

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 194**

51 Int. Cl.:

C12M 1/00 (2006.01)

C12M 1/12 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

C12M 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2017 PCT/DK2017/050222**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.01.2018 WO18001437**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2017 E 17768972 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3455340**

54 Título: **Un aparato para la incubación de un material biológico**

30 Prioridad:

30.06.2016 DK 201600390

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

22.02.2021

73 Titular/es:

**ESCO MEDICAL APS (100.0%)
Kringelled 10
8250 Egå, DK**

72 Inventor/es:

PEDERSEN, THOMAS WILLIAM

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 807 194 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

Un aparato para la incubación de un material biológico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la fecundación *in vitro*. Más específicamente, la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un aparato para la incubación de un material biológico. En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un sistema para la incubación de un material biológico. En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un aparato según el primer aspecto o de un sistema según el segundo aspecto para la incubación de un material biológico. En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para evaluar las condiciones óptimas de incubación para un material biológico viable. En un quinto aspecto, la presente
10 invención se refiere a un método para seleccionar un material biológico específico que tenga la más alta calidad, entre una serie de materiales biológicos.

Antecedentes de la invención

15 El desarrollo de la fecundación *in vitro* (FIV) durante las últimas décadas ha dado como resultado métodos y técnicas considerablemente mejoradas, lo que conduce a mejores tasas de éxito en términos de mejores tasas de nacimientos con éxito originadas a partir de dichas técnicas.

La fecundación *in vitro* implica capturar un óvulo maduro del ovario de una hembra, fecundar el ovario con un espermatozoide, incubar el óvulo fecundado en un entorno controlado y luego implantar el óvulo fecundado e incubado en el útero femenino.

20 Puesto que lo más común es utilizar la fecundación *in vitro* en mujeres o parejas con problemas evidentes para quedarse embarazados de forma natural, lo que implica de este modo un cierto grado de fecundidad reducida por la parte masculina o femenina de la pareja, o ambas, y como las técnicas de fecundación *in vitro* implican procedimientos bastante caros, estas técnicas de fecundación *in vitro* generalmente se realizan buscando optimizar la eficiencia, especialmente teniendo en cuenta que con frecuencia se necesitará más de una implantación de un óvulo fecundado en el útero femenino para lograr un embarazo satisfactorio.

25 El documento WO 2014/110008 hace referencia a métodos *in vitro* no invasivos para evaluar la condición metabólica de los ovocitos y/o embriones con un microscopio de obtención de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM, por sus siglas en inglés), que puede usarse, por ejemplo, en la evaluación de ovocitos y embriones en tecnologías de reproducción asistida.

30 El documento WO 2015/001396 describe un dispositivo para supervisar el desarrollo de, p. ej., un embrión de un ser humano, que tiene un compartimento que incluye una unidad de calentamiento para calentar el interior del compartimento, donde el alojamiento está provisto de cámaras para captar imágenes de material biológico en una placa de cultivo.

Por consiguiente, para hacer que las técnicas de fecundación *in vitro* resulten eficientes, la hembra normalmente recibe un tratamiento hormonal antes de extraer los óvulos de su ovario.

35 Dicho tratamiento hormonal hará que el ovario femenino ovule no solo un óvulo, sino una multitud de óvulos al mismo tiempo.

Por consiguiente, para aumentar las posibilidades de un embarazo viable y satisfactorio, se fecundará e incubará más de un óvulo de la misma hembra en una incubadora.

40 Las incubadoras de la técnica anterior incluyen un compartimento que puede controlarse en términos de temperatura, humedad y composición de la atmósfera. La mayoría de compartimentos de la incubadora permite alojar más de una placa de cultivo que comprende los óvulos fecundados.

Sin embargo, no es una tarea fácil realizar un una fecundación e incubación *in vitro* satisfactorias de un óvulo.

Una de las principales razones de la baja tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es la ausencia de métodos fiables para seleccionar los embriones de la más alta calidad para la transferencia.

45 La falta de métodos para evaluar la calidad del embrión ha llevado a esfuerzos sustanciales para desarrollar mejores ensayos de viabilidad embrionaria. El método actual más fiable para predecir la calidad del embrión consiste en examinar la morfología embrionaria antes de la transferencia utilizando sistemas estándar de microscopía de luz transmitida.

50 En los métodos para el examen de la calidad de la morfología embrionaria, se proporcionan medios de cámara dentro de las incubadoras de la técnica anterior y estos pueden estar equipados con una óptica microscópica que permite captar imágenes en primer plano de cada óvulo fecundado con el fin de seleccionar solo aquellos óvulos que exhiban un desarrollo normal o saludable e implantar únicamente esos óvulos en el útero de la hembra.

En los últimos años, ha sido una práctica común equipar los medios de cámara con medios de procesamiento de imágenes en tiempo real para permitir una mejor selección de los óvulos fecundados adecuados para su posterior implantación en el útero.

5 Las imágenes en tiempo real proporcionan un estudio visual del desarrollo físico visible, como el tiempo de división de las células en diferentes fases, la velocidad general de división de las células. Los estudios del huso pueden representar otro modo de evaluar la fase de desarrollo del mismo en un embrión.

Sin embargo, los criterios de selección son generalmente subjetivos y solo dan como resultado una tasa de éxito de 35 %.

10 Los métodos no basados en microscopía recientemente propuestos, que utilizan ensayos basados en genómica, transcriptómica o proteómica, requieren una biopsia del embrión y, de este modo, son invasivos y reducen significativamente las tasas de supervivencia del embrión. Un enfoque metabólico que inicialmente se mostró prometedor consistía en analizar el estado metabólico del embrión midiendo los cambios en los metabolitos en los medios de cultivo del embrión. Sin embargo, un ensayo aleatorizado prospectivo recientemente no ha demostrado que la utilización de dicha evaluación metabólica mejore la selección sobre la evaluación morfológica sola.

15 Para mejorar la seguridad de la madre y el feto, y también para reducir los costes de las tecnologías de reproducción asistida al reducir la cantidad de veces que uno tiene que intentar la implantación para quedar embarazada y también al reducir las gestaciones múltiples, se prefiere emplear métodos mínimamente invasivos, simples y fiables para evaluar la viabilidad de los embriones u ovocitos.

20 Aunque la captación de imágenes en tiempo real usando la captación de imágenes en el espectro visible puede haber resultado útil para determinadas aplicaciones dentro del campo de la supervisión del desarrollo de muestras biológicas en técnicas de fecundación *in vitro*, dicho dispositivo de captación de imágenes presenta importantes inconvenientes.

25 Dichos inconvenientes residen en el hecho de que al usar un dispositivo de captación de imágenes en tiempo real que funciona en el espectro visible, solo la parte del material biológico que está más cerca del objetivo de la óptica del dispositivo de captación de imágenes será de hecho visible y, por ende, captado por el dispositivo de captación de imágenes.

En otras palabras, el material biológico que esté más cerca del objetivo de la óptica del dispositivo de captación de imágenes sombreará la óptica de modo que el material inferior de la muestra biológica pueda no ser visible y, por ende, puede no proporcionar información importante e interesante relacionada con el desarrollo del material biológico.

30 El resultado es que al usar un dispositivo de captación de imágenes en tiempo real que funciona en el espectro visible al supervisar el desarrollo de una muestra biológica, es posible que no se detecten cambios físicos importantes en la muestra biológica que se producen en áreas que no están en las inmediaciones del objetivo de la óptica del dispositivo de captación de imágenes y, por ende, la información recuperada utilizando luz en el espectro visible en un dispositivo de captación de imágenes en tiempo real para supervisar una muestra biológica puede ser bastante limitada.

35 En los últimos años, se ha desarrollado una técnica microscópica alternativa. Esta técnica se denomina microscopía de obtención de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM).

