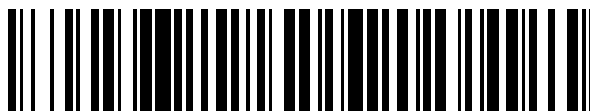


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 252**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**C12M 1/32** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2011 PCT/DK2011/050401**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12052033**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2011 E 11778505 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2629891**

54 Título: **Recipiente para cultivo, micro manipulación e identificación de pequeñas muestras**

30 Prioridad:

**22.10.2010 US 405956 P**  
**22.10.2010 DK 201070447 U**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.03.2020**

73 Titular/es:

**HERTART APS (100.0%)**  
**Korkildelund 6**  
**2670 Greve, DK**

72 Inventor/es:

**DÖRGE, HENRIK, CARLHEIM y**  
**JENSEN, BJARNE, BO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 749 252 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**

Recipiente para cultivo, micro manipulación e identificación de pequeñas muestras

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de los recipientes para cultivar y manipular muestras pequeñas.

10 En particular, esta invención se refiere al campo de los recipientes para la Tecnología de Reproducción Asistida después de la fertilización in vitro (FIV).

Antecedentes de la invención

15 Los recipientes desechables de polímeros estériles, tales como platos y placas de pocillos, son útiles cuando se manipulan muestras más pequeñas en medios líquidos, por ejemplo, durante tecnologías reproductivas artificiales como la Fertilización in Vitro (FIV) mediante la micro manipulación y el cultivo de espermatozoides, ovocitos y embriones.

20 Los recipientes actuales utilizados para la micro manipulación dentro de la FIV son principalmente platos genéricos, listos para usar, desarrollados para el cultivo de tejidos estándar. La micro manipulación de los ovocitos inmaduros, los ovocitos maduros, los gametos, los cigotos, los embriones, los embriones en etapa de escisión, los embriones en etapa de blastocisto, las células precursoras y similares, denominados en este documento "muestras", se realizan en 35 mm, 50 mm o 60 mm estándar. Placa de Petri o placa de 4 pocillos: recipientes con pocas características únicas, cada placa o pocillo simplemente tiene fondos planos transparentes y paredes laterales sustancialmente verticales.

25 El fondo plano y transparente es importante para la mayoría de las aplicaciones ya que facilita la microscopía del material biológico dentro del plato o pocillo. Una característica adicional de estos platos genéricos y platos de pocillo es la elevación de la superficie del fondo plano desde la mesa de trabajo por un borde. Este borde está en la circunferencia debajo de la superficie del fondo y generalmente tiene la ventaja de reforzar la resistencia del plato o placa del pocillo para reducir las tensiones internas y evitar la distorsión del fondo plano durante la solidificación del artículo de polímero durante la producción. Además, el borde eleva el fondo para evitar raspar la superficie inferior durante el apilamiento del plato o la placa del pocillo para el envasado, el transporte y durante la incubación. El raspado reduce la visibilidad de las muestras durante el uso y durante la microscopía.

35 En el campo de la FIV, los ovocitos y embriones humanos deben mantenerse lo más cerca posible a una temperatura estable de 37 grados centígrados. La capacidad de controlar la temperatura del fondo del plato y también la temperatura de los embriones y los ovocitos ha demostrado ser crítica para una fertilización exitosa, por ejemplo, los husillos de los ovocitos pueden desmontarse en minutos durante el cambio de temperatura.

40 La estructura de pared utilizada en placas de pocillos disponibles comercialmente tiene un nivel de base de pared más bajo que el nivel del fondo, no permitiendo el contacto entre la superficie del fondo y la superficie de trabajo calentada debajo.

45 Dentro de la FIV, el borde que eleva el fondo de placas y platos genéricos es una desventaja, ya que introduce un espacio de aire entre la superficie de la mesa de trabajo calentada y el fondo del plato o pocillo. Como el aire no es un buen transportador de calor, la temperatura en el fondo elevado de los platos y pocillos puede ser difícil de controlar en superficies de trabajo calentadas. A menudo, las manipulaciones de ovocitos/embriones se realizan dentro de una campana de flujo de aire laminar. El flujo de aire laminar crea movimientos de aire que dificultan el control de la temperatura. Sin embargo, quitar el borde debajo del recipiente de muestra de polímero, como en una placa de Petri disponible en el mercado, reduce la integridad estructural del recipiente de polímero y aumenta la probabilidad de distorsión de la superficie del fondo durante la solidificación del recipiente de polímero durante la producción, así como también aumenta el riesgo de raspar la superficie durante el apilamiento para embalaje, transporte e incubación.

55 El documento EP 0627358 divulga un aparato de cultivo de tejidos adecuado para la manipulación y el crecimiento de embriones de mamíferos. El conjunto de placa del documento EP 0627358 también comprende una tapa.

60 El documento EP 0866122 describe un conjunto de cultivo de tejidos de paredes múltiples para cultivar células que comprende una placa y una tapa extraíble. La tapa sirve para evitar la pérdida de muestra y para proteger al usuario del contenido. La placa y la tapa están dispuestas de forma segura para evitar la pérdida de muestra.

El documento US 5,691,194 describe un recipiente para concentrar espermatozoides móviles en una microcámara con estructuras que permiten la separación de espermatozoides y el aislamiento de ovocitos dentro de un volumen bajo de medio de fertilización en un procedimiento de un solo paso.

65 El apilamiento de los conjuntos de placas de la técnica anterior tiene el alto riesgo de raspar la base inferior de los conjuntos.

Otro problema está relacionado con la trazabilidad de muestras de pacientes/donantes en los diversos recipientes estándar utilizados durante el procedimiento de FIV, es el hecho de que los platos tradicionales son del tipo de placa de Petri o del tipo de placa de pocillo, donde el recipiente está completamente cubierto por una tapa. La identificación se puede hacer en la tapa, sin embargo, esta tapa puede adaptarse a otros platos de tipo similar, lo que puede provocar una falta de coincidencia de las muestras y los pacientes/donantes.

Sería altamente deseable proporcionar un recipiente para muestras que permita que el fondo plano esté en contacto con la mesa de trabajo calentada, mientras que permite el apilamiento del recipiente sin raspar la superficie del fondo.

Además, sería deseable que el recipiente tuviera una estructura que comprenda un área para que los medios de identificación no estén en la tapa desmontable.

Objeto de la invención

Es un objeto de esta invención proporcionar un recipiente de muestra de polímero que tenga una transferencia de temperatura mejorada, es decir, una capacidad mejorada de transferir calor desde la superficie de trabajo calentada. Por transferencia de temperatura se entiende la capacidad de transferir calor, es decir, mantener la temperatura en la muestra de polímero lo más cerca posible de la temperatura de la superficie de trabajo calentada.

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar una estructura de tapa que permita apilar los recipientes con tapa sin raspar la superficie inferior.

