

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 452**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

G01N 27/447 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/GB2013/050668**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13136091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13711114 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2020 EP 2825636**

54 Título: **Procesamiento de espermatozoides**

30 Prioridad:

16.03.2012 GB 201204722

19.03.2012 GB 201204819

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

02.12.2020

73 Titular/es:

**FERTILITY INNOVATIONS LIMITED (100.0%)
Coombe House, Bradford Peverell
Dorchester, Dorset DT2 9SE, GB**

72 Inventor/es:

JAMES, MICHAEL HOWARD

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 797 452 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

Procesamiento de espermatozoides

5 **Antecedentes**

Se estima que 1 de cada 7 parejas humanas tienen problemas para concebir. Las estimaciones sitúan el porcentaje de casos de infertilidad que puede atribuirse a la pareja masculina entre el 25 % y el 50 %, dependiendo de la población. La principal causa de infertilidad masculina es la mala calidad del semen. La mala calidad del semen puede estar provocada por un número reducido de células espermáticas ("espermatozoides") y/o una movilidad reducida (astenozoospermia) de las células que están presentes. Hay varios tratamientos disponibles para la infertilidad masculina y femenina, incluida la inseminación intracervicouterina (ICI, forma siglada de *intracervical insemination*) y la inseminación intrauterina (IUI, forma siglada de *intrauterine insemination*). En esencia, estos procedimientos implican colocar en el cuello uterino esperma recientemente recolectado o esperma congelado y descongelado, normalmente después del lavado, dentro del útero, por medios artificiales. La IUI tiene un gran potencial para ser utilizada en muchos casos de infertilidad actualmente tratados por fertilización *in vitro* (IVF, forma siglada de *in vitro fertilisation*). Sin embargo, la IUI normalmente experimenta bajas tasas de éxito atribuidas principalmente a la baja calidad del semen.

Dichas técnicas también son importantes en medicina veterinaria, incluida la ganadería y la biología de la conservación, en que la mala fertilidad animal puede ser una barrera para los objetivos comerciales o de conservación. Las probabilidades de que el tratamiento con IUI produzca una gestación aumentan considerablemente si los espermatozoides utilizados pueden ser de la mejor calidad posible. La calidad puede mejorarse mediante cualquiera o todos de los siguientes:

- pre "lavado" del esperma, por ejemplo en un medio F-10 de Ham sin L-glutamina, para eliminar el líquido seminal, los leucocitos y los espermatozoides no móviles;
- técnicas de separación para enriquecer la muestra con células de mayor calidad, por ejemplo, mediante una configuración de gradiente discontinuo o electroforesis (véase, por ejemplo, el documento WO2005/033295);
- tratamiento de las células *ex vivo* con un agente químico para aumentar la movilidad o mejorar de otra manera su capacidad de fertilización.

El pretratamiento de las células con un agente químico para mejorar la capacidad de fertilización suele ir seguido de una etapa de lavado para evitar la exposición de la pareja femenina, el cigoto y el embrión al agente químico, y para evitar el "agotamiento" de los espermatozoides, lo que puede suceder si se estimula su movilidad durante un período demasiado prolongado, de modo que cuando se produce la inseminación, los espermatozoides están "extenuados" o han experimentado un desencadenamiento prematuro de la reacción del acrosoma.

Es común a todos los procedimientos de pretratamiento el imperativo de que el procedimiento sea lo más rápido posible (debido a que la calidad del esperma disminuye con el tiempo *ex vivo*) y a que evita en la medida de lo posible traumas físicos y químicos (por ejemplo, fuerzas de cizallamiento) que puedan dañar las células.

El profesor John Aitken y sus colegas han desarrollado un sistema electroforético (denominado "procedimiento de Aitken" o "técnica de Aitken") para el aislamiento de células espermáticas humanas (véase Ainsworth *et al.* 2005, Hum. Repro. 20(8)2261-2270; y Aitken *et al.* 2011. Hum. Repro. 26(8) 1955-1964), que da como resultado una muestra para su uso en inseminación que comprende células con menos daño del ADN que las técnicas de preparación celular convencionales de centrifugación en gradiente de densidad. En esencia, la técnica de Aitken implica el uso de un casete de separación que comprende dos cámaras llenas de tampón separadas por una membrana permeable a iones y espermatozoides. Se coloca una muestra de semen en una cámara y se coloca un campo eléctrico a través del casete. En cuestión de segundos, los espermatozoides migran en el campo eléctrico a través de la membrana hacia la segunda cámara. El pequeño tamaño de los espermatozoides los hace especialmente móviles en un campo eléctrico y el ácido siálico en la superficie celular provoca la migración al electrodo positivo. Las células contaminantes, por ejemplo, los leucocitos, y las células dañadas y/o muertas, y/o que hayan madurado de manera inadecuada, son mucho menos móviles y, por lo tanto, la muestra de células puede enriquecerse en espermatozoides de alta calidad para su uso en tratamientos posteriores de fertilidad.

Fleming *et al* 2008, Hum. Repro. 23(12) 2646-2651 y Ainsworth *et al* 2006, Hum. Repro. 22(1) 197-200 presentan evidencia adicional del uso satisfactorio de espermatozoides separados electroforéticamente.