En la microscopía de tiempo de vida de imagen fluorescente, los fluoróforos del material biológico se llevan a un estado excitado sometiendo la muestra biológica a un pulso muy corto de radiación electromagnética. Después, dentro de un determinado tiempo de retardo, el fluoróforo vuelve a su estado fundamental energético con el resultado de emitir radiación electromagnética.

40 El lapso de tiempo entre el pulso corto de radiación electromagnética, por un lado, y la emisión de radiación electromagnética del fluoróforo, por otro lado, serán indicativos del estado metabólico del material biológico viable en cuanto a que el número de sustancias naturales involucradas en el metabolismo del material biológico son fluoróforos. Ejemplos de dichos fluoróforos son nicotinamida adenina (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FAD).

45 Por consiguiente, en la microscopía de tiempo de vida de imagen fluorescente, una imagen se produce en función de las diferencias en la tasa de descomposición del estado excitado de una muestra fluorescente. De este modo, la FLIM es una técnica de obtención de imágenes de fluorescencia en la que el contraste se basa en el tiempo de vida de los fluoróforos individuales en lugar de sus espectros de emisión. El tiempo de vida de la fluorescencia se define como el tiempo promedio que una molécula permanece en un estado excitado antes de regresar al estado fundamental mediante la emisión de un fotón.

50 El recuento de un solo fotón correlacionado con el tiempo (TCSPC, por sus siglas en inglés) se utiliza para determinar el tiempo de vida de la fluorescencia. En el TCSPC, se mide el tiempo entre la excitación de la muestra por un láser pulsado y la llegada del fotón emitido al detector. El TCSPC requiere un "inicio" definido, proporcionado por la electrónica que dirige el pulso láser o un fotodiodo, y una señal definida de "parada", realizada mediante detección con detectores sensibles a un solo fotón (p. ej., diodos de avalancha de fotón único, SPAD, por sus siglas en inglés).

55 La medición de este retardo se repite muchas veces para tener en cuenta la naturaleza estadística de la emisión de

5 fluoróforos. Los tiempos de retardo se clasifican en un histograma que traza la aparición de emisiones a lo largo del tiempo después del pulso de excitación. Para adquirir una imagen fluorescente de tiempo de vida, los fotones tienen que atribuirse a los diferentes píxeles, lo que se hace almacenando los tiempos de llegada absolutos de los fotones además del tiempo de llegada relativo con respecto al pulso láser. Las señales de marcador de línea y marco del escáner del microscopio confocal se registran adicionalmente para clasificar el flujo de tiempo de los fotones en los diferentes píxeles.

10 Las células con un estado metabólico adecuado medido objetivamente, como lo indica el tiempo de vida fluorescente de NAHD unido a proteína y/o NAHD libre o unido a proteína y/o FAD libre, indican un ovocito o embrión que puede seleccionarse para fecundación o implantación *in vitro* y, si el estado metabólico es inadecuado, el ovocito/embrión puede ser descartado de la fecundación o implantación *in vitro*.

Por consiguiente, al registrar el retardo en la emisión de radiación electromagnética de los fluoróforos, en relación con el momento de impartir un pulso de radiación al que se ha sometido el fluoróforo, se puede obtener un mapa del material biológico, por lo que incluso las áreas que no se encuentran en la superficie del material biológico pueden estudiarse.

15 Dicho mapeo puede usarse para comparar el estado metabólico de un material biológico con el estado metabólico de otro material biológico. Sin embargo, al realizar dicha comparación, es importante con respecto a la obtención de resultados fiables que los materiales biológicos que se comparan se encuentren en fases de desarrollo comparables. Es decir, para proporcionar un análisis comparativo por medio de espectros FLIM con respecto, p. ej., a dos materiales biológicos viables diferentes, es necesario asegurarse de que los dos materiales biológicos viables se encuentren en una fase comparativa de desarrollo; de lo contrario, las fases metabólicas, según lo expresado por los espectros FLIM, de los materiales biológicos no se pueden comparar realmente.

La presente invención tiene como objeto proporcionar aparatos, usos y métodos para permitir mejorar los estudios de desarrollo de muestras biológicas en condiciones ambientales estrictamente controladas, como en relación con la temperatura y la composición de la atmósfera circundante.

25 Especialmente, la presente invención tiene como objeto proporcionar aparatos, usos y métodos para determinar las condiciones óptimas de incubación de materiales biológicos viables en forma de embriones u ovocitos que se van a implantar en el útero de una hembra humana.

Breve descripción de la invención

30 Este objeto se cumple con la presente invención en sus diversos aspectos. Por consiguiente, la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un aparato para la incubación de un material biológico viable;

dicho aparato comprende:

un alojamiento que tiene una extensión en una dirección longitudinal, en una dirección transversal y en una dirección perpendicular a la dirección longitudinal y la dirección transversal; comprendiendo dicho alojamiento:

35 dos o más compartimentos para placas de cultivo, cada uno adaptado para alojar, una o más placas de cultivo que comprenden un material biológico;

en donde dicho aparato comprende un dispositivo de captación de imágenes;

en donde dicho aparato comprende una unidad de control para controlar el funcionamiento del mismo;

40 en donde al menos parte de dicho dispositivo de captación de imágenes está configurada para poder moverse en relación con los dos o más compartimentos para placas de cultivo, permitiendo de ese modo la captación de imágenes de uno o más de dichos materiales biológicos alojados en dichas una o más placas de cultivo; y

en donde dicho aparato comprende una unidad FLIM (microscopio de obtención de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia)

45 en donde al menos parte de dicha unidad FLIM está configurada para poder moverse en relación con los dos o más compartimentos para placas de cultivo, permitiendo de ese modo la captación de espectros FLIM de uno o más de dichos materiales biológicos alojados en dichas una o más placas de cultivo;

en donde dicha unidad FLIM comprende independientemente:

- una fuente láser, tal como una fuente láser pulsada, tal como un láser de diodo o un láser de excitación multifotón; y opcionalmente también uno o más de los siguientes elementos:

- un detector sensible a un solo fotón;

50 - un espejo dicróico (para la separación de la señal de fluorescencia de la luz de excitación);

- un objetivo (para enfocar la luz de excitación en la muestra y/o para recoger la señal de fluorescencia);
- un sistema de control para controlar dicha unidad FLIM;

5 en donde dicha fuente láser está acoplada a un medio óptico para transportar radiación electromagnética, tal como una o más fibras ópticas, comprendiendo dicho medio óptico un extremo distal configurado para dirigirse cerca del material biológico, para transportar por transmisión radiación electromagnética.

En su segundo aspecto, la presente invención se refiere a un sistema para la incubación de un material biológico viable;

dicho sistema comprende:

- un aparato según el primer aspecto de la presente invención en combinación con
- 10 -una o más placas de cultivo.

En su tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un aparato según el primer aspecto de la presente invención o de un sistema según el segundo aspecto de la presente invención para la incubación de un material biológico viable; con la condición de que dicho uso no se relacione con el uso comercial industrial y/o destructivo de un embrión humano.