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar medios mejorados para la identificación de muestras.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar una alternativa a la técnica anterior.

Estos y otros objetos se logran mediante el aspecto y las realizaciones de la invención descritos y mostrados aquí.

Resumen de la invención

Por lo tanto, el objeto descrito anteriormente y varios otros objetos están destinados a ser obtenidos en un primer aspecto de la invención proporcionando un recipiente de muestra de polímero de acuerdo con la reivindicación 1. El recipiente comprende un portador de muestra, dicho portador comprende una base inferior externamente plana conectada a una pared, dicha pared comprende una estructura hueca abierta adaptada para evitar la torsión de dicha base inferior durante el proceso de producción del recipiente de muestras de polímero.

El efecto principal de dicha estructura es asegurar el contacto entre la base de fondo plano y la mesa de trabajo a continuación.

En algunas realizaciones, dicha estructura de pared abierta puede tener su nivel más bajo por encima del nivel más bajo de la base inferior.

La invención es particularmente, pero no exclusivamente, ventajosa para proporcionar un recipiente de muestra de polímero que tiene una transferencia de temperatura mejorada desde la superficie de trabajo calentada a través de la parte inferior del recipiente hasta las muestras asegurando un contacto total entre el fondo plano hacia abajo del recipiente y el superficie de trabajo calentada, utilizando una construcción de pared abierta con rebordes y huecos para estabilizar contra la distorsión de la superficie del fondo plano del recipiente, así como utilizar una base de pared que esté por encima del nivel de la base inferior.

Al proporcionar medios adaptados para poner en contacto los rebordes y huecos de la construcción de pared abierta, la invención también tiene la ventaja de permitir el apilamiento de los recipientes con tapa sin raspar la superficie inferior asegurando una visibilidad completa de las muestras a través de la superficie inferior transparente durante uso.

La invención es particularmente, pero no exclusivamente, ventajosa para proporcionar medios mejorados para la identificación de muestras proporcionando un área para identificación en la construcción de pared abierta, que no está cubierta por la tapa.

Esta invención se refiere a un recipiente de muestras mejorado para el manejo, micro manipulación, micro inyección y/o biopsia de espermatozoides, células precursoras de espermatozoides, ovocitos, embriones previos a la implantación, cigotos, blastocistos, células embrionarias y células madre, referidos colectivamente en adelante como "muestra" o "muestras". Las muestras deben mantenerse lo más cerca posible a una temperatura estable de 37 grados centígrados, especialmente durante los procedimientos críticos como la FIV, haciendo uso de la superficie de trabajo calentada debajo del recipiente de muestras, a menudo colocada con una campana de flujo de aire laminar. Como el

aire, y especialmente el aire en movimiento, no es un conductor de calor óptimo, es deseable un contacto cercano entre el fondo del recipiente de muestras y la mesa de trabajo calentada.

5 El alto grado de planeidad de la base inferior se logra durante la solidificación del material polimérico del recipiente de muestra de polímero durante su producción. La estructura de pared hueca abierta asegura la estabilidad del portamuestras evitando la torsión o la distorsión de la base inferior, lo que facilita la formación de una base inferior con un alto grado de planeidad sin necesidad de estructuras de refuerzo estructural debajo de la base inferior.

10 En el presente documento, plano se define como sustancialmente paralelo a la superficie sobre la que se coloca el recipiente, por ejemplo, cero grados de inclinación con respecto a la superficie sobre la que se coloca el recipiente.

15 En alguna realización, la estructura hueca abierta comprende rebordes y huecos adaptados para proporcionar un soporte estable al portador de muestras, evitando así la torsión de dicha base inferior durante dicho proceso de producción de recipientes de muestras de polímeros. En alguna realización, la estructura de pared abierta tiene su nivel más bajo por encima del nivel más bajo de dicha base inferior externamente plana. Esto permite una superficie completamente plana de la base inferior externa.

20 En otra realización, el recipiente de muestra de polímero comprende además una tapa, dicha tapa comprende una superficie superior e inferior, en el que dicha superficie superior comprende protuberancias complementarias de al menos uno de los huecos en dicha estructura de pared hueca abierta, evitando así el rayado de la superficie inferior durante el apilamiento.

25 El complemento se define en el presente documento como que se puede combinar de manera que las protuberancias en las superficies superiores de la tapa coincidan con los huecos en la estructura de pared abierta para que las protuberancias puedan estar contenidas en los huecos permitiendo el apilamiento de los recipientes de muestras de polímero evitando el riesgo de contacto con la base inferior de los recipientes, y evitando así el rayado de la superficie inferior.

30 En otra realización, la estructura hueca abierta comprende medios de identificación. Los medios de identificación pueden colocarse sobre, encima o debajo de la estructura hueca abierta de la pared o en combinaciones de la misma.

35 Ejemplos de medios de identificación pueden ser, por ejemplo, códigos de barras, inscripción, texto en relieve, escritura o etiquetas RFID. El nivel de la base de la pared por encima del nivel de la base inferior permite colocar códigos de barras u otros medios de identificación en el recipiente y doblarlos alrededor de la base de la pared sin interferir con la transferencia de temperatura a la base inferior plana que permanece en contacto con la superficie de trabajo. Los medios de identificación pueden colocarse en diferentes áreas sobre, encima o debajo de la estructura hueca abierta de la pared o combinaciones de la misma.

40 La base inferior externamente plana se caracteriza por una superficie interna, donde la muestra es transportada y contenido y una superficie externa en contacto con el entorno externo.

45 En algunas realizaciones, al menos parte de la superficie interna de dicha base inferior se trata para modificar sus propiedades superficiales. Por ejemplo, dicha superficie interna de dicha base inferior externamente plana puede funcionalizarse mediante modificación de la superficie.

En otra realización, la invención tiene una geometría externa circular o sustancialmente cuadrada que facilita la microscopía usando la rotación convencional del recipiente o haciendo uso de estaciones de etapa XY más modernas.

50 En otra realización, la invención tiene una estructura circular de pared más interna situada en el centro de la estructura del recipiente que asegura rotaciones céntricas del pocillo si el plato se va a rotar con fines de microscopía.

55 En otra realización, la base inferior externamente plana comprende uno o más pocillos separados individualmente. Estos pocillos, cuando el recipiente de muestra de polímero está en uso, retiene un medio líquido que sostiene las muestras. Los pocillos separados individualmente permiten que los pocillos sean homogéneamente templados y aseguran que no haya contaminación cruzada de un pocillo a otro. Si se usa cultivo de gotas, una gota potencialmente colapsante no interferirá con otras gotas dentro del mismo recipiente.

60 En otra realización, la superficie interna de la base inferior de dichos pocillos separados individualmente tiene una inclinación. Esta inclinación, desde unos pocos grados hasta 45°, permite que las muestras se asienten sin entrar en contacto con la pared del pocillo. Esto a su vez permite una fácil manipulación de la muestra.