La presente invención se basa en una adaptación de la técnica de Aitken para la eliminación de agentes químicos de los espermatozoides por electroforesis, ya sea como una técnica independiente o, ventajosamente, para su uso en combinación con la técnica de Aitken, mediante lo cual las células se enriquecen en células de alta calidad de forma simultánea a su lavado de agentes químicos de pretratamiento. Como tal, la invención es especialmente adecuada para su uso en métodos que implican tratamiento *ex vivo* de espermatozoides con un compuesto químico para aumentar su capacidad de fertilización seguido de la eliminación del compuesto químico de tratamiento.

Sumario de la invención

La invención proporciona, en un primer aspecto, un procedimiento de separación de espermatozoides de un compuesto químico al cual los espermatozoides se han expuesto previamente *ex vivo* para aumentar su capacidad de fertilización, mediante electroforesis que comprende someter a los espermatozoides a un potencial eléctrico entre un cátodo y un ánodo de manera que los espermatozoides se separen del compuesto químico.

La divulgación también se refiere al uso de un espermatozoide separado de un compuesto químico mediante electroforesis de acuerdo con un procedimiento del primer aspecto de la invención en inseminación intrauterina (IUI), fertilización *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, forma siglada de *intracytoplasmic sperm injection*).

La invención también proporciona un método de tratamiento de espermatozoides con un compuesto químico para aumentar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, que comprende poner en contacto los espermatozoides con un compuesto químico *ex vivo* y después separar los espermatozoides del compuesto químico mediante electroforesis, que comprende someter a los espermatozoides a un potencial eléctrico entre un cátodo y un ánodo, de manera que los espermatozoides se separan del compuesto químico. El alcance de protección se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama que ilustra el principio de la movilidad electroforética de los espermatozoides y de los compuestos químicos cargados.

La Figura 2 es un diagrama que ilustra el uso de membranas permeables a iones y permeables a compuestos químicos para separar espermatozoides de compuestos químicos en conformidad con la invención.

La Figura 3 es un diagrama que ilustra el uso del procedimiento de la invención junto con el método de Aitken para enriquecer los espermatozoides en cuanto a la calidad.

Descripción detallada

La invención proporciona un procedimiento de separación de espermatozoides de un compuesto químico al cual los espermatozoides se han expuesto previamente *ex vivo* para aumentar su capacidad de fertilización mediante electroforesis, que comprende someter a los espermatozoides a un potencial eléctrico entre un cátodo y un ánodo de manera que los espermatozoides se separen del compuesto químico.

Espermatozoides

Los espermatozoides para su uso en la invención normalmente se habrán recolectado de un animal macho (por ejemplo, un sujeto humano) mediante cualquier método adecuado, incluida la masturbación, masaje prostático, el uso de una vagina artificial (por ejemplo, como parte de un maniquí de monta utilizado para la recolección de caballos, bovinos u otros animales macho no humanos), vibroeyaculación y electroeyaculación. En algunas circunstancias, la recolección puede implicar el uso de un condón de recolección o la recuperación de forma directa de los testículos mediante extracción de esperma testicular (TESE, forma siglada de *testicular sperm extraction*). La recolección que implica eyaculación generalmente se ve favorecida porque dará como resultado una muestra de espermatozoides suspendidos en semen y, por lo tanto, es más probable que maduren adecuadamente. Los espermatozoides pueden recolectarse "frescos" o pueden haberse recolectado previamente y congelado durante un período de almacenamiento y luego descongelarse cuando sean necesarios para su uso. Opcionalmente, pueden someterse a una etapa de pretratamiento antes de su uso en un procedimiento o método de la invención.

Fuente de espermatozoides

Los diversos aspectos de la invención se refieren principalmente a seres humanos. Sin embargo, pueden aplicarse a otros animales (especialmente otros mamíferos), incluido el ganado (especialmente caballos, ganado bovino, cerdos), animales de carreras (especialmente caballos y camellos), animales de compañía (incluidos gatos y perros), animales salvajes (incluidos grandes felinos, antílopes y pandas) y animales de investigación (incluidos roedores como conejos, ratones y ratas).

Compuestos químicos

El compuesto químico o compuestos químicos serán compuestos a los que se han expuesto las células *ex vivo* para aumentar su capacidad de fertilización, en donde los compuestos son agentes promotores de la movilidad. Por lo general, será ventajoso eliminar los compuestos de las células antes de utilizarlas para la inseminación. Las células pueden haber estado expuestas a más de un compuesto y el compuesto (o compuestos) normalmente tendrá una carga eléctrica en solución (en condiciones fisiológicamente adecuadas) que puede ser positiva o negativa, de

manera que el compuesto (o compuestos) presentará migración electroforética cuando esté expuesto a un potencial eléctrico. Los compuestos pueden tener una carga eléctrica intrínseca (por ejemplo, pueden ser ácidos o bases) o puede haberse introducido una carga derivatizando la molécula con una fracción cargada. Preferentemente, los compuestos químicos tienen un peso molecular suficientemente bajo (por ejemplo, menos de 50, 20 o 10 kDa) para permitir su paso electroforético a través de una membrana de exclusión de tamaño que tenga un tamaño de poro suficiente para excluir el paso electroforético de los espermatozoides (por ejemplo, espermatozoides humanos).

