupera el óvulo con una pipeta de diámetro adecuado y se traslada a un segundo volumen de 200 µL de
35 una solución salina tamponada suplementada con 0.06-0.125 mg/mL de hidroxipropil

celulosa (80 kDa), conteniendo una combinación de 15% v/v de crioprotector permeable etilenglicol y 15% v/v dimetilsulfoxido.

5 Durante los últimos 20 segundos de exposición a la solución anteriormente descrita, el óvulo se carga en el soporte de vitrificación: por ejemplo, en el caso del soporte de vitrificación safespeed (Gallardo, M., et al., 2016), el óvulo es aspirado dentro de un capilar, sellado herméticamente en ambos extremos y sumergido en nitrógeno líquido para su enfriamiento. Para su recalentamiento, se sumerge el capilar expuesto en agua estéril a 37 °C, obteniendo una velocidad de recalentamiento de
10 aproximadamente 120.000 °C/min. Acto seguido, se corta el extremo del capilar y el óvulo se expelle en un volumen de 200 ul de solución hipotónica con una concentración 1 Molar de sacarosa. Al cabo de un minuto de exposición, se traslada a un volumen de 200 ul de solución hipotónica con una concentración de 0.5 molar de sacarosa, y finalmente se traslada a un volumen de 200 ul de la solución salina
15 tamponada sin agentes osmóticos durante 5 minutos, donde el óvulo termina de rehidratarse. Acto seguido puede ser trasladado al medio de cultivo apropiado.

Ejemplo 2:

20 Vitrificación de 34 cigotos murinos FVBxCD1 en día 1 de desarrollo (24 horas post-fertilización) tras un protocolo de preparación basado en la presente invención como el descrito en el ejemplo 1. En resumen, se exponen durante 60 segundos a una solución hipertónica de deshidratación 1 (7.5% v/v Me₂SO and 7.5% v/v EG), seguidos de 60 segundos de exposición a solución hipertónica de deshidratación 2 (15% v/v Me₂SO,
25 15% v/v EG and 0,5M sacarosa). Durante los últimos 30 segundos de exposición a la anterior solución, se cargan 4 embriones en un soporte de vitrificación SafeSpeed, siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se sumerge en nitrógeno líquido. El soporte de vitrificación es recalentado en un baño de agua estéril y los embriones se expulsan en 1 mL de solución de rehidratación 1 (sacarosa 1 M), donde permanecen
30 durante 60 segundos, siendo transferidos acto seguido a la solución de rehidratación 2 (0.5 M de sacarosa) durante 180 segundos y por último a una solución sin crioprotectores, donde permanecen 300 segundos.

Una vez finalizada la intervención experimental de deshidratación, enfriamiento,
35 recalentamiento y rehidratación, los embriones permanecen en cultivo, siguiendo las

prácticas operacionales estándar del laboratorio. Los resultados se comparan con un grupo control de 43 cigotos que no han sido sometidos a la intervención. A las 2 horas post-fertilización se evalúa la supervivencia: 33/34 (97%) embriones sobreviven al proceso de vitrificación. A las 120 horas se evalúa el desarrollo mediante la tasa de llegada a blastocisto: no se observa una disminución de la probabilidad de llegada a blastocisto por la vitrificación con el protocolo de preparación descrito (OR 0,89; 0,34-2,31).

Ejemplo 3:

Exposición de 20 blastocistos murinos FVBxCD1 al protocolo de preparación para vitrificación ultrarápida descrito en el ejemplo 1. A las 2 horas se comprueba la supervivencia morfológica de 18/20 (90%) de los blastocistos.

Referencias:

Wowk, B. (2010). Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 60(1), 11-22.

Rall, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387–402 (1987).

Baudot, A., Alger, L., & Boutron, P. (2000). Glass-forming tendency in the system water–dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 40(2), 151-158.

Risco, R., Elmoazzen, H., Doughty, M., He, X., & Toner, M. (2007). Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. *Cryobiology*, 55(3), 222-229.

Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73-80.

Vanderzwalmen, P., et al., (2009). Aseptic vitrification of blastocysts from infertile patients, egg donors and after IVM. *Reproductive biomedicine online*, 19(5), 700-707;

Stoop, D., De Munck, N., Jansen, E., Platteau, P., Van den Abbeel, E., Verheyen, G., & Devroey, P. (2012). Clinical validation of a closed vitrification system in an oocyte-donation programme. *Reproductive biomedicine online*, 24(2), 180-185.