65 Esto resuelve el problema de muestras pequeños, por ejemplo, embriones que se esconden en la esquina entre la pared y el fondo del pocillo. La pendiente permite que la muestra sea transportada gradualmente por gravedad hacia el fondo, donde puede ubicarse fácilmente por microscopía y acceder fácilmente mediante herramientas de manipulación.

En otra realización de la invención, al menos el fondo de los pocillos está funcionalizado por modificación de la superficie.

5 El recipiente se puede usar para una amplia gama de muestras de células humanas y animales, embriones, células embrionarias, ovocitos, espermatozoides, células precursoras de esperma, blastocistos y células madre con todas esas muestras que reciben los mismos beneficios. En una realización particular de la invención, el uso previsto es para la Tecnología de Reproducción Artificial.

10 En un segundo aspecto, la invención proporciona un método para producir un recipiente de muestra de polímero en el que la presencia de una estructura hueca abierta que comprende rebordes y huecos evita la distorsión de dicha base de fondo plano durante dicha solidificación del soporte de muestra de polímero.

15 El primer y otro aspecto de la presente invención pueden combinarse con cualquiera de los otros aspectos y realizaciones.

Otros aspectos, ventajas y características novedosas de la invención se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención cuando se considere junto con los dibujos adjuntos.

20 Breve descripción de las figuras

El recipiente de muestra de polímero según la invención se describirá ahora con más detalle con respecto a las figuras adjuntas. Las figuras muestran una forma de implementar la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de otras posibles realizaciones que caen dentro del alcance del conjunto de reivindicaciones adjuntas.

25 La figura 1a muestra una vista superior de un recipiente ejemplar y la figura 1b es la tapa correspondiente y la figura 1c es el recipiente con tapa que no cubre el área de identificación de acuerdo con las realizaciones de la invención.

30 La figura 2a muestra una vista superior y la figura 2b muestra una vista en sección transversal de un recipiente ejemplar que tiene una apariencia secundaria con una pared más interna y una pared más externa y un área para identificación aquí de acuerdo con realizaciones de la invención.

35 La figura 3 muestra una vista lateral de un recipiente ejemplar sin tapa que tiene una superficie inferior que es plana hacia abajo y que tiene un nivel de base de pared más alto que el nivel de base inferior de acuerdo con las realizaciones de esta invención.

40 La figura 4 muestra una vista en sección transversal de la tapa que tiene protuberancias de acuerdo con realizaciones de la invención.

45 La figura 5 muestra una vista posterior de recipientes ejemplares con tapa apilada una encima de la otra. La tapa que tiene protuberancias de acuerdo con las realizaciones de la invención hace contacto con huecos en la estructura de pared abierta permitiendo el apilamiento de recipientes o portadores sin raspar la superficie inferior.

50 La figura 6 muestra una vista superior de un recipiente ejemplar que tiene un tercer aspecto con pocillos separados de acuerdo con las realizaciones de la invención.

55 La figura 7 muestra una vista superior de un recipiente ejemplar que tiene un cuarto aspecto con una pendiente en cada pocillo separado de acuerdo con las realizaciones de la invención.

60 La figura 8 muestra una vista superior de un recipiente ejemplar que tiene un quinto aspecto con un pocillo centrado de acuerdo con las realizaciones de la invención.

65 La figura 9a muestra una vista superior y la figura 9b la tapa correspondiente y la figura 9c la vista en sección transversal de un recipiente ejemplar que tiene un sexto aspecto de acuerdo con algún aspecto de la invención.

70 La Figura 10 muestra una vista superior de un recipiente ejemplar de acuerdo con las realizaciones de esta invención junto con dos recipientes disponibles comercialmente, todos colocados en una superficie externa calentada a 37 grados Celsius, ilustrando la transferencia de temperatura y la homogeneidad en los diferentes recipientes.

75 La figura 11 muestra una vista superior de una placa de Petri disponible comercialmente junto con un recipiente ejemplar de acuerdo con las realizaciones de esta invención, ambas colocadas en una superficie externa calentada a 37 grados Celsius, ilustrando la transferencia de temperatura y la homogeneidad en los diferentes recipientes.

Descripción detallada de las realizaciones específicas de la invención

80 Con referencia a los dibujos con fines ilustrativos, la presente invención se realiza en un plato (figura 1a) con una tapa separada (figura 1b) que no cubre el área de identificación dedicada (figura 1c) asegurando una visibilidad constante

durante el uso. En la figura 2, la tapa encaja en las estructuras (4, 9). Se coloca un área (3) de escritura entre la pared (5) más interna y la pared (2) más externa que forma parte de la estructura de pared abierta en un lado de la superficie inferior, al igual que la pared (8) más interna y la pared (10) más externa también forma parte de la estructura de pared abierta. La estructura de la pared abierta tiene refuerzos por rebordes y huecos (11, 12, 15, 16). La estructura de pared abierta reforzada evita la distorsión del recipiente de polímero durante la solidificación del polímero. La estructura de pared abierta está interconectada a una base (13) inferior que tiene una superficie que es plana hacia abajo. La base (13) inferior tiene un nivel (18) de base más bajo que el nivel (1) más bajo de cualquier otra estructura en el artículo que asegure el contacto total de la superficie inferior con la superficie de trabajo subyacente que a menudo se calienta y asegurando así la transferencia óptima de temperatura a las muestras que se contendrán dentro del recipiente, por ejemplo, en un pocillo (14). El pocillo podría estar separado por una estructura de pared que tenga una pendiente (6, 7) entre la estructura de la pared real y la estructura del fondo, asegurando el posicionamiento de la muestra lejos de la estructura de pared del pocillo. Si se va a colocar una etiqueta, un código de barras o una etiqueta RFID debajo del recipiente para fines de imagen, se puede colocar en la estructura (2) de la pared más externa y doblarse debajo de la estructura de la pared ligeramente elevada y ser sostenida por una protuberancia (17).

La tapa en la figura 4 tiene un borde (19) para asegurar la estabilidad cuando se coloca en el recipiente. La tapa también tiene una protuberancia (20) que hace contacto en los rebordes y huecos de la estructura de pared abierta de un recipiente adyacente durante el apilamiento, asegurando que el fondo del recipiente no se raye durante el apilamiento, así como para facilitar el agarre. El apilamiento se ilustra en la figura 5.

La tapa, figura 1b, puede tener además pequeñas protuberancias (21) que aseguran el intercambio de gases entre el exterior del recipiente y el interior del recipiente durante el uso.

#### Definiciones

Estéril significa libre de bacterias vivas y otros microorganismos. La esterilización es el proceso por el cual los organismos vivos se eliminan o matan en la medida en que ya no son detectables en los medios de cultivo celular estándar en los que habían proliferado previamente. El nivel de garantía de esterilidad de reducción de seis log (también denominado log de reducción de menos 6 o de diez a las reducciones de menos seis) se considera aceptable para muchos dispositivos médicos.