Movilidad electroforética de los espermatozoides

Los espermatozoides sanos y que hayan madurado de manera adecuada expresan restos de ácido siálico en su superficie, lo que les da una carga superficial negativa y les permite migrar electroforéticamente cuando se los somete a un potencial eléctrico. Los espermatozoides son especialmente adecuados para las técnicas que utilizan movilidad electroforética, debido tanto a su carga superficial como a su tamaño relativamente pequeño, lo que significa que normalmente son más móviles en un campo eléctrico que los tipos celulares más grandes. Su tamaño relativamente pequeño también les permite pasar a través de membranas que tienen un tamaño de poro que puede retener otros tipos celulares grandes. La rapidez con la que migran los espermatozoides en respuesta a un potencial eléctrico es ventajosa porque permite que las técnicas electroforéticas que implican el movimiento de los espermatozoides en respuesta a un campo eléctrico sean rápidas y, por lo tanto, tengan un impacto mínimo en la viabilidad celular.

Separación simple de células de un compuesto químico (o compuestos químicos)

En su forma más básica, la invención implica exponer una mezcla espermatozoides y compuestos químicos a un potencial eléctrico que hace que los compuestos químicos migren hacia un potencial eléctrico mayor o menor dependiendo de si los compuestos químicos portan una carga positiva o negativa.

Por ejemplo, con referencia a la Figura 1:

Se puede proporcionar una cámara (10) que tiene un ánodo (1) y un cátodo (2) a través de la que se aplica un voltaje y que contiene una solución iónica, por ejemplo un medio fisiológico. Los espermatozoides (3) que expresan ácido siálico en la superficie migrarán hacia el ánodo. Los compuestos químicos que tienen una carga negativa (4) migrarán hacia el ánodo y los compuestos químicos que tienen una carga positiva (5) migrarán hacia el cátodo.

En la práctica, la cámara (10) se proporciona preferentemente como parte de un casete (25) que comprende múltiples cámaras, por ejemplo, el casete (15) ilustrado en la Figura 2:

La muestra de espermatozoides se introduce en una cámara de entrada de muestras (10) y las células migran bajo la influencia del potencial eléctrico como se ilustra con referencia a la Figura 1. El cátodo (2) y el ánodo (1) se proporcionan en cámaras separadas llenas de electrolitos (30) y (20) que están en comunicación iónica y, por lo tanto, eléctrica con la cámara de entrada de muestras (10). Las cámaras (30) y (10), y (10) y (20) están separadas por membranas permeables a iones (31, 21) que son impermeables a los espermatozoides. La provisión de una cámara anódica (30) y una cámara catódica (20) tiene la ventaja de que las células se mantienen alejadas de los electrodos y también que el electrolito fresco puede bañar los electrodos mediante los puertos de entrada y salida (32, 33 y 22, 23). Como tal, el suministro de electrolitos a las cámaras de electrodos puede disponerse como se describe en el documento WO 01/78878.

Si la membrana (31) se hace permeable a los compuestos químicos cargados negativamente (4) pero no a los espermatozoides (3), se puede observar que los compuestos cargados negativamente (4) migrarán de la cámara (10) a la cámara (30) y son separados de las células (3) que se retienen en la cámara (10).

Si la membrana (21) se hace permeable al compuesto químico cargado positivamente (5) pero no a los espermatozoides, se puede observar que el compuesto cargado positivamente (5) migrará de la cámara (10) a la cámara (20) y son separados de las células (3) que se retienen en la cámara (10).

Como se ilustra en la Figura 2 y se describe en el presente documento, la cámara catódica (20) contiene un cátodo y la cámara anódica (30) contiene un ánodo. Sin embargo, también están dentro del alcance de todas las realizaciones de la invención las disposiciones en donde uno o más de los electrodos respectivos se proporcionan en una ubicación (por ejemplo, cámaras adicionales) en comunicación eléctrica (por ejemplo, iónica) con las cámaras catódicas y anódicas respectivas. Todo lo que se precisa es que la cámara catódica (20) esté a un potencial eléctrico más bajo (más negativo) que la cámara de entrada de muestras (10) y que la cámara anódica (30) esté a un potencial eléctrico más alto (más positivo) que el cámara de entrada de muestras (10).

Membranas de separación

Se pueden encontrar instrucciones adicionales sobre la aplicación de membranas de separación a electroforesis en los documentos US 5039386, US 5650055, AU 738361 y WO 02/4314.

Opcionalmente, el casete (15) incluye medios para circular el electrolito desde un depósito (o depósitos) de

electrolito a través de las respectivas cámaras de electrodos (20, 30). La membrana permeable a iones y, de hecho, todas las membranas para su uso con la presente invención preferentemente impiden la mezcla convectiva sustancial del contenido de las cámaras adyacentes.