15 En su cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para evaluar las condiciones óptimas de incubación para un material biológico viable, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

- i) proporcionar un aparato según el primer aspecto de la presente invención o proporcionar un sistema según el primer aspecto de la presente invención;
- 20 ii) alojar al menos dos placas de cultivo, comprendiendo cada una de las cuales uno o más materiales biológicos viables en compartimentos separados para placas de cultivo de dicho aparato;
- iii) incubar dichos materiales biológicos en condiciones de incubación, en donde las condiciones de incubación físicas y/o químicas con respecto al material biológico que se aloja en un compartimento de placa de cultivo difieren en uno o más parámetros de las condiciones de incubación físicas y/o químicas con respecto al material biológico que se aloja en otro compartimento de placas de cultivo;
- 25 iv) durante la etapa iii), usar la unidad FLIM de dicho aparato para captar espectros FLIM;
- v) evaluar la calidad del material biológico en función de dichos espectros FLIM; con la condición de que dicho método no implique el uso comercial industrial y/o destructivo de un embrión humano.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para seleccionar un material biológico específico que tenga la más alta calidad, entre una serie de materiales biológicos, en donde dicho método comprende:

- 30 a) proporcionar un aparato según el primer aspecto de la presente invención;
- b) incubar dicha serie de materiales biológicos en dicho aparato;
- c) con respecto a cada específico de dicha serie de materiales biológicos, usar dicho dispositivo de captación de imágenes para identificar un estado morfológico predeterminado de dicho material biológico específico;
- 35 d) en el caso de que se haya alcanzado un estado morfológico predeterminado con respecto a un material biológico específico, usar dicha unidad FLIM para captar un espectro FLIM de dicho material biológico específico;
- e) comparar los espectros FLIM obtenidos con respecto a dicha serie de materiales biológicos y asociados con el mismo estado morfológico de ese material;
- f) en función de la comparación realizada en la etapa e), seleccionar ese material biológico específico que tiene la más alta calidad, en función de uno o más criterios predeterminados;
- 40 con la condición de que la selección realizada en la etapa f) no se relacione con la selección de un embrión humano.

La presente invención, en sus diversos aspectos, proporciona una mejora en el desarrollo de la supervisión de un material biológico, tal como un material biológico viable porque la unidad FLIM permite mirar más profundamente en el tejido del material biológico.

45 Esto es especialmente importante para fines de investigación en los que se prueba una amplia gama de diferentes entornos de incubación y/o condiciones de incubación y/o protocolos de incubación para, por ensayo y error, encontrar los entornos de incubación y/o condiciones de incubación más óptimos y/o protocolos de incubación para el material biológico. En una realización específica, dichas optimizaciones se refieren a encontrar entornos de incubación óptimos

y/o condiciones de incubación y/o protocolos de incubación para un ovocito o un embrión.

Con el aparato, el sistema, el uso y el método según la presente invención es posible realizar una serie de incubaciones casi idénticas de materiales biológicos, en donde solo un parámetro relacionado con las condiciones de incubación físicas y/o químicas difiere entre las condiciones con respecto a dos materiales biológicos.

- 5 De ese modo, se puede determinar el efecto de variar solo un parámetro relacionado con las condiciones físicas y/o químicas de incubación. Esto, a su vez, puede utilizarse para determinar los parámetros óptimos colectivos relacionados con las condiciones físicas y/o químicas de incubación.

Dicha optimización es posible porque el aparato de la presente invención comprende dos o más compartimentos para placas de cultivo, cada uno adaptado para alojar, una o más placas de cultivo que comprenden un material biológico.

- 10 Para casi todos los fluoróforos, la tasa de transferencia de energía al entorno depende de la concentración de iones, oxígeno, valor del pH o la unión de proteínas en una célula. Existe una relación directa entre las concentraciones de estos iones, llamados extintores de fluorescencia, y el tiempo de vida de fluorescencia del fluoróforo.

- 15 Por ende, la FLIM no solo puede usarse para discriminar entre diferentes fluoróforos en función de sus vidas características (en lugar de sus propiedades espectrales), sino también para distinguir entre diferentes entornos dentro de la célula en función de los cambios en el tiempo de vida del mismo fluoróforo si está presente en entornos locales que contengan concentraciones variables de extintores de fluorescencia.

Esto significa que el metabolismo de un material biológico viable puede estudiarse con la presente invención en función de los efectos de diversos entornos del fluoróforo, como la polaridad, el pH, la temperatura, la concentración de iones, etc.

- 20 Es más, al utilizar la presente invención, será posible la detección de interacciones moleculares que permitan mediciones de distancia en el intervalo de nanómetros. De nuevo, esto puede hacerse con referencia a diversas condiciones de incubación.

Otro concepto más que puede estudiarse usando la presente invención es la detección de cambios intramoleculares conformacionales debido al plegamiento o la acción de motores moleculares.

- 25 Otro concepto adicional que puede estudiarse usando la presente invención es la capacidad de distinguir los fluoróforos empleados y determinar sus características espectrales, así como discriminar la fluorescencia del fondo de fluorescencia de un material biológico viable, permitiendo de este modo una eficiencia de detección mejorada y una localización de marcadores más precisa.

- 30 Otro concepto adicional más que puede estudiarse usando la presente invención es la caracterización y el control de calidad de nuevos materiales a través de etiquetas fluorescentes o puntos cuánticos.

El uso del aparato de la invención en los estudios proporciona la construcción de una base de datos que comprende datos recuperados de la microscopía FLIM del material biológico viable. Al comparar la viabilidad real de varios materiales biológicos diferentes y al comparar los espectros FLIM de estos materiales, es posible predecir esos indicadores o características en un espectro FLIM que corresponden a un material biológico viable "saludable".

- 35 Por ende, en función del análisis estadístico, será posible, utilizando el aparato según la presente invención, evaluar la calidad de un material biológico viable específico, tal como un ovocito o un embrión.

Cabe destacar que las invenciones descritas en la presente descripción y reivindicadas en las reivindicaciones adjuntas no se refieren de ninguna manera a los usos o métodos para la implantación de un embrión no humano en el útero de una mujer humana.

40 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra en una vista en perspectiva una realización de un dispositivo según la presente invención.

La figura 2 muestra esquemáticamente el principio del dispositivo según la presente invención.

La figura 3 ilustra esquemáticamente detalles de un sistema de control para controlar un dispositivo según la presente invención.

- 45 La figura 4 ilustra una configuración simple de TCSPC para mediciones de tiempo de vida de fluorescencia.

La figura 5 ilustra un histograma TCSPC obtenido con la configuración de la figura 4.

La figura 6 ilustra una configuración de diodo láser/detector de la realización usando cables ópticos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un aparato para la incubación de un material biológico viable; dicho aparato comprende:

5 un alojamiento que tiene una extensión en una dirección longitudinal, en una dirección transversal y en una dirección perpendicular a la dirección longitudinal y la dirección transversal; comprendiendo dicho alojamiento:

dos o más compartimentos para placas de cultivo, cada uno adaptado para alojar, una o más placas de cultivo que comprenden un material biológico;

en donde dicho aparato comprende un dispositivo de captación de imágenes;

en donde dicho aparato comprende una unidad de control para controlar el funcionamiento del mismo;

10 en donde al menos parte de dicho dispositivo de captación de imágenes está configurada para poder moverse en relación con los dos o más compartimentos para placas de cultivo, permitiendo de ese modo la captación de imágenes de uno o más de dichos materiales biológicos alojados en dichas una o más placas de cultivo; y

en donde dicho aparato comprende una unidad FLIM (microscopio de obtención de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia)

15 en donde al menos parte de dicha unidad FLIM está configurada para poder moverse en relación con los dos o más compartimentos para placas de cultivo, permitiendo de ese modo la captación de espectros FLIM de uno o más de dichos materiales biológicos alojados en dichas una o más placas de cultivo; en donde dicha unidad FLIM comprende independientemente:

20 - una fuente láser, tal como una fuente láser pulsada, tal como un láser de diodo o un láser de excitación multifotón; y opcionalmente también uno o más de los siguientes elementos:

- un detector sensible a un solo fotón;

- un espejo dicróico (para la separación de la señal de fluorescencia de la luz de excitación);

- un objetivo (para enfocar la luz de excitación en la muestra y/o para recoger la señal de fluorescencia);

- un sistema de control para controlar dicha unidad FLIM;

25 en donde dicha fuente láser está acoplada a un medio óptico para transportar radiación electromagnética, tal como una o más fibras ópticas, comprendiendo dicho medio óptico un extremo distal configurado para dirigirse cerca del material biológico, para transportar por transmisión radiación electromagnética.

Por consiguiente, el aparato del primer aspecto de la presente invención es un aparato para la incubación de un material biológico viable y comprende un dispositivo de captación de imágenes así como una unidad FLIM.