Estructura de pared abierta significa una estructura de pared que consiste en una estructura de pared no cerrada que persiste en más de un plano.

La estructura de pared más interna significa la pared más cercana al interior del recipiente o portador.

La estructura de pared más externa significa la pared más cercana al exterior del recipiente o portador.

Una base inferior plana hacia abajo y una base inferior externamente plana significa que el área inferior que mira hacia abajo, hacia el exterior del recipiente, es plana. La parte del área inferior que mira hacia arriba, hacia el interior del recipiente podría ser plana, pero también podría contener estructuras de pocillo.

Cuadrado con o sin esquinas redondeadas significa una geometría sustancialmente cuadrada con ángulo de esquina de 90 grados o redondeado.

Centro del plato significa el centro del plato confinado por la pared más externa. Pocillos separados individualmente significa pocillos separados por una estructura de pared o incrustados en la estructura inferior de manera que el líquido en un pocillo se separe del líquido en otro pocillo.

Pendiente significa una rampa con una inclinación entre 0 y 90 grados. Una pendiente en el fondo de un pocillo puede interconectar el área inferior con la estructura de la pared del pocillo.

Funcionalizado por modificación de la superficie significa modificar las propiedades de la superficie, por ejemplo, mediante el uso de descarga eléctrica, plasma, moléculas biológicas, irradiación, estructuración, incrustación de material, deposición de vapor químico o molecular u otros medios.

El marcado de identificación significa marcado con texto, impresión, etiquetas, inscripción, transmisor u otros medios para rastrear el recipiente y el contenido RFID significa identificación por radiofrecuencia. RFID es una tecnología que incorpora el uso del espectro electromagnético para identificar de forma única un objeto.

La Tecnología de reproducción asistida (ART) es un término general que se refiere a los métodos utilizados para lograr el embarazo por medios artificiales o parcialmente artificiales. Es una tecnología reproductiva utilizada principalmente en tratamientos de infertilidad, como la Fertilización In Vitro.

La Fertilización In Vitro (FIV) es un procedimiento de laboratorio en el que los espermatozoides se colocan con un óvulo no fertilizado en un plato para lograr la fertilización.

Estación de etapa XY significa mesa de posicionamiento automatizada o manual que proporciona un movimiento bidimensional suave y preciso.

5 Las gotas colapsadas significan gotas líquidas colocadas sobre un soporte sólido, por ejemplo, la superficie inferior de un recipiente de polímero, y que no tienen un ángulo de contacto medible con el soporte sólido, un fenómeno que ocurre cuando el líquido se coloca sobre superficies hidrófilas y no se puede mantener una gota bien definida con ángulo de contacto medible. Protrusión significa algo que sobresale o es protuberante y, por lo tanto, se eleva por encima del soporte circundante.

10 La activación de Meiose significa activar la división celular necesaria para la reproducción sexual. La deposición química de vapor (CVD) significa un proceso químico utilizado para producir materiales sólidos de alta pureza y alto rendimiento. El proceso se usa generalmente en la industria de semiconductores para producir películas delgadas. En un proceso CVD típico, el sustrato se expone a uno o más precursores volátiles que reaccionan y precipitan o se descomponen en la superficie del sustrato para producir el depósito deseado. La deposición de vapor molecular (MVD) significa una mejora de la deposición de vapor convencional de capas ultrafinas. Es un proceso de vacío sin plasma donde los componentes volátiles en fase gaseosa reaccionan para formar un depósito sólido y subproductos gaseosos. En MVD, las concentraciones de reactivos controlan la velocidad de deposición. Los reactivos se distribuyen uniformemente en el sistema por medio de presión y MVD se realiza como un proceso por lotes para que no se agregue reactivo nuevo al proceso durante la deposición. MVD no es una técnica invasiva, la baja temperatura, la ausencia de plasma y la introducción de reactivos como gases no dañan el sustrato.

La altura de la base significa la altura de la base de soporte de cualquier estructura en el artículo.

25 Base inferior significa la base más baja de la superficie inferior.

La base de la pared significa la superficie más baja de la estructura de pared abierta. Cuando la pared está en un extremo conectada a la superficie inferior y se estira solo en un lado de la superficie inferior, la base de la pared se define como superior al nivel de la base inferior.

30 En el presente documento, plano se define como sustancialmente paralelo a la superficie sobre la que se coloca el recipiente, por ejemplo, cero grados de inclinación con respecto a la superficie sobre la que se coloca el recipiente.

35 La superficie de trabajo se define como la superficie sobre la cual se coloca el recipiente o soporte durante el uso. Por ejemplo, esta superficie de trabajo puede ser una superficie calentada o no calentada, una superficie estructurada dentro de una incubadora, una superficie dentro de una campana de flujo de aire laminar, la superficie de la tapa de otro recipiente o portador y más.

### 40 Ejemplos

Recipiente de muestra de polímero con estructura de pared abierta, base de fondo plano en contacto con la superficie de trabajo, área para identificación y opcionalmente pendiente entre la estructura de pared del pocillo y el fondo del pocillo.

45 El recipiente de polímero de la presente invención puede tener cualquier tamaño adecuado para el uso pretendido.

En particular, el recipiente de polímero es sustancialmente cuadrado o cuadrado con esquinas redondeadas que tienen una longitud lateral de 25 mm o menos, tal como 20 mm o menos, 15 mm o menos, 10 mm o menos tal como aproximadamente 7.5 mm. Una geometría sustancialmente cuadrada es útil durante la microscopía usando una etapa XY que mueve el recipiente en direcciones X e Y.

50 En particular, el recipiente de polímero es sustancialmente circular y tiene un diámetro de 120 mm o menos, tal como 90 mm o menos, tal como 60 mm o menos, tal como 50 mm o menos, tal como 40 mm o menos. Una geometría sustancialmente circular es útil durante la microscopía girando el recipiente a mano.

55 En particular, el recipiente de polímero es sustancialmente cuadrado o cuadrado con esquinas redondeadas que contienen pocillos circulares que tienen cualquier tamaño adecuado para el uso previsto, en particular un diámetro de pocillo de 90 mm o menos, 60 mm o menos, 45 mm o menos, 35 mm o menos, 10 mm o menos, 5 mm o menos. Un plato sustancialmente cuadrado o cuadrado con esquinas redondeadas que contiene un pocillo circular con centro en el centro del recipiente es útil durante la microscopía girando el recipiente a mano. Un pocillo centrado o no centrado es útil para el cultivo de microgotas, así como para la recolección y transferencia de muestras. Varios pocillos dentro del mismo recipiente son útiles para cultivar embriones por separado y no asegurar la contaminación cruzada entre cultivos de embriones, también en caso de colapso de las gotas.