5 Las membranas pueden ser como se describe en el documento WO 2005/033295.

Soluciones

10 En conformidad con los procedimientos de la invención, las cámaras están llenas de tampones iónicos ("electrolitos") en uso.

15 Concentraciones de tampón preferentes están entre aproximadamente 1 a 100 mM. Se puede utilizar cualquier tampón o electrolito adecuado. Tampones adecuados incluyen, pero sin limitación, tampones y componentes biológicos compatibles con esperma tal como HEPPS, HEPES, BisTris, cloruro de sodio, sales de tampón fosfato, sacarosa, glucosa y manitol. Como se describe a continuación, se ha encontrado que un tampón de HEPES 10 mM, NaCl 30 mM y sacarosa 0,2 M es particularmente útil. Se apreciará que, sin embargo, se puede utilizar cualquier otro tampón adecuado. Los tampones adecuados para su uso con esperma de mamífero deben ser "no capacitantes", en el sentido de que no provoquen la capacitación prematura de los espermatozoides.

Integración de los procedimientos con técnicas de enriquecimiento de espermatozoides

20 Como mínimo, los procedimientos de la invención se refieren a la separación de espermatozoides de compuestos químicos mediante electroforesis. Sin embargo, se apreciará que los procedimientos de la invención son especialmente adecuados para la integración en el "método de Aitken" de enriquecimiento de espermatozoides como se describe en el documento WO 2005/033295.

25 El método de Aitken se basa en la constatación de que los espermatozoides de mayor calidad portan más ácido siálico en su superficie y, por lo tanto, son capaces de presentar una mayor movilidad electroforética bajo la influencia de un potencial eléctrico. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se cree que esto se debe a que un fuerte nivel de expresión de ácido siálico en la superficie celular es un marcador de la maduración adecuada de los espermatozoides.

30 En la Figura 3 se ilustra un casete de separación adecuado para un procedimiento integrado en donde una muestra de espermatozoides se enriquece en espermatozoides de alta calidad y se "lava" de compuestos químicos: Las cámaras (20, 30), los electrodos (1 y 2), el aparato de manejo de electrolitos (32, 33, 22, 23) de membranas (31, 21) pueden ser como se describe anteriormente con referencia a la Figura 2. Entre la cámara anódica (30) y la cámara catódica (20) se encuentran dispuestas la cámara de entrada de muestras (10) y la cámara de salida de muestras (40). Estas cámaras están separadas por una membrana (41) que es permeable a iones (y, por lo tanto, a una corriente eléctrica) y permeable a los compuestos químicos (4, 5) y también a los espermatozoides. Preferentemente, la membrana (41) no permite el paso electroforético de células más grandes que los espermatozoides (por ejemplo, los leucocitos) ni permite la mezcla convectiva sustancial entre las cámaras (10) y (40). Se pueden encontrar detalles adicionales de la membrana adecuada en el documento WO 05/033295.

35 El aparato de la Figura 3 se utiliza preferentemente colocando una muestra de espermatozoides en la cámara de entrada de muestras (10). Un potencial eléctrico da como resultado que los espermatozoides sanos migren a través de la membrana (41) a la cámara de salida de muestras (40), donde pueden extraerse para su uso. Los espermatozoides menos saludables presentan menos movilidad electroforética y, por lo tanto, tienen más probabilidades de permanecer en la cámara de entrada de muestras (10).

40 Los compuestos químicos que tienen una carga positiva (5) migrarán en una dirección opuesta a los espermatozoides y, por lo tanto, permanecerán en la cámara (10) o migrarán a través de la membrana (21) hacia la cámara catódica (20), separándose de este modo de los espermatozoides sanos en la cámara de salida de muestras (40).

45 Los compuestos químicos que tienen una carga negativa (4) migrarán en la misma dirección que los espermatozoides sanos y, por lo tanto, pasarán de la cámara de entrada de muestras (10) a la cámara de salida de muestras (40). Después, pueden separarse de los espermatozoides sanos en virtud de que la membrana (31) es permeable a los compuestos químicos pero no a los espermatozoides. Esto permite que los compuestos químicos cargados negativamente (4) pasen a la cámara anódica (30) y, de este modo, se separen de los espermatozoides sanos en la cámara de salida de muestras (40).

Ventajas de un procedimiento integrado

50 El procedimiento de Aitken descrito en el documento WO 2005/033295 proporciona la ventaja de ser una forma rápida y fácil de enriquecer las poblaciones de espermatozoides en cuanto a células que tienen una baja incidencia de daño del ADN y altos niveles de viabilidad y utilidad en los procedimientos de fertilización posteriores.

El procedimiento de uso de la electroforesis para separar compuestos químicos de los espermatozoides descrito en el presente documento proporciona de manera similar ventajas en términos de una técnica que es rápida y de baja intervención y, por lo tanto, que es probable que provoque un daño mínimo a la función de los espermatozoides.

La integración de los dos procedimientos en conformidad con la presente invención trae ventajas adicionales, que incluyen el hecho de que ambos procedimientos pueden llevarse a cabo simultáneamente, reduciendo de este modo el tiempo de intervención total (con ventajas en términos de un riesgo reducido de pérdida de la función de los espermatozoides) y que proporciona ahorros de costes en términos de que se proporciona un único aparato.