Medicine, A. S. I. R. (2012). The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reproductive biomedicine online*, 25(2), 146-167.

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

Fahy, G. M. (2007). Theoretical considerations for oocyte cryopreservation by freezing. *Reproductive biomedicine online*, 14(6), 709-714.

5 Gallardo, M., Hebles, M., Migueles, B., Dorado, M., Aguilera, L., González, M., & Risco, R. (2016). Thermal and clinical performance of a closed device designed for human oocyte vitrification based on the optimization of the warming rate. *Cryobiology*, 73(1), 40-46.

Saenz, J., Toner, M., & Risco, R. (2009). Comparison between ideal and nonideal solution models for single-cell cryopreservation protocols. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(14), 4853-4864.

10

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo y procedimiento para preparar células para su criopreservación por vitrificación ultrarápida en un tiempo sensiblemente inferior a los procedimientos
5 actuales.
2. Dispositivo y procedimiento según reivindicación 1 en el que las células son óvulos o embriones en día 1 a 7 de desarrollo.
- 10 3. Dispositivo y procedimiento según reivindicación 2 en el que los óvulos o embriones en día 1 a 7 de desarrollo son humanos.
4. Dispositivo y procedimiento caracterizado por lograr una concentración de solutos crítica en el citosol de las células a criopreservar mediante la exposición de las mismas
15 a una solución o serie de soluciones hipertónicas.
5. Dispositivo y procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por ser la concentración de solutos crítica del citosol aquella que lo dota de unas propiedades que permiten que se produzca una vitrificación exitosa al ser sometido a velocidades
20 de enfriamiento y recalentamiento como las obtenidas con el dispositivo de vitrificación SafeSpeed o similares, evitando que se produzca la formación de hielo extra e intracelular lesivo durante el proceso.
6. Dispositivo y procedimiento según reivindicación 4 en el que se considera que la
25 duración óptima de la exposición de las células a criopreservar a una solución o serie de soluciones hipertónicas es aquella que le permite alcanzar el punto mínimo de la excursión volumétrica provocada por el gradiente osmótico.
7. Dispositivo y procedimiento según reivindicación 6 en el que se considera que la
30 duración de la exposición de las células a criopreservar a las soluciones hipertónicas se puede acortar o prolongar para acomodar las necesidades de manipulación y carga de las células en los dispositivos de vitrificación empleados.
8. Dispositivo y procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por no requerir
35 la permeación de los crioprotectores a través de la membrana celular para alcanzar la

concentración crítica de solutos en el citosol, aunque no se evite específicamente si estos fuesen capaces de penetrar en las células en las condiciones aplicadas.

5 9. Dispositivo y procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por el uso de soluciones hipertónicas cuya molaridad no provoque un stress osmótico o mecánico que comprometa la supervivencia y competencia biológica de las células vivas a criopreservar.

10 10. Dispositivo y procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por emplear una exposición directa o gradual de las células vivas a las soluciones hipertónicas para alcanzar la concentración de solutos crítica en el citosol.

15 11. Dispositivo y procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por el uso de crioprotectores no permeables (como por ejemplo sacarosa, o similares) y/u/o crioprotectores permeables (como por ejemplo etilenglicol, dimetilsulfóxido o similares) como agentes osmóticos de las soluciones hipertónicas.

20 12. Dispositivo y procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por la utilización de fosfato tamponado salino (PBS por sus siglas en inglés) o similar como base para las soluciones hipertónicas empleadas para la preparación de las células vivas para su vitrificación.

25 13. Dispositivo y procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por la utilización del polímero sintético hidroxipropil celulosa con masa molecular media de 80.000 Da, o similares, como agente surfactante y espesante de las soluciones hipertónicas empleadas para la preparación de las células vivas para su vitrificación.