65 El o los pocillos pueden tener cualquier forma adecuada para el uso previsto. Cuando se usa durante los procedimientos donde las herramientas se aplican desde el lado izquierdo y derecho en las muestras dentro del pocillo,

- se puede preferir una forma de pocillo circular, ovalada o rectangular. Cuando se usa durante el cultivo de embriones, se puede preferir un pocillo circular. Los pocillos individuales pueden tener opcionalmente una pendiente entre el fondo plano del pocillo y la estructura del pocillo, lo que es útil para evitar que las muestras pequeñas se oculten en ángulos agudos. La pendiente asegura que las pequeñas muestras, como los embriones, se transfieran al fondo del pocillo por gravedad y sean fácilmente accesibles a una distancia conocida de la pared del pocillo. La pendiente de la presente invención puede tener un tamaño adecuado para el uso previsto, en particular un ángulo de inclinación de 89 grados o menos, 45 grados o menos, 30 grados o menos, tal como 25 grados.
- Algunos procedimientos requieren mayores cantidades de medios dentro del recipiente, algunos requieren una menor cantidad de medios y otros requieren un fácil acceso con herramientas que se acercan a los recipientes desde los lados. La altura del recipiente puede tener cualquier forma adecuada para el uso previsto, en particular 20 mm o menos, 15 mm o menos, 10 mm o menos, 9 mm o menos, 8 mm o menos, 7 mm o menos, 6 mm o menos, 5 mm o menos.
- En contraste con una placa de Petri tradicional, la invención proporciona una estructura de pared abierta. Una ventaja es que parte del área en la estructura de pared abierta proporciona un área de identificación adecuada para marcado, grabado, etiquetado, código de barras, etiqueta RFID o similares. El área de identificación de la presente invención puede tener un tamaño adecuado para el uso previsto. En un área particular de 100 cm<sup>2</sup> o menos, 50 cm<sup>2</sup> o menos, 25 cm<sup>2</sup> o menos, 10 cm<sup>2</sup> o menos, 8 cm<sup>2</sup> o menos.
- Otra ventaja es que la estructura de pared abierta interconectada por una estructura inferior que es plana hacia abajo y dicha base inferior tiene un nivel de base más bajo que la base de la estructura de pared es que la superficie inferior está en contacto cercano con la superficie de trabajo externa a continuación, que puede ser una mesa climatizada. La estructura de pared abierta adaptada con rebordes y huecos evita que la estructura de fondo plano moldeada por inyección se retuerza durante la solidificación del polímero calentado. La estructura inferior puede tener un tamaño adecuado para el uso previsto. En particular, espesor de 12 mm o menos, 10 mm o menos, 8 mm o menos, 6 mm o menos, 4 mm o menos. La estructura inferior también puede incorporar estructuras de pocillo. Por lo tanto, la transferencia de temperatura desde la superficie calentada externa a las muestras se optimiza para el recipiente individual, así como la facilidad de procedimiento se optimiza cuando se utilizan varios recipientes diferentes que usan el mismo principio durante un procedimiento de FIV.
- Un tercer beneficio es que la tapa puede ajustarse para cubrir la restricción de área por la estructura de pared más interna, mientras permite que el área de identificación no esté cubierta por la tapa para una fácil identificación.
- La tapa tiene protuberancias en el lado superior en contacto con los rebordes y huecos en la estructura de pared abierta durante el apilamiento de los recipientes uno encima del otro. Esto reduce el riesgo de raspar el fondo, lo que puede reducir la visibilidad de las muestras. Esta característica también garantiza que solo se agarre un recipiente con su tapa cuando se extiende hacia los productos apilados.
- La tapa tiene protuberancias en el lado inferior asegurando que el intercambio de gases puede tener lugar entre el contenido del recipiente y el exterior del recipiente con tapa, por ejemplo, durante la colocación en una incubadora controlada por gas.
- El recipiente de polímero de la presente invención se forma a partir de un polímero calentado, en particular un compuesto termoplástico. Ejemplos no limitativos de compuestos termoplásticos que pueden usarse son acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), acrílico, celuloide, acetato de celulosa, acetato de etileno-vinilo (EVA), alcohol etileno-vinílico (EVAL), flouropásticos, polímero de cristal líquido (LCP), poliactal, poliacrilato, poliacrilonitrilo, poliamida, poliamida-omida (policlorotrifluoroetileno PAI (PCTFE), tereftalato de polietileno (PET), tereftalato de dimetilciclohexileno (PCT), policarbonato (PC), polihidroxialcanoato (PHA), policetona (PK), poliéster, polietileno (PE), polietercetona (PEEK), polieterimida (PEI), poliesthersulfona (PES), polietileneclorinatos (PEC), poliiimida (PI), ácido poliláctico (PLA), polimetilpenteno (PMP), óxido de polifenileno (PPO), sulfuro de polifenileno (PPS), polieftalamida (PPA), polipropuleno (PP), poliestireno (PS), polisulfona (PSU), poliuretano (PU), acetato de polivinilo (PVA), cloruro de polivinilo (PVC), polivinilideneclouro (PVDC) y estirenoacrilonitrilo (SAM), o mezclas o copolímeros de los mismos.
- En una realización particularmente preferida, el recipiente de polímero está formado de un material polimérico que es biocompatible.
- El material polimérico puede seleccionarse de modo que tenga una superficie principalmente hidrófoba o principalmente hidrófila o principalmente intermedia. En una realización particular, la superficie del artículo polimérico puede modificarse para hacerlo intermedio, por ejemplo, mediante recubrimiento o mediante tratamiento con corona o plasma. Los polímeros son generalmente hidrófobos por naturaleza y la resistencia y el tiempo del proceso de recubrimiento determina el grado de hidrofilia obtenido.
- Proceso para producir un recipiente de polímero funcionalizado opcionalmente por modificación de superficie



Los métodos típicos utilizados en la producción en masa de artículos poliméricos son el moldeo por inyección. El moldeo por inyección se realiza calentando un polímero adecuado hasta que se funde, inyectando el polímero fundido en un molde, permitiendo que el polímero se enfríe y endurezca, y retirando el artículo moldeado del molde después de la solidificación. La superficie del recipiente de polímero se hace opcionalmente más hidrófila para facilitar la formación de gotas de medios para el cultivo de embriones, así como también se hace estéril para evitar la contaminación. Típicamente, la superficie del recipiente de polímero se modifica mediante tratamiento con corona o plasma para aumentar la humectabilidad de la superficie mediante descarga eléctrica.

Los métodos de esterilización típicos utilizados son la esterilización por irradiación (beta o gamma), autoclave de vapor, óxido de etileno, desinfectantes químicos o calor seco.

El recipiente de polímero estéril puede funcionalizarse adicionalmente estructurando la superficie durante la etapa de moldeo por inyección real y/o simplemente por recubrimiento químico húmedo o recubrimiento de vapor después del moldeo por inyección.