Adicionalmente, la exposición de los espermatozoides a agentes químicos, si bien se lleva a cabo para proporcionar beneficios técnicos, en algunas circunstancias puede conllevar un riesgo potencial de daño de una parte de los espermatozoides, por ejemplo, induciendo daños del ADN que pueden hacer que las células sean menos adecuadas para su uso posterior. La integración con el procedimiento de Aitken permite que los espermatozoides que puedan haberse dañado por el tratamiento químico se eliminen de la muestra de células, mejorando de este modo la calidad global de la muestra.

Parámetros eléctricos y otros del procedimiento

La potencia del potencial eléctrico y de la corriente utilizados en el procedimiento de la invención, y otros parámetros relacionados, pueden optimizarse al tiempo del procedimiento, las dimensiones de las cámaras, las propiedades de las membranas y la naturaleza de los espermatozoides, y de los compuestos químicos y el tampón electrolítico. Se puede encontrar orientación adicional para la selección de los parámetros apropiados en los documentos de Ainsworth y Aitken citados anteriormente, los que también describen cómo se puede evaluar la calidad de los espermatozoides antes y después de la separación. Las condiciones pueden, en algunas circunstancias, ser una combinación de todas o algunas de las siguientes:

Tampón puede basarse en un medio de cultivo celular que tenga una osmolaridad de 200 a 400 mOsmol/kg, por ejemplo de 300 a 320 mOsmol/kg, por ejemplo de 310 mOsm/kg. Un tampón adecuado puede, por ejemplo, comprender HEDES 10 mM, cloruro de sodio 30 mM y 0,2 M de azúcar tal como fructosa o sacarosa. El pH es preferentemente de 6 a 9, por ejemplo de 7 a 8, por ejemplo pH 7,4.

Conductividad puede ser de 1 a 10 mS/cm, por ejemplo de 2 a 5, por ejemplo de 3,8 a 4,2 mS/cm, por ejemplo de 4 mS/cm.

Corriente/voltaje Pueden ser adecuadas las corrientes aplicadas de 20 a 200 mA. Por ejemplo de 50 a 150 mA, por ejemplo de 60 a 100 mA, por ejemplo de 70 a 80 mA, por ejemplo de 75 mA. Se puede aplicar un voltaje entre el cátodo y el ánodo para proporcionar una intensidad de campo eléctrico de 10 a 30 V/cm, por ejemplo de 15 a 20 V/cm, por ejemplo de 16 a 18 V/cm, por ejemplo de 17 V/cm. El voltaje puede pulsarse a lo largo del tiempo o puede modularse en cualquier forma de onda apropiada, en cuyo caso los valores proporcionados inmediatamente en líneas anteriores deben entenderse como valores medios promediados durante todo el período de tiempo electroforético.

Temperatura la temperatura se elige preferentemente para una buena supervivencia del esperma. Para el esperma humano, esto podría ser de 15 °C a 40 °C, por ejemplo de 20 °C a 30 °C, por ejemplo de 20 °C a 25 °C, por ejemplo de 23 °C.

Tiempo Preferentemente, el procedimiento dura unos pocos segundos o minutos, por ejemplo de 10 a 1000 segundos. Por ejemplo de 30 a 300, 50 a 500, 10 a 100 segundos.

Membranas

La membrana de separación (41) entre la cámara de entrada de muestras y la misma cámara de salida donde esté presente debe ser permeable a iones y también permeable a los compuestos químicos como se define en el presente documento, y a los espermatozoides cuando se someten a una fuerza electroforética. Preferentemente, no es permeable a otros tipos celulares, por ejemplo, leucocitos. Se puede construir de cualquier material adecuado, por ejemplo, un material plástico tal como policarbonato, poliestireno, polipropileno o polietileno. El policarbonato puede ser especialmente adecuado. Un tamaño de poro de 5 a 50 μm (por ejemplo, 5 μm o 10 μm) puede ser especialmente adecuado.

Las membranas de restricción (21 y 31) entre las una o dos cámaras de muestra y las respectivas cámaras catódicas y anódicas deben ser permeables a iones y también permeables a los compuestos químicos, pero impermeables a los espermatozoides. Se ha descubierto que una membrana que tiene un valor de corte molecular de 100 KDa o menos, por ejemplo, 80, 50, 40, 20 o 10 KDa o menos, es especialmente adecuada. Se pueden utilizar membranas fabricadas mediante una diversidad de técnicas que utilizan diversos materiales. Por ejemplo, puede ser adecuada una membrana de poliacrilamida proporcionada opcionalmente en una estructura de soporte.

Construcción del casete

5 El casete (15) puede construirse de cualquier material adecuado. El plástico moldeado por inyección (por ejemplo, policarbonato) puede ser especialmente adecuado debido a su facilidad de producción y esterilización. Las disposiciones de las cámaras que se muestran en las figuras en el presente documento son solo esquemáticas y se pueden utilizar otras disposiciones. El volumen de la cámara puede ser, por ejemplo, de entre 0,5 µl y 5 ml, o ejemplo de entre 50 µl y 1 ml, por ejemplo de entre 100 µl y 800 µl, por ejemplo de 200 µl a 600 µl, por ejemplo de aproximadamente 400 µl. El casete puede incluir medios de entrada y salida para la introducción y extracción de material de las cámaras.