30 De ese modo, se logra que durante la incubación de un material biológico, tal como un ovocito o un embrión, el estado morfológico del material biológico pueda supervisarse mediante el dispositivo de captación de imágenes, mientras que el estado metabólico del material biológico se puede supervisar utilizando la unidad FLIM. Esto es posible en parte porque el dispositivo de captación de imágenes y la unidad FLIM, o al menos partes de la misma, son móviles en relación con los compartimentos de placas de cultivo. El dispositivo de captación de imágenes y la unidad FLIM pueden moverse individualmente o conjuntamente en un conjunto de medios de movimiento comunes.

35 Hacer que la fuente láser se acople a un medio óptico para transportar radiación electromagnética, tal como una o más fibras ópticas, facilita que la parte de la unidad FLIM responsable de transmitir y recibir radiación electromagnética se mueva en relación con el material biológico que se está investigando.

40 En conjunto, esto proporciona una base mejorada para determinar la calidad de un material biológico, especialmente en el caso de un ovocito o un embrión, con el fin de seleccionar esa especie que tiene la mayor posibilidad de llevar a un embarazo satisfactorio cuando se implanta en el útero de una mujer.

45 En una realización del primer aspecto de la presente invención, el número de compartimentos individuales para placas de cultivo es 2 - 25, por ejemplo, 3 - 24, tal como 4 - 23, p. ej., 5 - 22, tal como 6 - 21, p. ej., 7 - 20 u 8 - 19, por ejemplo, 9 - 18, tal como 10 - 17, por ejemplo, 11 - 16, tal como 12 - 15 o 13 - 14 compartimentos individuales para placas de cultivo.

Dichos números de compartimentos de placas de cultivo individuales y/o separados permiten en una situación de investigación llevar a cabo una serie de protocolos paralelos en donde cada protocolo difiere en solo un parámetro de un compartimento de placas de cultivo a otro. De ese modo, se puede determinar la optimización de protocolos de un tipo específico de material biológico viable.

- 5 En una realización del primer aspecto de la presente invención, uno o más de dichos compartimentos individuales para placas de cultivo, preferiblemente todos los dichos compartimentos de placas de cultivo comprenden su propia tapa individual, en donde cada una de dichas tapas está configurada para poder cambiar entre una configuración abierta que proporciona acceso al compartimento de placas de cultivo correspondiente y una configuración cerrada en la que el compartimento de placas de cultivo correspondiente está hermetizado con respecto al entorno.
- Al proporcionar compartimentos de placas de cultivo individuales y separados con su propia tapa individual, se garantiza que el entorno de un compartimento de placas de cultivo se pueda mantener en condiciones predeterminadas, independientemente del entorno de los otros compartimentos de placas de cultivo.
- 10 En una realización del primer aspecto de la presente invención, el aparato comprende además un medio de regulación de la temperatura para la regulación individual e independiente de la temperatura en uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales, preferiblemente en cada uno de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales.
- Al proporcionar compartimentos de placas de cultivo individuales y separados con su propio medio de regulación de la temperatura individual para la regulación individual de la temperatura, se garantiza que el entorno de un compartimento de placas de cultivo se pueda mantener en condiciones predeterminadas, independientemente del entorno de los otros compartimentos de placas de cultivo.
- 15 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho medio de regulación de la temperatura comprende independientemente un medio de calentamiento, tales como uno o más elementos de calentamiento eléctrico; y/o un medio de enfriamiento, tales como uno o más elementos Peltier.
- 20 En una realización del primer aspecto de la presente invención, el aparato comprende además un medio de regulación de la composición de gas para la regulación individual de la composición de gas, tal como la concentración de oxígeno, dióxido de carbono y/o nitrógeno en uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales, preferiblemente en cada uno de dichos compartimentos individuales de dichas placas de cultivo.
- En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato comprende medios para suministrar uno o más tipos de gases diferentes desde una fuente externa, tal como desde una bombona de gas.
- 25 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dichos medios son válvulas para regular el flujo de gas en el aparato.
- En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato comprende una caja de mezcla de gases para dicho uno o más gases.
- 30 Al proporcionar compartimentos de placas de cultivo individuales y separados con su propio medio de la regulación de la composición de gas individual para regular individualmente la composición del gas, se garantiza que el entorno de un compartimento de placas de cultivo se pueda mantener en condiciones predeterminadas, independientemente del entorno de los otros compartimentos de placas de cultivo.
- En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicha caja de mezcla de gases comprende un sensor de CO₂, tal como un sensor de CO₂ de NDIR; y un sensor de O₂, tal como un sensor de químico de grado médico O₂ y, además, comprende uno o más conductos para conducir un gas desde dicha caja de mezcla de gases hasta uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo separados.
- 35 Dichos sensores permiten supervisar el entorno que se suministrará a los compartimentos particulares de la placa de cultivo.
- 40 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dichos dos o más compartimentos de placas de cultivo comparten la misma caja de mezcla de gases; o, como alternativa, a cada compartimento de placa de cultivo se le asigna su propia caja de mezcla de gases individual.
- En una realización del primer aspecto de la presente invención, el aparato comprende medios para someter dicho uno o más gases o mezclas de gases a radiación UV, tal como radiación UV-C, dicho medio opcionalmente comprende un filtro para filtrar la radiación UV que podría conducir a la producción de ozono, tal como la radiación UV que tiene una longitud de onda de 175 a 195 nm, tal como la radiación UV que tiene una longitud de onda de 180 a 190 nm.
- 45 En una realización del primer aspecto de la presente invención, el aparato comprende además medios para filtrar el gas o la mezcla de gases, tales como un filtro HEPA y/o un filtro de carbono antes de entrar en el compartimento de placas de cultivo.
- 50 Dicho medio de radiación UV y/o medio de filtro permiten desinfectar el gas que se suministrará a los compartimentos de placas de cultivo.
- En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato con respecto a uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo comprende uno o más conductos para conducir gas desde dicho compartimento

de placa de cultivo hasta una caja de mezcla de gases.

5 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho compartimento de placa de cultivo individual con respecto a uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individual, preferiblemente con respecto a cada compartimento de placas de cultivo individual, comprende un estante transparente para transportar una placa de cultivo; y en donde dicho dispositivo de captación de imágenes y dicha unidad FLIM, o al menos partes de la misma que transmiten y reciben radiación electromagnética, está/están dispuesto/s debajo de dichos estantes y está/n adaptado/s para poder moverse de modo que pueda/n transmitir y/o captar radiación electromagnética, a través de dichos estantes, hacia/desde dicho material biológico alojado en cualquiera de dicha placa de cultivo que está alojada en cualquiera de dichos compartimentos de la placa de cultivo.

10 De ese modo, se logra que la unidad FLIM o al menos una parte de transmisión de luz y una parte de recepción de luz pueda disponerse debajo de la(s) placa(s) de cultivo, por lo que una unidad FLIM puede captar imágenes asociadas a placas de cultivo alojadas en diferentes compartimentos de placas de cultivo.

15 En una realización del primer aspecto de la presente invención, el compartimento de placas de cultivo individual, con respecto a uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales, preferiblemente con respecto a cada compartimento de placas de cultivo individual, comprende independientemente uno o más de los siguientes: un sensor de pH, un sensor de temperatura, un sensor de oxígeno, un sensor de dióxido de carbono.

Dichos sensores permiten supervisar el entorno en el compartimento de placas de cultivo particular.

20 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicha unidad de control para controlar el funcionamiento de dicho aparato está configurada para controlar independientemente uno o más de los siguientes: dicho medio de regulación de la temperatura con respecto a uno o más de los compartimentos de placas de cultivo; dicho medio de regulación de la composición del gas con respecto a uno o más de los compartimentos de placas de cultivo; dicho dispositivo de captación de imágenes; o dicha unidad FLIM.

25 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicha unidad de control está configurada para permitir que un usuario introduzca protocolos de funcionamiento predeterminados para que dicho aparato los siga; y en donde dicha unidad de control está configurada para controlar dicho aparato según dicho(s) protocolo(s).