Una funcionalización añadiendo estructura a la superficie del recipiente de polímero durante el moldeo puede ser en forma de nano o microestructuras moldeadas dentro del polímero o integrando un andamio poroso en la superficie del recipiente de polímero durante el moldeo por inyección. Las estructuras permiten que las muestras en contacto con las estructuras dentro del recipiente obtengan más morfología similar a la del 3D, así como también se comuniquen con otras muestras a través del medio, viajando sin obstáculos a través de las estructuras que retienen las muestras.

El recubrimiento usando un proceso químico húmedo une covalentemente moléculas biológicas a la superficie del polímero para facilitar la funcionalidad específica en relación con la interacción con el entorno, ya sea la activación de meiosis, la unión celular, la captura o separación de moléculas y/o los procesos de purificación.

El recubrimiento mediante el proceso de vapor deposita capas de óxido sobre la superficie del recipiente de polímero. Ejemplos de capas de óxido pueden ser  $Al_2O_3$ ,  $SiO_2$ ,  $TiO_2$ ,  $ZrO_2$ ,  $CeO_2$  o una mezcla o una estructura multicapa de los mismos. Las capas de óxido pueden depositarse por deposición química de vapor (CVD) o preferiblemente por deposición molecular de vapor (MVD).

Ejemplo experimental

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la funcionalidad del fondo plano externo en contacto con la superficie calentada externa en comparación con los recipientes tradicionales para FIV. Estos ejemplos no limitan el alcance de la divulgación, sino que se presentan con fines ilustrativos.

Ejemplo 1 Transferencia de temperatura al recipiente de polímero

a. Dos recipientes de polímero convencionales con pocillos y un recipiente de polímero de acuerdo con esta invención se colocan sobre una placa de metal calentada a 37.2 grados Celsius.

En la figura 10, los dos recipientes de polímero convencionales (B y C) tienen un fondo situado aproximadamente a 0.5 mm por encima de la superficie de la placa calentada. El recipiente (A) según esta invención tiene contacto total entre el fondo del recipiente y la placa calentada.

Cada pocillo se llena con líquido para obtener la misma altura del líquido.

Espere 5 minutos para que la placa calentada transfiera calor a los recipientes. Use una cámara termo sensible para tomar una imagen de la distribución de calor dentro de los recipientes.

La Figura 10 ilustra la transferencia de calor más óptima desde la placa calentada al líquido dentro del recipiente de 5 pocillos (A) de acuerdo con este ejemplo y esta invención en comparación con las placas de 5 pocillos (B) y 4 pocillos (C) disponibles comercialmente.

b. Un plato de Petri de polímero convencional y un recipiente de polímero de acuerdo con esta invención se colocan sobre una placa de metal calentada a 37.2 grados Celsius. En la figura 11, la placa de Petri convencional (D) tiene un fondo situado aproximadamente a 0.5 mm por encima de la superficie de la placa calentada. El recipiente (E) de acuerdo con esta invención tiene contacto total entre el fondo del recipiente y la placa calentada.

Cada recipiente se llena con líquido para obtener la misma altura del líquido.

Espere 5 minutos para que la placa calentada transfiera calor a los recipientes.

Utilice una cámara termo sensible para tomar una imagen de la distribución de calor dentro de los recipientes.

La figura 11 ilustra la transferencia de calor más óptima desde la placa calentada al líquido dentro del recipiente (E) de acuerdo con este ejemplo y esta invención en comparación con la placa de Petri (D) disponible comercialmente.

5 Claramente, la muestra de polímero de la invención tiene una capacidad mejorada de transferir calor al líquido que contiene. En particular, la muestra de polímero de la invención transporta el calor mejor que los recipientes disponibles comercialmente. La estructura de la muestra de polímero que comprende rebordes y huecos permite un mejor contacto entre la placa calentada y el fondo de la muestra de polímero.

10 Aunque la presente invención se ha descrito en relación con las realizaciones especificadas, no debe interpretarse como limitada de ninguna manera a los ejemplos presentados. El alcance de la presente invención se establece mediante el conjunto de reivindicaciones adjunto. En el contexto de las reivindicaciones, los términos "que comprende" o "comprende" no excluyen otros elementos o pasos posibles. Además, la mención de referencias como "un" o "uno", etc. no debe interpretarse como excluyente de una pluralidad. El uso de signos de referencia en las reivindicaciones con respecto a los elementos indicados en las figuras tampoco debe interpretarse como limitante del alcance de la  
15 invención.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un recipiente de muestras de polímero para muestras que deben mantenerse cerca de 37 grados centígrados estables, especialmente durante procedimientos críticos como la FIV, en el que las muestras se seleccionan de espermatozoides, células precursoras de espermatozoides, ovocitos, embriones previos a la implantación, cigotos, blastocitos, células embrionarias y células madre, dicho recipiente de muestra de polímero comprende:
- 10 - un portador de muestra, dicho portador de muestra comprende una base (13) inferior externamente plana conectada a una pared, dicha pared que comprende una estructura hueca abierta que comprende rebordes y huecos (11, 12, 15, 16) en el que una pared (2, 10) más externa que forma parte de dicha estructura de pared hueca abierta tiene su nivel (1) más bajo por encima del nivel más bajo (18) de dicha base (13) inferior externamente plana, y que además comprende:
- 15 - una tapa, dicha tapa comprende una superficie superior y una inferior, en el que dicha superficie superior comprende protuberancias (19, 20) complementarias de al menos uno de dichos rebajes o crestas (11, 12, 15, 16) en dicha estructura de pared hueca abierta, evitando así raspar la base (13) inferior durante el apilamiento de dichos recipientes de muestras de polímero.
- 20 2. Un portador de muestras de polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha estructura de pared abierta forma un cuadrado con o sin esquinas redondeadas o que es circular.
- 25 3. Un portador de muestras de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha estructura de pared abierta tiene una estructura de pared más interna que forma un pocillo cuadrado con o sin esquinas redondeadas, o que es circular.
- 30 4. Un soporte de muestra de polímero de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha estructura de pared abierta tiene una estructura de pared más interna que forma un pocillo circular, en el que el centro de dicho pocillo circular es idéntico al centro de dicho soporte de muestra.
- 35 5. Un portador de muestras de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha base (13) de fondo plano externamente plana comprende uno o más pocillos (14) separados individualmente para contener medio líquido que sostiene las muestras durante el procedimiento.
- 40 6. Un portador de muestras de polímero de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos pocillos individuales tienen una pendiente entre un fondo plano de dichos uno o más pocillos separados individualmente y una estructura de pocillos.
- 45 7. Un portador de muestras de polímero de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha pendiente tiene un ángulo de 45 grados o menos, tal como 30 grados o menos, tal como 25 grados.
- 50 8. Un portador de muestras de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha tapa encaja en las estructuras (4.9) de dicho portador de muestras.
- 55 9. Un portador de muestra de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, dicho portador de muestra de polímero es cuadrado o cuadrado con esquinas redondeadas que tienen una longitud lateral de 25 mm o menos, tal como 20 mm o menos, 15 mm o menos, 10 mm o menos como 7.5 mm.
- 60 10. Un portador de muestra de polímero de acuerdo con la reivindicación 9, dicho portador de muestra de polímero contiene pocillos circulares que tienen un diámetro de 90 mm o menos, 60 mm o menos, 45 mm o menos, 35 mm o menos, 10 mm o menos, 5 mm o menos.
- 65 11. Un portador de muestra de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, dicho portador de muestra de polímero es circular y tiene un diámetro de 120 mm o menos, tal como 90 mm o menos, tal como 60 mm o menos, tal como 50 mm o menos, como 40 mm o menos.
12. Un portador de muestras de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho portador de muestras de polímero tiene una altura de 20 mm o menos, 15 mm o menos, 10 mm o menos, 9 mm o menos, 8 mm o menos, 7 mm o menos, 6 mm o menos, 5 mm o menos.
13. Un portador de muestra de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha base (13) inferior externamente plana tiene un espesor de 12 mm o menos, 10 mm o menos, 8 mm o menos, 6 mm o menos, 4 mm o Menos.
14. Un portador de muestra de polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha base (13) inferior estructura de pocillo embebido externamente plano.