10 Uso posterior de los espermatozoides

15 El procedimiento divulgado en el presente documento incluye opcionalmente la etapa poseparación de retirada de los espermatozoides de la cámara de salida de muestras 40, opcionalmente de evaluación de la calidad de los espermatozoides (por ejemplo, utilizando un ensayo de viabilidad tal como un ensayo de exclusión de eosina, un ensayo de daño de ADN, tal como un ensayo TUNEL, un ensayo de movilidad o simplemente un recuento celular), opcionalmente, la formulación de las células en un medio adecuado y después la "carga" las células en un dispositivo adecuado para la inseminación, por ejemplo, inseminación intrauterina. Opcionalmente, el procedimiento incluye adicionalmente la etapa de llevar a cabo la inseminación de un animal hembra o de una mujer, por ejemplo, mediante inseminación intrauterina. Los espermatozoides procesados en conformidad con el primer aspecto de la invención pueden cargarse en un dispositivo adecuado para su uso en IVF o ICSI. Opcionalmente, el procedimiento incluye adicionalmente la etapa de uso de los espermatozoides en un procedimiento de IVF o ICSI.

20 Por consiguiente, la divulgación también se refiere al uso de un espermatozoide separado de un compuesto químico mediante electroforesis de acuerdo con un procedimiento del primer aspecto de la invención en inseminación intrauterina.

25 Métodos de pretratamiento químico de los espermatozoides

30 La divulgación también proporciona un método de tratamiento de espermatozoides con un compuesto químico para aumentar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, que comprende poner en contacto los espermatozoides con un compuesto químico *ex vivo* y después separar los espermatozoides del compuesto químico mediante electroforesis, que comprende someter a los espermatozoides a un potencial eléctrico entre un cátodo y un ánodo, de manera que los espermatozoides se separan del compuesto químico.

35 De acuerdo con este aspecto, los espermatozoides, el compuesto químico pueden ser como se describe anteriormente con referencia a otros aspectos de la invención. El compuesto químico es un compuesto para la promoción de la movilidad de los espermatozoides. El procedimiento y el aparato de separación pueden ser como se describe anteriormente en referencia al primer aspecto de la invención. Los espermatozoides pueden utilizarse posteriormente en inseminación intrauterina o prepararse para tal uso.

40

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de separación de espermatozoides de un compuesto químico al cual los espermatozoides se han expuesto previamente *ex vivo* para aumentar su capacidad de fertilización mediante electroforesis, que comprende someter a los espermatozoides a un potencial eléctrico entre un cátodo y un ánodo de manera que los espermatozoides se separen del compuesto químico, en donde el compuesto químico tiene una carga negativa o una carga positiva y en donde es un agente promotor de la movilidad de espermatozoides, en donde los espermatozoides son simultáneamente enriquecidos en cuanto a espermatozoides de alta calidad.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la separación se lleva a cabo a través de una barrera permeable a iones.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el compuesto químico está cargado positivamente y, por lo tanto, migra bajo la influencia del potencial eléctrico hacia el cátodo.
4. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde los espermatozoides o una parte de los mismos migran bajo la influencia del potencial eléctrico hacia el ánodo.
5. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en donde los espermatozoides migran a través de una membrana permeable a espermatozoides que excluye otros tipos de células, por ejemplo, leucocitos.
6. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, 2, 3 o 5, en donde el compuesto químico está cargado negativamente y, por lo tanto, migra bajo la influencia del potencial eléctrico hacia el ánodo en la misma dirección que los espermatozoides, pero en donde el compuesto químico migra a través de una membrana permeable a compuestos químicos a través de la cual los espermatozoides no pueden pasar.
7. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5 o 6, que comprende las etapas de:
- B, colocar una muestra de semen o espermatozoides *ex vivo* en una solución iónica, en una cámara de entrada de muestras de un casete de electroforesis, en donde dicha cámara de entrada de muestras está separada de una cámara de salida de muestras por una primera membrana que es permeable tanto a iones como a espermatozoides;
- C, utilizar electrodos para aplicar un potencial eléctrico a través de la cámara de entrada de muestras y la cámara de salida de muestras de modo que la cámara de salida de muestras esté a un potencial eléctrico más alto (más positivo) que la cámara de entrada de muestras;
- D, permitir que los espermatozoides o una parte de los mismos migren de la cámara de entrada de muestras a la cámara de salida de muestras;
- E, proporcionar una cámara anódica adyacente a la cámara de salida de muestras, estando dicha cámara anódica separada de la cámara de salida de muestras por una membrana permeable a iones (la "segunda membrana" que es impermeable a espermatozoides de modo que los espermatozoides no puedan ponerse en contacto con dicho ánodo.
- en donde dicho método se **caracteriza por** la etapa adicional A, que precede a la etapa B:
- A, pretratar la muestra de semen o espermatozoides *ex vivo* con un compuesto químico para mejorar la calidad de los espermatozoides, en donde dicho compuesto químico tiene una carga positiva o una carga negativa en solución y, por lo tanto, es electroforéticamente móvil;
- en donde dicho método además se **caracteriza por que** el compuesto químico cargado negativamente, si está presente, migra bajo la influencia del potencial eléctrico de la cámara de entrada de muestras, a la cámara de salida de muestras y después de la cámara de salida de muestras, a través de la segunda membrana a la cámara anódica logrando de este modo la separación de los espermatozoides del compuesto químico cargado negativamente y en donde el compuesto químico cargado positivamente, si está presente, migra bajo la influencia del potencial eléctrico de la cámara de entrada de muestras a una cámara catódica proporcionada adyacente a la cámara de entrada de muestras y separada de la cámara de entrada de muestras mediante una tercera membrana permeable al compuesto químico pero impermeable a espermatozoides, logrando de este modo la separación de los espermatozoides del compuesto químico cargado positivamente.
8. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, en donde el potencial eléctrico se aplica durante menos de 5 minutos para lograr la separación de los espermatozoides o una porción de los mismos del compuesto químico.
9. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde dicha primera membrana tiene un tamaño de poro de 4 a 10 $\mu\text{mol/l}$.
10. Un método de tratamiento de espermatozoides con un compuesto químico para aumentar la capacidad de