De ese modo, se logra que el aparato pueda operarse de forma totalmente automática según protocolos predeterminados.

30 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato comprende un medio de entrada, tales como un teclado alfanumérico, para permitir que un usuario programe y seleccione uno o más protocolos de funcionamiento para que dicho aparato los siga; y/o para permitir que un usuario programe protocolos específicos para que dicho aparato los siga.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato comprende una pantalla para mostrar a un operador detalles relacionados con el estado y la progresión del funcionamiento del aparato.

Dicho medio de visualización permite que un operador controle y supervise el funcionamiento del aparato.

35 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato comprende además una unidad de procesamiento de imágenes para procesar imágenes captadas mediante dicho dispositivo de captación de imágenes; y/o que comprende además una unidad de procesamiento de datos espectrales para procesar información relacionada con la radiación electromagnética captada por dicha unidad FLIM.

40 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicha unidad de procesamiento de imágenes está configurada para proporcionar, a partir de las imágenes captadas por dicho dispositivo de captación de imágenes, series de imágenes en tiempo real de uno o más materiales biológicos específicos de los materiales biológicos que se están incubando.

45 Las imágenes en tiempo real permiten supervisar el desarrollo de un material biológico viable particular con el fin de evaluar la calidad de dicho material con el fin de seleccionar un material biológico particular para etapas de procesamiento adicionales.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicha unidad de procesamiento de datos espectrales está configurada para poder realizar un análisis de las diferencias entre dos espectros identificados captados por dicha unidad FLIM.

50 De ese modo, se logra que se pueda obtener una evaluación objetiva de la calidad de un estado metabólico de un material biológico.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho detector sensible a un solo fotón se acopla independientemente a medios ópticos para transportar radiación electromagnética, tal como una o más fibras ópticas, comprendiendo dichos medios ópticos un extremo distal que está configurado para dirigirse al material biológico, para

transportar por recepción radiación electromagnética.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicha unidad FLIM está configurada para autofluorescencia de nicotinamida adenina (NADH) y/o para autofluorescencia de flavín adenín dinucleótido (FAD) que están implicados en el metabolismo del material biológico.

- 5 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato está configurado para funcionar en un modo de recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo (TCSPC).

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato está configurado para funcionar en un modo FRET o en un modo FRAP o en un modo PLIM (microscopía de tiempo de vida de imágenes fosforescentes).

- 10 En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho láser funciona en el intervalo de longitud de onda de 350 - 800 nm, tal como 400 - 750 nm, por ejemplo, 450 - 700 nm, p. ej., 500 - 650 nm, tal como 550 - 600 nm.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho láser está funcionando en anchos de pulso de 30 - 100, tal como 40 - 90, p. ej., 50 - 80, tal como 60 - 70 picosegundos (ps).

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato durante las operaciones de fluorescencia está configurado para operar en el dominio de tiempo o en el dominio de frecuencia.

- 15 Dichos modos de funcionamiento e intervalos de parámetros han demostrado ser ventajoso para el estudio previsto del material biológico.

En una realización del primer aspecto de la presente invención, dicho aparato está configurado para incubar dos o más materiales biológicos en forma de ovocitos o embriones; en donde dicho aparato con respecto a cada específico de dichos dos o más materiales biológicos está configurado, en función de imágenes captadas mediante dicho dispositivo de captación de imágenes, para identificar un estado morfológico predeterminado de dicho material biológico específico; y en donde dicho aparato está configurado, en el caso de que se haya alcanzado un estado morfológico predeterminado con respecto a un material biológico específico, para captar un espectro FLIM de dicho material biológico específico.

- 20 De ese modo, se logra que el estado metabólico y la calidad de dos o más ovocitos o embriones se puedan comparar en el mismo estado morfológico.

En una realización de esta realización, dicho aparato está configurado, con respecto a cada específico de dichos dos o más materiales biológicos, para identificar dos o más estados morfológicos diferentes y predeterminados, en función de dichas imágenes captadas mediante dicho dispositivo de captación de imágenes, de ese material biológico específico, y en donde en el caso de que se haya alcanzado un estado morfológico diferente y predeterminado con respecto a un material biológico específico, dicho aparato está configurado para captar un espectro FLIM de dicho material biológico específico con respecto a cada estado morfológico predeterminado de este tipo.

- 30 De ese modo, se logra que el desarrollo o cambio en el estado metabólico y la calidad de dos o más ovocitos o embriones se puedan comparar en la transición de uno a otro estado morfológico.

En una realización de esta realización, dicho aparato con respecto a cada uno de dichos dos o más materiales biológicos está configurado para analizar diferencias de los espectros FLIM correspondientes a dos o más estados morfológicos diferentes del mismo material biológico.

- 35 Dicho análisis puede realizarse automáticamente mediante dicho aparato o puede realizarse manualmente en el sentido de que el aparato está capacitado para realizar dicho análisis.

En una realización de esta realización, dicho aparato está configurado para identificar ese material biológico específico que exhibe la menor diferencia en los espectros FLIM que pertenecen a dos estados morfológicos diferentes y específicos, como el material biológico más estable; y, por consiguiente, el mejor candidato para la implantación en el útero de una mujer.

- 40 Se ha descubierto que los ovocitos o embriones que exhiben el menor cambio, en términos de la apariencia de un espectro FLIM, cuando transitan de un estado morfológico al siguiente, son propensos a provocar los embarazos más satisfactorios cuando se implantan en el útero de una mujer.

En una realización de estas realizaciones, dicho estado/estados morfológico/s se selecciona/n del grupo que comprende eventos asociados a lo siguiente: t0 (tiempo de inseminación), tPB2 (tiempo desde la inseminación hasta la aparición del segundo cuerpo polar); tPNa (tiempo desde la inseminación hasta la aparición de pronúcleos); tPNf (tiempo desde la inseminación hasta el desvanecimiento del pronúcleo); t2-t9 (tiempo desde la inseminación hasta las divisiones correspondientes (2 a 9)); tM (tiempo desde la inseminación hasta la fase de compactación de la mórula); t5B (tiempo desde la inseminación hasta el inicio de la blastulación); tB (tiempo desde la inseminación hasta la formación del blastocisto completo); tEB (tiempo desde la inseminación hasta el blastocisto expandido); tHB (tiempo desde la inseminación hasta el blastocisto eclosionado); cc1 (primera ronda de segmentación); cc2 (segunda ronda

- 50

de segmentación); cc3 (tercera ronda de segmentación); cc4 (cuarta ronda de segmentación); s1 (primer parámetro de sincronización); s2 (segundo parámetro de sincronización); s3 (tercer parámetro de sincronización); t2_int (fase después de la primera división); t4_int (fase después de la segunda división); t8_int (fase después de la tercera división).

- 5 Estos eventos son eventos que son fácilmente reconocibles por un dispositivo de captación de imágenes y que representan transiciones bien definidas en el desarrollo de un ovocito o un embrión.

En su segundo aspecto, la presente invención se refiere a un sistema para la incubación de un material biológico viable;

dicho sistema comprende:

- 10 -un aparato según el primer aspecto de la presente invención en combinación con
-una o más placas de cultivo.

En una realización del segundo aspecto de la presente invención, dichas una o más placas de cultivo comprenden un material que comprende varios pocillos de cultivo.

- 15 En una realización del segundo aspecto de la presente invención, dicho número de pocillos de cultivo es 2 - 21, tal como 3 - 20, por ejemplo, 4 - 19, tal como 5 - 18, por ejemplo, 6 - 17, tal como 7 - 16, p. ej., 8 - 15, por ejemplo, 9 - 14, tal como 10 - 13 u 11 - 12.