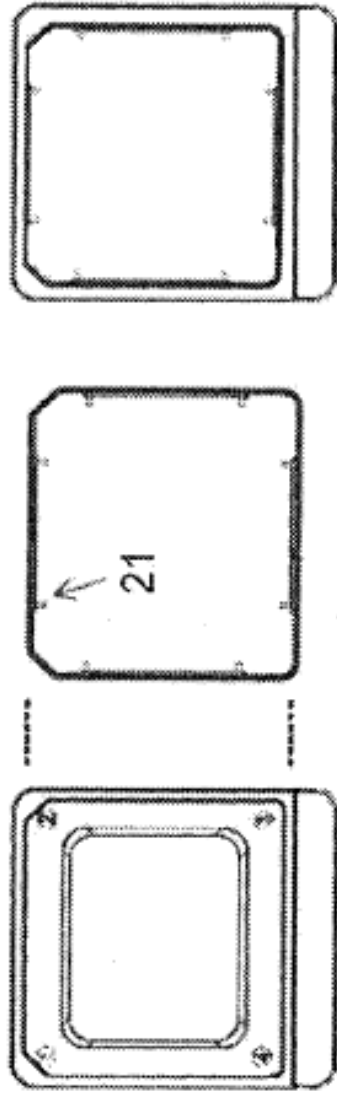


FIG. 1a      FIG. 1b      FIG. 1c

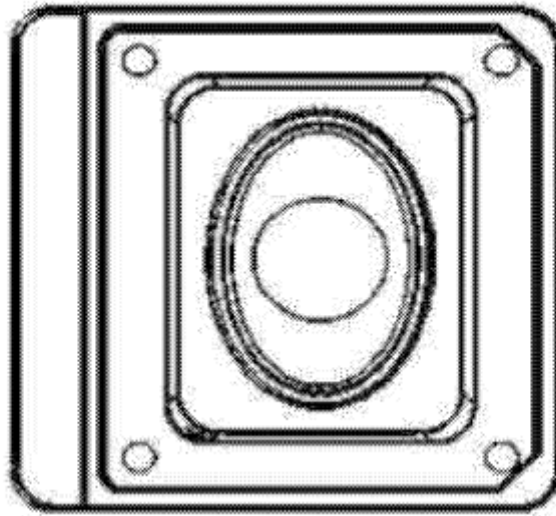


FIG. 2a

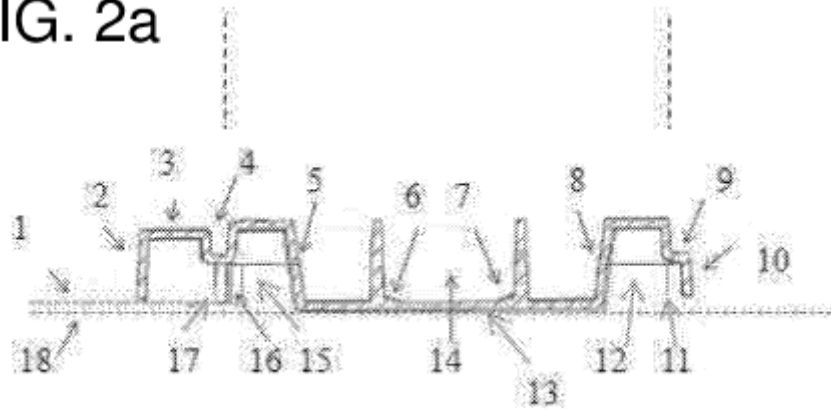


FIG. 2b



FIG. 3

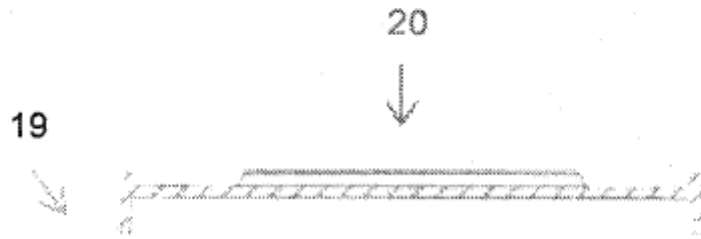


FIG. 4

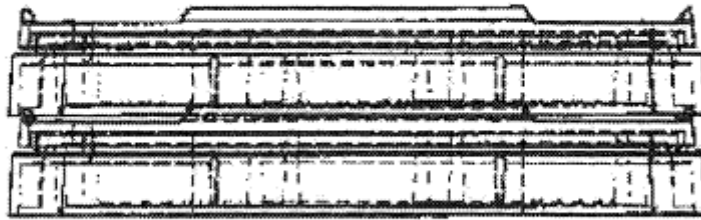


FIG. 5

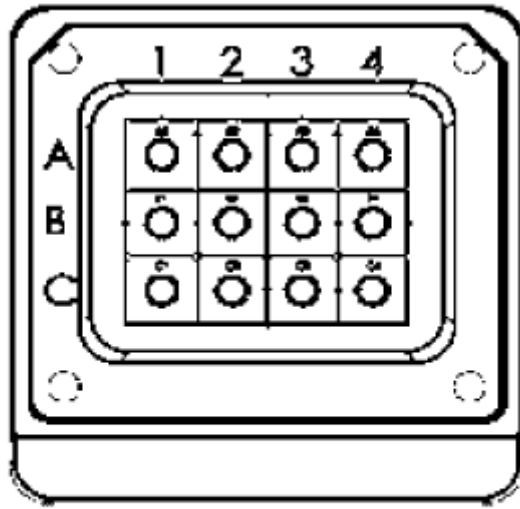


FIG. 6