Figura 1

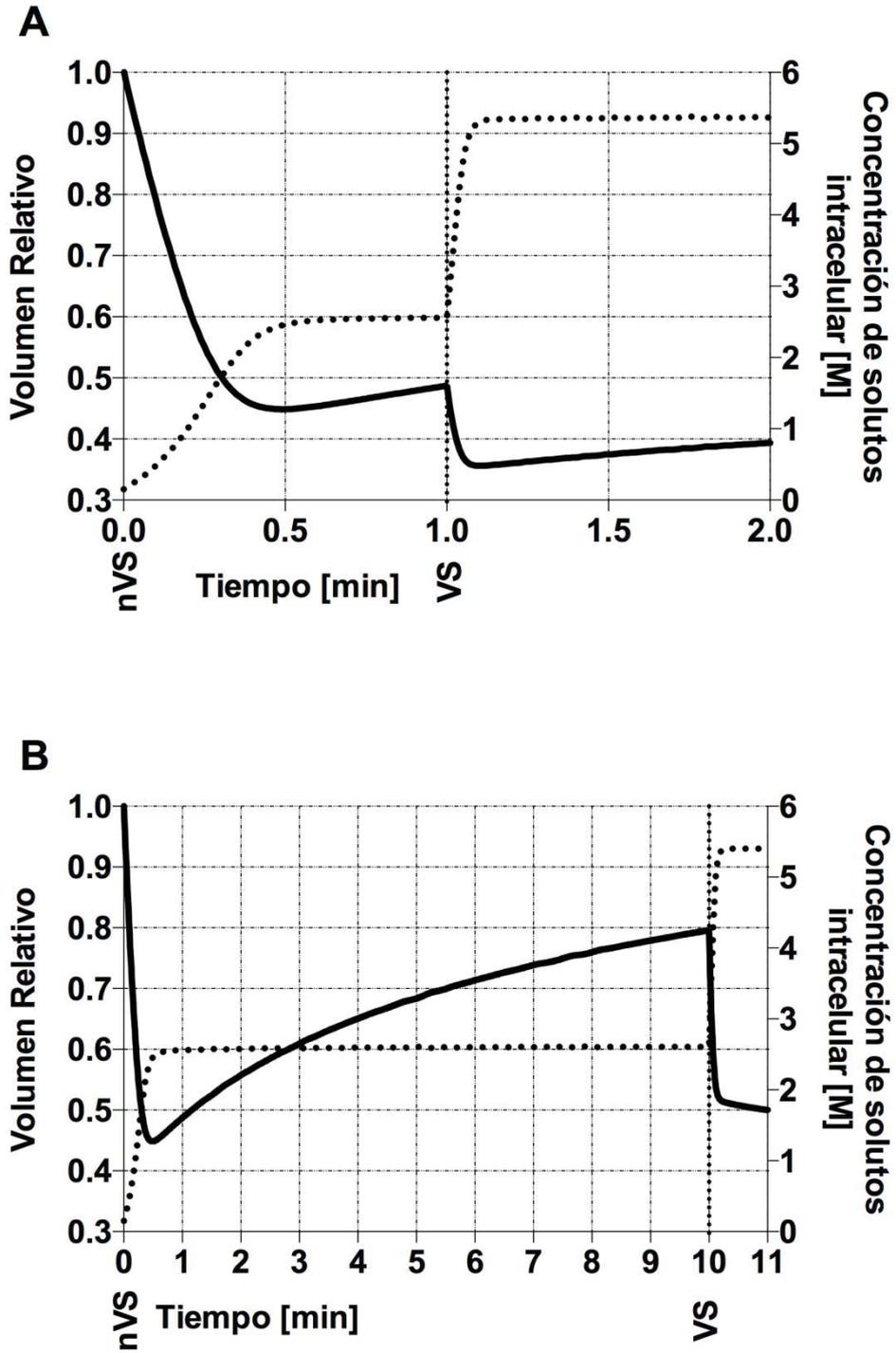


Figura 2