Dicha cantidad de pocillos de cultivo permite en una situación de investigación llevar a cabo una serie de protocolos paralelos en donde cada protocolo difiere solo en un parámetro de un pocillo de cultivo a otro. De ese modo, se puede determinar la optimización de los protocolos para la incubación de un tipo específico de material biológico viable.

- 20 En su tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un aparato según el primer aspecto de la presente invención o de un sistema según el segundo aspecto de la presente invención para la incubación de un material biológico viable; con la condición de que dicho uso no se relacione con el uso comercial industrial y/o destructivo de un embrión humano.

En una realización del tercer aspecto de la presente invención, el material biológico es un ovocito o un embrión.

- 25 En una realización del tercer aspecto de la presente invención, el uso es con el propósito adicional de evaluar la calidad de un estado metabólico de dicho material biológico viable.

En una realización del tercer aspecto de la presente invención, el uso tiene el propósito adicional de determinar empíricamente protocolos óptimos relacionados con las condiciones físicas y/o químicas de un material biológico durante la incubación del mismo.

- 30 En su cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para evaluar las condiciones óptimas de incubación para un material biológico viable, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

i) proporcionar un aparato según el primer aspecto de la presente invención o proporcionar un sistema según el primer aspecto de la presente invención;

- 35 ii) alojar al menos dos placas de cultivo, comprendiendo cada una de las cuales uno o más materiales biológicos viables en compartimentos separados para placas de cultivo de dicho aparato;

iii) incubar dichos materiales biológicos en condiciones de incubación, en donde las condiciones de incubación físicas y/o químicas con respecto al material biológico que se aloja en un compartimento de placa de cultivo difieren en uno o más parámetros de las condiciones de incubación físicas y/o químicas con respecto al material biológico que se aloja en otro compartimento de placas de cultivo;

- 40 iv) durante la etapa iii), usar la unidad FLIM de dicho aparato para captar espectros FLIM;

v) evaluar la calidad del material biológico en función de dichos espectros FLIM; con la condición de que dicho método no implique el uso comercial industrial y/o destructivo de un embrión humano.

En una realización del cuarto aspecto, los espectros FLIM que se captan en la etapa iv) se captan en fases morfológicas predeterminadas y similares con respecto a cada material biológico mencionado.

- 45 De ese modo, es posible comparar el estado metabólico de diferentes materiales biológicos que han alcanzado la misma fase morfológica.

En una realización de esta realización, dicha(s) fase(s) morfológica(s) predeterminada(s) se determina(n) a partir de imágenes captadas mediante dicho dispositivo de captación de imágenes.

En una realización del cuarto aspecto de la presente invención, se repiten las etapas ii) - v), en donde al menos un conjunto de condiciones de incubación físicas y/o químicas con respecto al material biológico que se aloja en una placa de cultivo está siendo alterado.

5 En una realización del cuarto aspecto de la presente invención, se determinan las condiciones de incubación físicas y/o químicas más óptimas, en función de dichos espectros FLIM.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un método para seleccionar un material biológico específico que tenga la más alta calidad, entre una serie de materiales biológicos, en donde dicho método comprende:

a) proporcionar un aparato según el primer aspecto de la presente invención;

b) incubar dicha serie de materiales biológicos en dicho aparato;

10 c) con respecto a cada específico de dicha serie de materiales biológicos, usar dicho dispositivo de captación de imágenes para identificar un estado morfológico predeterminado de dicho material biológico específico;

d) en el caso de que se haya alcanzado un estado morfológico predeterminado con respecto a un material biológico específico, usar dicha unidad FLIM para captar un espectro FLIM de dicho material biológico específico;

15 e) comparar los espectros FLIM obtenidos con respecto a dicha serie de materiales biológicos y asociados con el mismo estado morfológico de ese material;

f) en función de la comparación realizada en la etapa e) seleccionar ese material biológico específico que tiene la más alta calidad, en función de uno o más criterios predeterminados;

con la condición de que la selección realizada en la etapa f) no se relacione con la selección de un embrión humano.

20 De ese modo, se logra que el estado metabólico y la calidad de dos o más materiales biológicos, tales como los ovocitos o los embriones se puedan comparar en el mismo estado morfológico y, en función de la aparición de los espectros FLIM, se puede seleccionar el material biológico que tenga la más alta calidad.

25 En una realización del quinto aspecto de la presente invención, dicho dispositivo de captación de imágenes se usa en la etapa c) para identificar dos o más estados morfológicos predeterminados y diferentes; y en donde en la etapa d), y con respecto a cada material biológico específico, dicha unidad FLIM se usa para captar un espectro FLIM de dicho material biológico específico en cada uno de los dos o más estados morfológicos diferentes y predeterminados.

De ese modo, se logra que el desarrollo o cambio en el estado metabólico y la calidad de dos o más ovocitos o embriones se puedan comparar en la transición de uno a otro estado morfológico.

30 En una realización del quinto aspecto de la presente invención, y con respecto a cada uno de dichos materiales biológicos de dicha serie de materiales biológicos, se analizan las diferencias de los espectros FLIM correspondientes a dos estados morfológicos diferentes del mismo material biológico.

Con respecto a diferentes materiales biológicos, el análisis de los espectros FLIM correspondientes a dos estados morfológicos diferentes de ese material biológico específico permite evaluar la estabilidad del metabolismo de un material biológico en comparación con la estabilidad del metabolismo de otro material biológico.

35 En una realización del quinto aspecto de la presente invención, dicho método comprende además la etapa de identificar ese material biológico específico que exhibe la menor diferencia en los espectros FLIM que pertenecen a dos estados morfológicos diferentes y específicos, como el material biológico más estable; y, por consiguiente, el mejor candidato para la implantación en el útero de una mujer.

40 En una realización del quinto aspecto de la presente invención, uno o más de dichos estados morfológicos predeterminados se seleccionan del grupo que comprende eventos asociados a lo siguiente: t0 (tiempo de inseminación), tPB2 (tiempo desde la inseminación hasta la aparición del segundo cuerpo polar); tPNa (tiempo desde la inseminación hasta la aparición de pronúcleos); tPNf (tiempo desde la inseminación hasta el desvanecimiento del pronúcleo); t2-t9 (tiempo desde la inseminación hasta las divisiones correspondientes (2 a 9)); tM (tiempo desde la inseminación hasta la fase de compactación de la mórula); t5B (tiempo desde la inseminación hasta el inicio de la blastulación); tB (tiempo desde la inseminación hasta la formación del blastocisto completo); tEB (tiempo desde la inseminación hasta el blastocisto expandido); tHB (tiempo desde la inseminación hasta el blastocisto eclosionado); cc1 (primera ronda de segmentación); cc2 (segunda ronda de segmentación); cc3 (tercera ronda de segmentación); cc4 (cuarta ronda de segmentación); s1 (primer parámetro de sincronización); s2 (segundo parámetro de sincronización); s3 (tercer parámetro de sincronización); t2_int (fase después de la primera división); t4_int (fase después de la segunda división); t8_int (fase después de la tercera división).

50 Estos eventos son eventos que son fácilmente reconocibles por un dispositivo de captación de imágenes y que representan transiciones bien definidas en el desarrollo de un ovocito o un embrión. Con referencia ahora a los dibujos con el fin de ilustrar realizaciones preferidas de la presente invención, la figura 1 muestra en una vista en perspectiva

una realización de un dispositivo 200 según el primer aspecto de la presente invención. La figura 1 muestra el alojamiento 2 del dispositivo 200. En la realización mostrada en la figura 1 el dispositivo comprende seis compartimentos para placas de cultivo separados 6, teniendo cada uno su propia tapa 14. El alojamiento se extiende en una dirección longitudinal X y en una dirección transversal Y y en una dirección Z perpendicular a la dirección longitudinal y la dirección transversal. Los seis compartimentos de placas de cultivo separados 6 están alineados a lo largo de la dirección X.