fertilización de los espermatozoides, que comprende poner en contacto los espermatozoides con un compuesto químico *ex vivo* y después separar los espermatozoides del compuesto químico mediante electroforesis, que comprende someter a los espermatozoides a un potencial eléctrico entre un cátodo y un ánodo, de manera que los espermatozoides se separen del compuesto químico, en donde el compuesto químico tiene una carga negativa o una carga positiva y en donde es un agente promotor de la movilidad de espermatozoides, en donde los espermatozoides son simultáneamente enriquecidos en cuanto a espermatozoides de alta calidad.

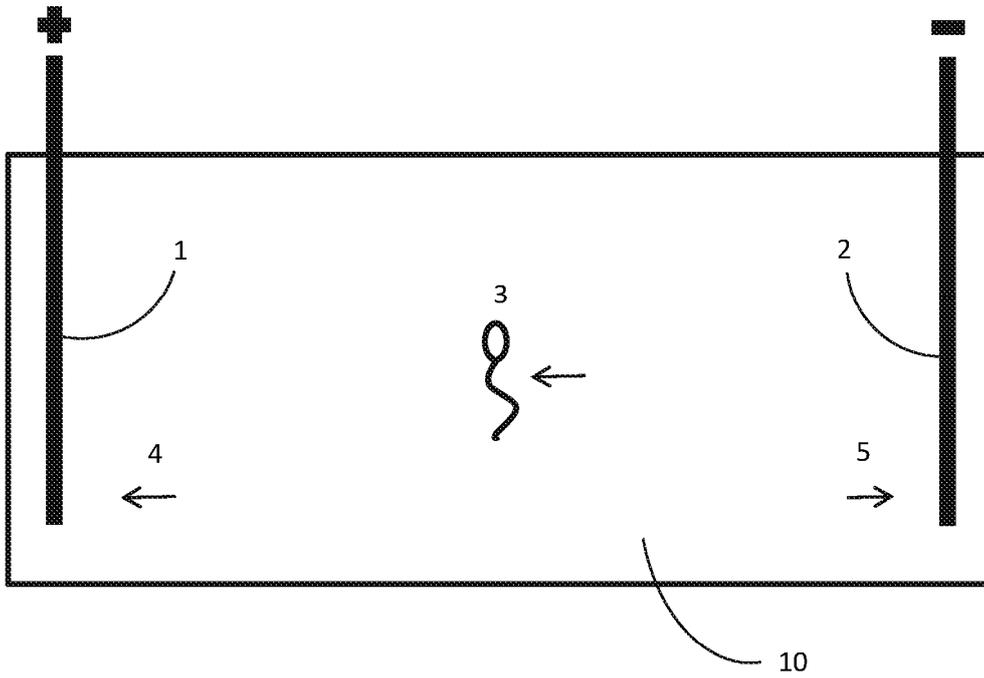


Fig. 1

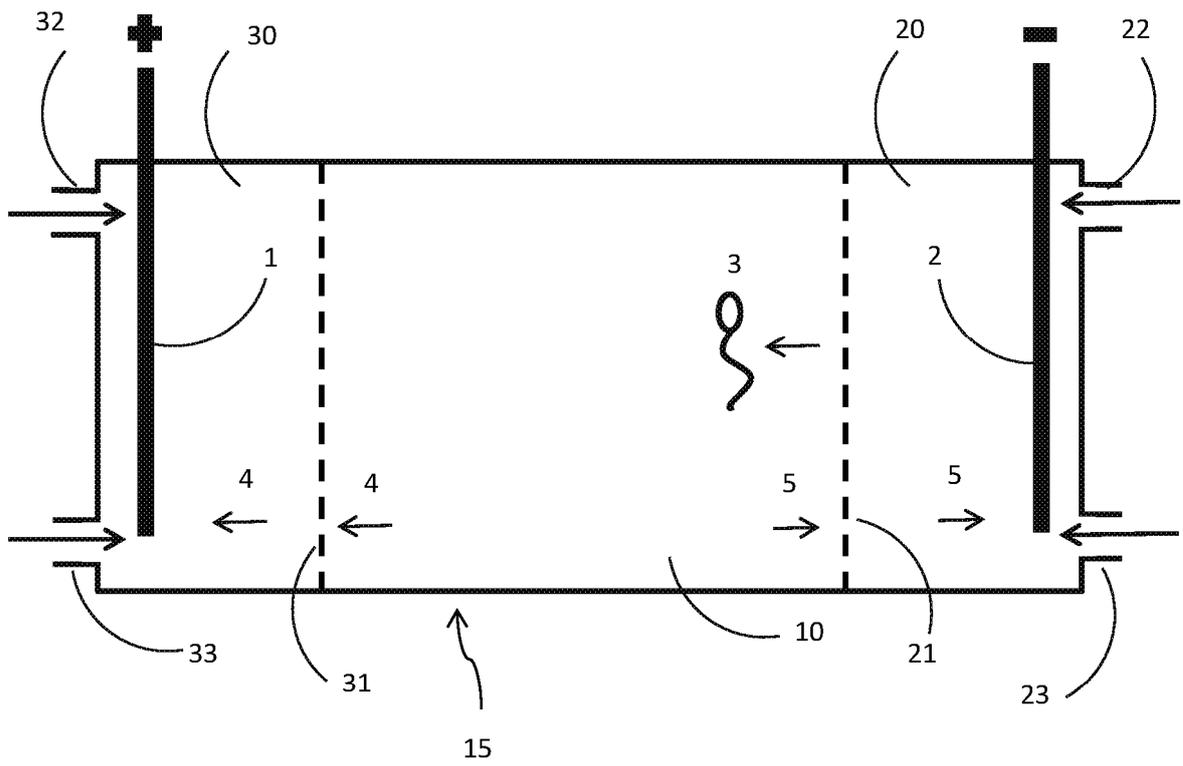


Fig. 2

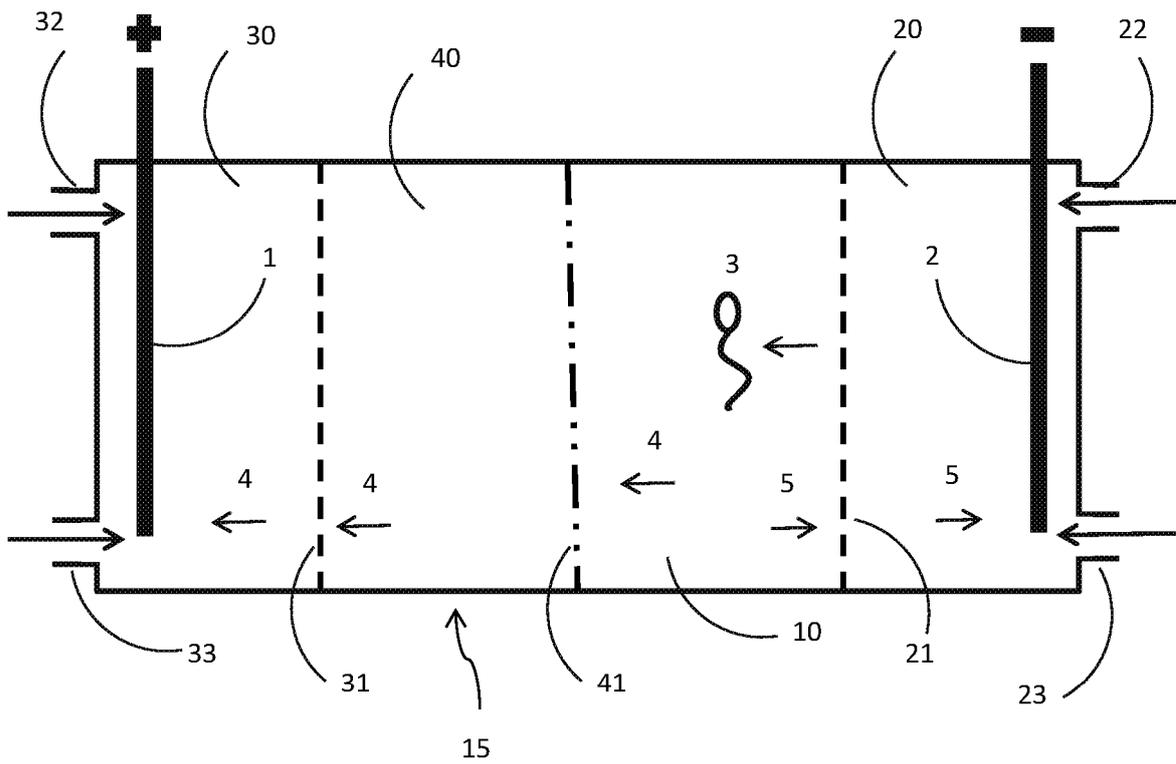


Fig. 3