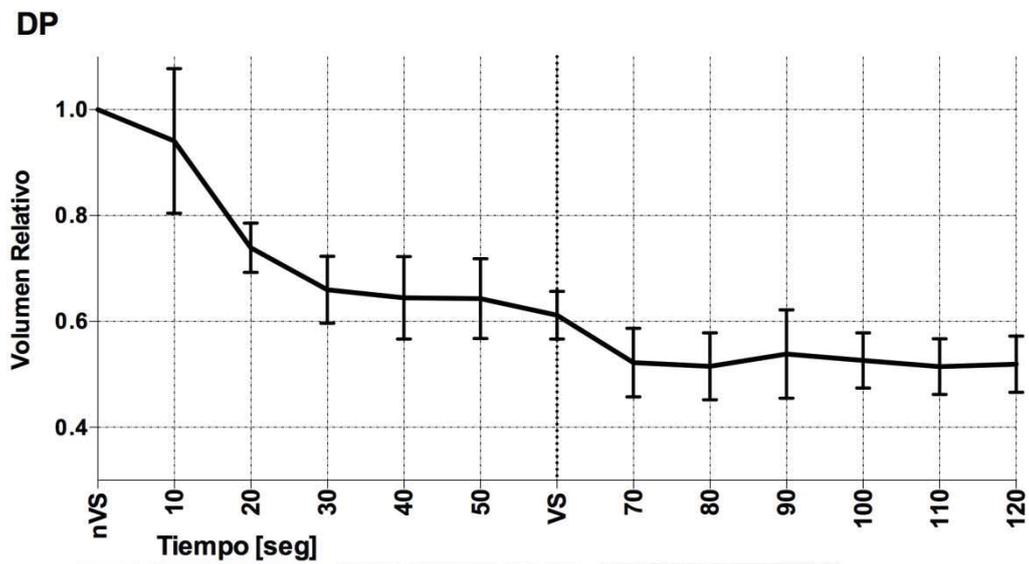
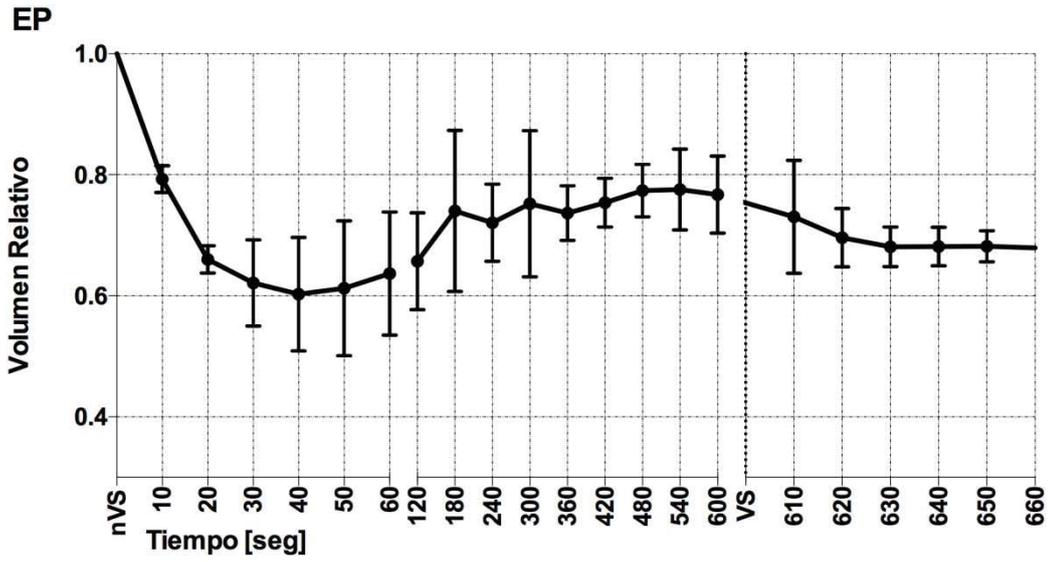