La figura 2 muestra esquemáticamente un dispositivo 200 según el primer aspecto de la presente invención. La figura 2 ilustra que el alojamiento 4 del dispositivo 200 comprende seis compartimentos para placas de cultivo separados 6, estando cada compartimento de placas de cultivo separado del compartimento 6 de placas de cultivo adyacente por unas paredes de compartimento. En la figura 2 se muestra que una placa de cultivo 8 está alojada en cada compartimento de placa de cultivo 6. La placa de cultivo 8 descansa sobre un estante 34 que en la figura 2 es simplemente la parte inferior del compartimento de placas de cultivo. Al menos parte de la parte inferior de los compartimentos de placas de cultivo es transparente, lo que permite, de este modo, que el dispositivo de captación de imágenes 10 y la unidad FLIM 11 (o las partes ópticas de la misma) transmitan y capten radiación electromagnética hacia/desde un material biológico 2 alojado en uno o más pocillos de las placas de cultivo 8 desde un área debajo de los compartimentos de placas de cultivo 6. En la figura 2 la parte inferior transparente de los compartimentos de placas de cultivo tiene forma de estantes transparentes 24.

El dispositivo de captación de imágenes 10 y la unidad FLIM 11 (o partes de la misma), están unidos a un medio de movimiento 38 para mover el dispositivo de captación de imágenes y la unidad FLIM (o partes de la misma), lo que permite de ese modo que el dispositivo de captación de imágenes y la unidad FLIM se muevan a lo largo de la dirección longitudinal X con el fin de captar imágenes de material biológico que se cultiva en los pocillos de cultivo de una o más placas de cultivo dispuestas en uno o más compartimentos de placas de cultivo y también con el fin de captar espectros FLIM de dicho material biológico.

El dispositivo de captación de imágenes 10 y la unidad FLIM 11 (o partes de la misma) en un caso general también pueden estar configurados para moverse a lo largo de la dirección transversal Y y la dirección Z, estando en perpendicular a la dirección X y a la dirección Y.

Por motivos de simplicidad, en la figura 2 y también en la figura 3, el dispositivo de captación de imágenes 10 y la unidad FLIM 11 están delineados conjuntamente como elementos 10, 11 dispuestos en un conjunto común de medios de movimiento 38.

Sin embargo, el dispositivo de captación de imágenes 10 y la unidad FLIM 11 pueden estar provistos de su propio conjunto individual de medios de movimiento 38.

En la figura 2 se ve que cada compartimento de placa de cultivo tiene su propia tapa dedicada 14 que permite la introducción, retirada e inspección de una placa de cultivo alojada en un compartimento específico sin imponer ningún efecto adverso, tal como alterar la composición de la atmósfera o alterar la temperatura de la atmósfera de cualquiera de los otros compartimentos de placas de cultivo 6. Además, de esta forma, no habrá ningún riesgo de contaminación del contenido de las placas de cultivo 8 en ningún otro compartimento distinto al específico sometido a inspección.

En la mayoría de los casos, será ventajoso proporcionar al dispositivo 200 medios para proporcionar una atmósfera de gas deseada en cada compartimento de placa de cultivo. Asimismo, en la mayoría de los casos, será deseable proporcionar al dispositivo 200 medios de calentamiento y sensores de temperatura para regular la temperatura en los compartimentos de cada placa de cultivo.

Preferiblemente, el dispositivo 200 también estará provisto de medios de control para controlar dichos parámetros. Esto se detalla a continuación.

La figura 3 ilustra esquemáticamente detalles de dicho sistema de control para el dispositivo 200 según el primer aspecto de la presente invención. La figura 3 muestra el dispositivo 200 que comprende el alojamiento 4. El alojamiento comprende dos o más compartimentos de placas de cultivo separados (solo se muestra un compartimento de placa de cultivo en la figura 3 por motivos de simplicidad). El compartimento de placas de cultivo está provisto de gas. El gas fluye desde una caja de mezcla de gases 40 en un conducto 42 a través de un medio de filtro 44 para gas y hacia el interior del compartimento de placas de cultivo 6.

En la figura 3 diversas partes del sistema de control y la caja de mezcla de gases están indicadas para situarse fuera del alojamiento del dispositivo. Este diseño puede ser posible. Sin embargo, también puede ser deseable disponer dicha parte dentro del alojamiento del dispositivo. La caja de mezcla de gases comprende entradas 44, 46 para gas. Los gases que se van a suministrar pueden ser preferiblemente CO₂ y N₂, tal y como se muestra en la figura 3. La magnitud del flujo de los gases suministrados a la caja de mezcla de gases puede regularse mediante las válvulas 48, 50. Se pueden proporcionar medios 52 para emitir radiación electromagnética en el intervalo de longitud de onda UV con fines de desinfección de gas.

El dispositivo puede estar provisto de una unidad de control 12 para controlar varios parámetros del funcionamiento del dispositivo. Dicha unidad de control se muestra en la figura 3. La unidad de control 12 está acoplada al medio de

entrada 32, tal como un teclado alfanumérico o un dispositivo de puntero que permita al usuario introducir datos relacionados con un modo de funcionamiento deseado. Asimismo, la unidad de control puede estar acoplada a un medio de visualización 34 que permite a un usuario supervisar diversas configuraciones del funcionamiento del dispositivo.

5 En la figura 3 también se muestran un sensor de CO₂ 58 y un sensor de O₂ 60. Los sensores pueden estar acoplados a la unidad de control 12 a través de los alambres 62, 64 y la unidad de control puede estar acoplada a las válvulas 48, 50 para regular la entrada de gas. De esta forma, será posible mantener una atmósfera bastante constante de una mezcla de gases deseada en cada compartimento de placa de cultivo 4.

10 Cada compartimento de placas de cultivo puede conectarse a su propia caja de mezcla de gases dedicada; o, como alternativa, dos o más compartimentos de placas de cultivo pueden compartir la misma caja de mezcla de gases.

15 Normalmente, no será deseable proporcionar contenido de oxígeno en el interior de los compartimentos de la placa de cultivo por encima del nivel normal de oxígeno en el aire atmosférico. Por esta razón, el nivel de oxígeno se puede regular suministrando cantidades variables de CO₂ y N₂. A su vez, el nivel de CO₂ puede regularse por "dilución" con N₂. Desde el interior del compartimento de placas de cultivo se proporciona un conducto 66 para volver a poner en circulación el gas desde el interior del compartimento de vuelta a la caja de mezcla de gases.

20 El compartimento de placas de cultivo puede estar equipado con un sensor de temperatura 68 y un medio de calentamiento 18 y/o un medio de enfriamiento 20. El sensor de temperatura 68 y el medio de calentamiento 18 y el medio de enfriamiento 20 están acoplados a través de alambres 74, 74', 74" a la unidad de control 12 de modo que se pueda proporcionar retroalimentación al medio de calentamiento 18 y al medio de enfriamiento 20 desde la unidad de control 12, en función de lecturas del sensor de temperatura 68.

El dispositivo de captación de imágenes 10 y la unidad FLIM, o al menos partes de la misma, tales como sus partes de transmisión y recepción pueden moverse, al menos a lo largo de la dirección longitudinal X debajo de la serie de compartimentos para placas de cultivo. Este movimiento se produce por un medio de movimiento 38, que están controlados por la unidad de control 12 a través del alambre 76.

25 La información relacionada con el envío y/o la recepción de información relacionada con el funcionamiento del dispositivo de captación de imágenes 10 se transmite a través del cable 78.

30 La figura 4 muestra una configuración simple para mediciones de tiempo de vida de fluorescencia con TCSPC. Un diodo láser de picosegundos 100 está funcionando en su reloj interno. La caja del accionador 102 está físicamente separada del cabezal láser real que está conectado a través de un cable flexible. Esto permite colocar convenientemente el pequeño cabezal láser en cualquier lugar de la configuración óptica.