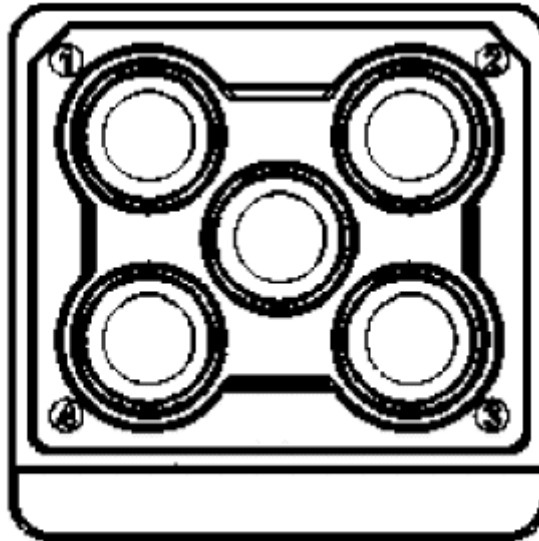


FIG. 7

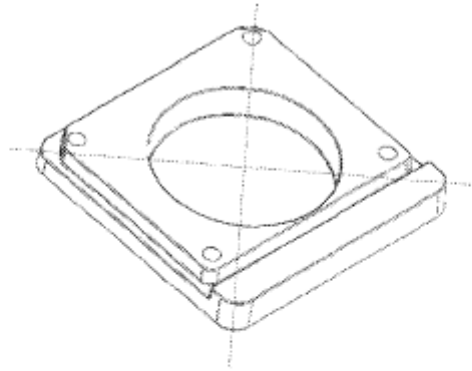


FIG. 8

FIG. 9a

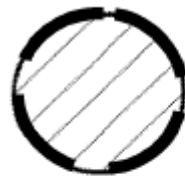
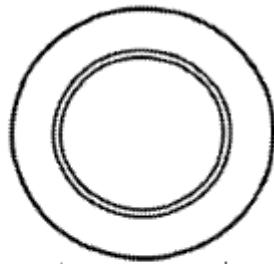


FIG. 9b

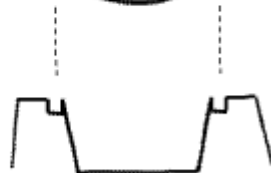


FIG. 9c



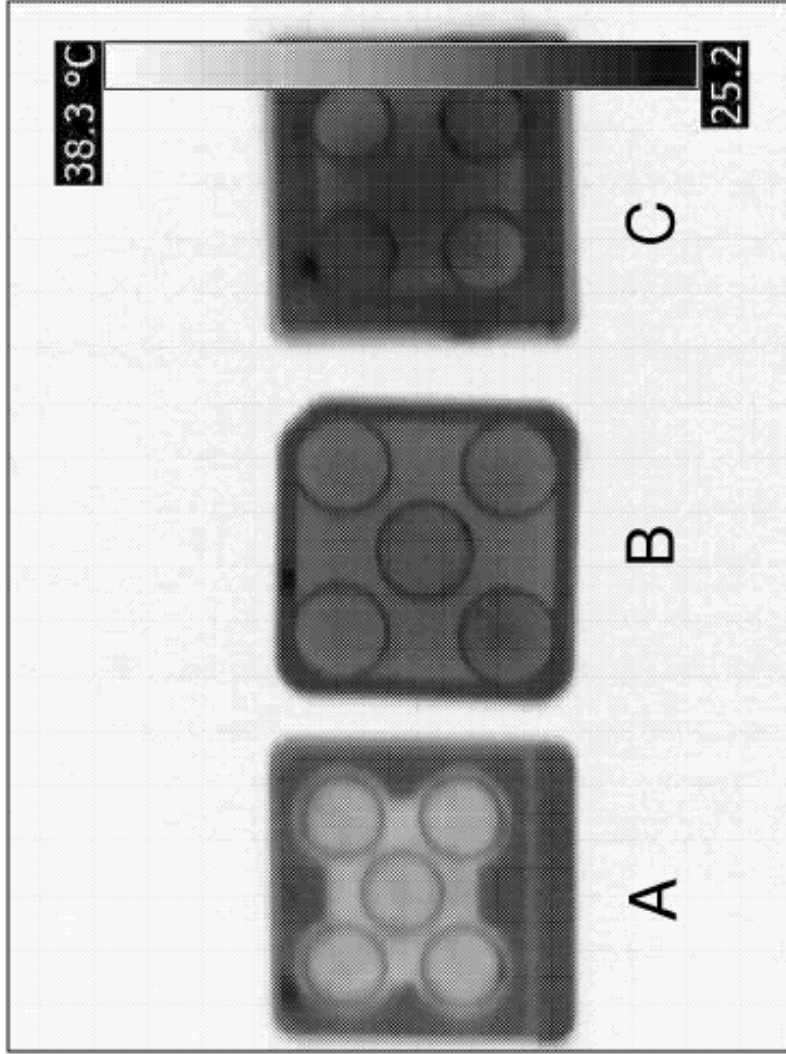


FIG. 10

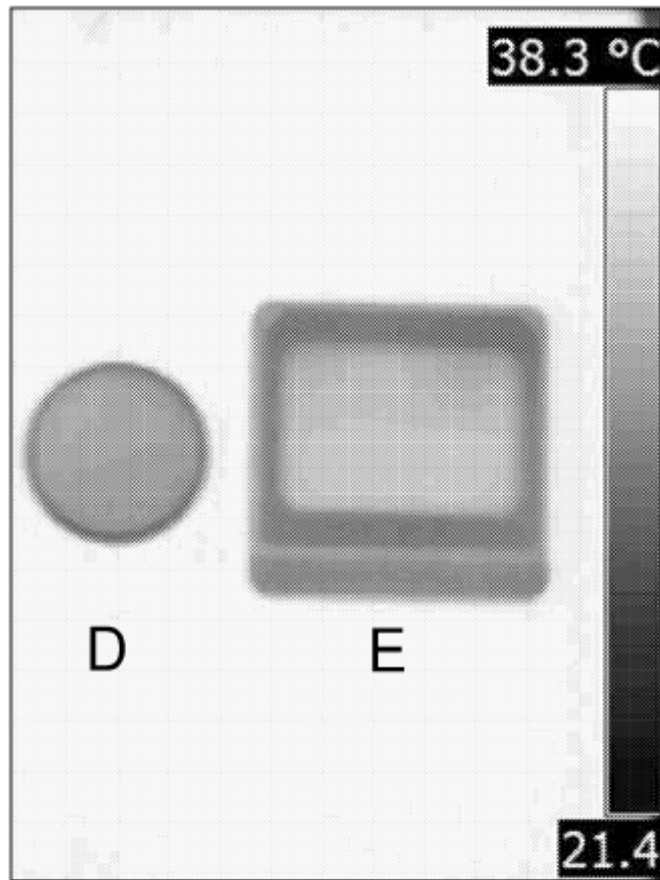


FIG. 11