Figura 3

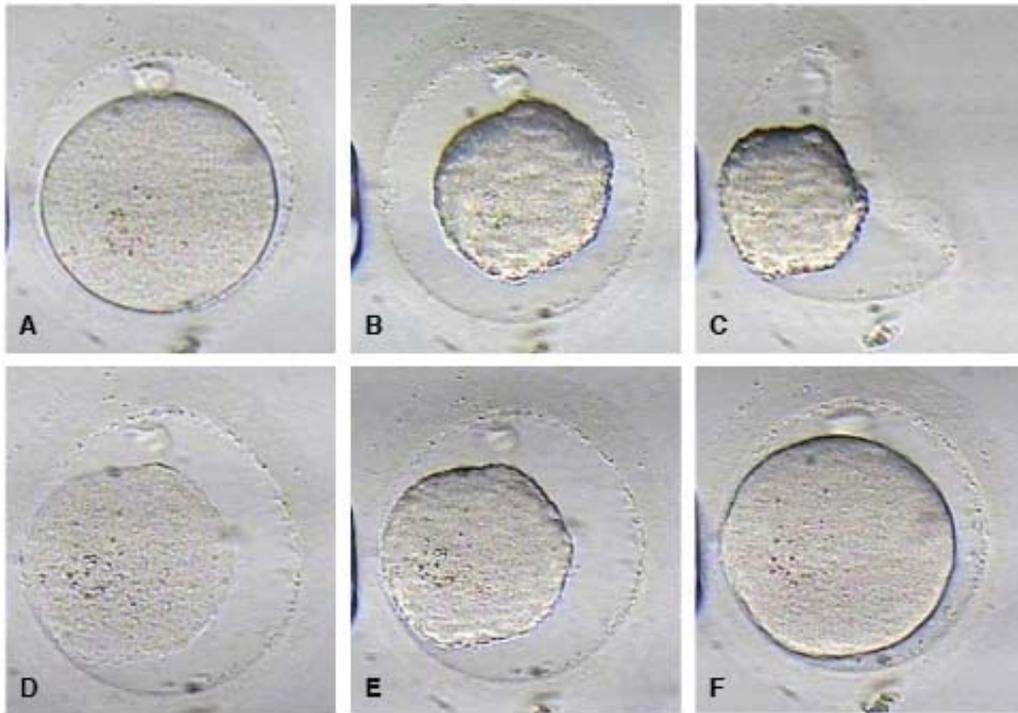
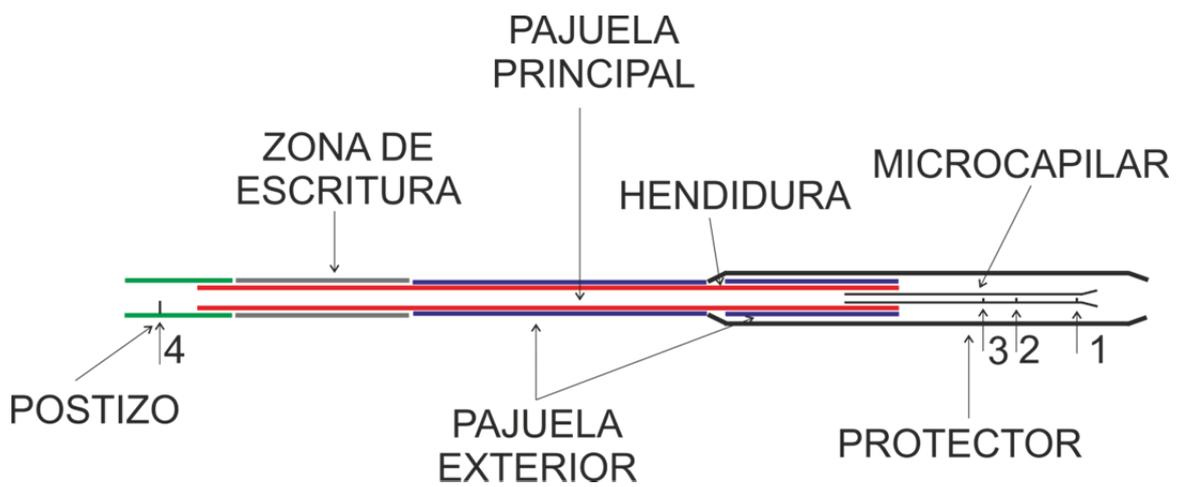


Figura 4





- ②① N.º solicitud: 201830694
②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.07.2018
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
Y	US 2002115054 A1 (FOREST KATRINA T <i>et al.</i>) 22/08/2002, Párrafos [0007], [0009], [0014], [0022]), [0024],[0031], [0032], [0037], [0040], [0042], [0044], [0060], [0061] y [0125].	1-13
Y	JP 2011111406 A (KITAZATO BIOPHARMA CO LTD) 09/06/2011, (resumen) (en línea) (Recuperado el 23/04/2019) recuperado de EPO EPODOC Database.	1-13
X	ES 2459893 A2 (UNIV SEVILLA) 12/05/2014, Páginas 20 y 21.	1-13
A	US 2006246414 A1 (CHANG CHIA-CHIEH <i>et al.</i>) 02/11/2006, párrafos [0012], [0014], [0015], [0016], [0023], [0029], [0036], [0050], [0053].	1-13
A	CN 101066052 A (BEIJING JINXIUDADI AGRICULTURE BEIJING GLORIOUS LAND AGRICULT) 07/11/2007, (resumen) (en línea) (recuperado el 23/04/2019) recuperado de EPO EPODOC Database.	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

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:

<p>Fecha de realización del informe 16.05.2019</p>	<p>Examinador S. González Peñalba</p>	<p>Página 1/2</p>
---	--	------------------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N1/00 (2006.01)

C12N5/071 (2010.01)

C12N5/073 (2010.01)

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

A01N, C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, NPL, INTERNET