35 Los pulsos de luz de típicamente una anchura de media altura de 50 ps se dirigen a la muestra de material biológico 2 que se aloja en una cubeta. Los pulsos de luz se dirigen preferiblemente al material biológico usando ópticas apropiadas. Se usa un filtro de densidad neutra 104 para atenuar los niveles de luz para mantener estadísticas de un solo fotón en el detector. Tras la excitación, el material biológico fluorescente o muestra emitirá luz a una longitud de onda más larga que la de la luz de excitación. La luz de fluorescencia se filtra contra la luz de excitación dispersada por medio de un filtro óptico de corte 106.

40 Posteriormente, la luz de fluorescencia se dirige hacia el fotón, a través de una óptica de recogida apropiada, p. ej., un objetivo de microscopio o solo una lente. Para precisiones de sincronización de una anchura de media altura de 200 ps, es suficiente un tubo fotomultiplicador 108 no costoso. La señal eléctrica obtenida a partir del detector, p. ej., un pequeño pulso negativo de -20 mV, se alimenta a un preamplificador y luego a la electrónica del TCSPC 110 a través de un cable coaxial estándar de 50 ohmios.

El accionador láser también proporciona la señal de sincronización eléctrica 112 necesaria para la medición del tiempo de llegada de fotones. Esta señal (norma NIM, un pulso estrecho de -800 mV) se alimenta a la electrónica de TCSPC a través de un cable coaxial estándar de 50 ohmios.

45 La figura 5 muestra los histogramas de TCSPC obtenidos con la configuración, incluida la electrónica TCSPC ilustrada en la figura 4. La fuente de excitación fue un PDL 800-B con un cabezal láser de 470 nm que funciona a una velocidad de repetición de 10 MHz. Se utilizó un PDM SPAD de MPD para la detección. El pico estrecho más alto del lado izquierdo representa la función de respuesta del instrumento (IRF) del sistema, dominado aquí por un láser y detector. La otra curva corresponde a la disminución de fluorescencia de una solución de Atto 488 en agua.

50 Atto 488 es un tinte fluorescente con un tiempo de vida de fluorescencia bastante corto (~ 3,8 ns). La velocidad de recuento se ajustó a < 1 % de la velocidad del láser para evitar la acumulación. La gráfica en escala logarítmica muestra la naturaleza exponencial perfecta de la curva de descomposición, como cabría esperar.

55 La figura 6 ilustra una realización de parte de la unidad FLIM que se utilizará con el aparato según la presente invención. La figura 6 muestra que el diodo láser 100 está transportando su radiación electromagnética a través de cables ópticos 128 y conectores de cable óptico 126 al material biológico 2 que se va a examinar. De manera similar,

la señal fluorescente emitida por la muestra se transporta a través de los cables ópticos 128 y el conector del cable óptico 126 al detector 108.

5 Como los aparatos según el primer aspecto comprenden un dispositivo de captación de imágenes, así como una unidad FLIM, es posible supervisar uno o más materiales biológicos viables, tales como ovocitos o embriones y comparar el estado metabólico de uno o más materiales biológicos, según lo determinado por medio de un espectro FLIM, en fases de desarrollo que son comparables de un material biológico a otro, según lo determinado por el aspecto morfológico específico que se revela mediante el uso del dispositivo de captación de imágenes.

10 Por consiguiente, en el aparato del primer aspecto de la presente invención, el dispositivo de captación de imágenes se utiliza para determinar una fase morfológica específica de interés del material biológico (como el número de divisiones celulares). La unidad FLIM, por otro lado, se utiliza para revelar fases metabólicas de los materiales biológicos.

De ese modo, las fases metabólicas y las cualidades de diversos materiales biológicos se pueden comparar en fases morfológicas que son comparables.

15 En función de esto, se puede realizar una evaluación objetiva de la calidad de un material biológico incubado, en comparación con otro material biológico incubado biológico, con referencia a la misma fase morfológica del material biológico (que puede variar en términos del período de tiempo).

Dicha evaluación objetiva es de un valor extremadamente alto, no al menos con el objetivo de seleccionar ovocitos o embriones viables para su implantación en el útero de una mujer.

20 A pesar de que la presente invención se ha descrito principalmente con referencia a la tecnología de fecundación humana, resulta obvio que la presente invención en sus diversos aspectos también es aplicable en muchos otros campos de la tecnología, incluyendo ciencias veterinarias, incluyendo tecnología de fecundidad dentro de la ciencia veterinaria.

25 Debe entenderse que todas las características y logros tratados anteriormente y en las reivindicaciones adjuntas en relación con un aspecto de la presente invención y realizaciones de la misma se aplican igualmente bien a los otros aspectos de la presente invención y realizaciones de la misma.

Lista de números de referencia

2	Material biológico
4	Alojamiento del aparato
6	Compartimento de placas de cultivo
8	Placa de cultivo
10	Dispositivo de captación de imágenes
11	Unidad FLIM o partes de la misma
12	Unidad de control
14	Tapa del compartimento de placas de cultivo
16	Medio de regulación de la temperatura
18	Medio de calentamiento
20	Medio de enfriamiento
22	Medio de regulación de la composición del gas
24	Estante transparente
26	Sensor de pH
28	Sensor de oxígeno
30	Sensor de dióxido de carbono
32	Medio de entrada
34	Medio de visualización
36	Unidad de procesamiento de imágenes
38	Medio de movimiento
40	Caja de mezcla de gases
42	Conducto
44	Entrada para gas
46	Entrada para gas
48	Válvula
50	Válvula
52	Medio de radiación UV
58	Sensor de CO ₂
60	Sensor de O ₂
62	Alambre
64	Alambre
66	Conducto

68	Sensor de temperatura
74, 74', 74"	Alambres
76	Alambre
78	Cable
100	Diodo láser
102	Caja del accionador
104	Filtro de densidad neutra
106	Filtro de corte
108	Detector
110	Electrónica de TCSPC
112	Cable para transmitir señal de sincronización
120	Histograma
122	Pico del histograma
124	Curva de descomposición
126	Conector de fibra óptica
128	Cable óptico
200	Aparato
300	Sistema
X	Dirección longitudinal
Y	Dirección transversal
Z	Dirección perpendicular a una dirección longitudinal y transversal

REIVINDICACIONES

1. Un aparato (200) para la incubación de un material biológico viable (2);
dicho aparato comprende:
5 un alojamiento (4) que tiene una extensión en una dirección longitudinal X, en una dirección transversal Y, y en una dirección Z perpendicular a la dirección longitudinal y la dirección transversal; comprendiendo dicho alojamiento:
dos o más compartimentos de placas de cultivo (6), cada uno adaptado para alojar, una o más placas de cultivo (8) que comprenden un material biológico (2);
en donde dicho aparato comprende un dispositivo de captación de imágenes (10);
en donde dicho aparato comprende una unidad de control (12) para controlar su funcionamiento;
10 en donde al menos parte de dicho dispositivo de captación de imágenes está configurada para poder moverse en relación con los dos o más compartimentos de placas de cultivo (6), permitiendo de ese modo la captación de imágenes de uno o más de dichos materiales biológicos (2) alojados en dichas una o más placas de cultivo (8); y
en donde dicho aparato comprende una unidad FLIM (11) (microscopio de obtención de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia);
15 en donde al menos parte de dicha unidad FLIM (11) está configurada para poder moverse en relación con los dos o más compartimentos de placas de cultivo (6), permitiendo de ese modo la captación de espectros FLIM de uno o más de dichos materiales biológicos (2) alojados en dichas una o más placas de cultivo (8):
en donde dicha unidad FLIM comprende independientemente:
20 - una fuente láser, tal como una fuente láser pulsada, tal como un láser de diodo o un láser de excitación multifotón; y opcionalmente también uno o más de los siguientes elementos:
- un detector sensible a un solo fotón;
- un espejo dicróico (para la separación de la señal de fluorescencia de la luz de excitación);
- un objetivo (para enfocar la luz de excitación en la muestra y/o para recoger la señal de fluorescencia);
- un sistema de control para controlar dicha unidad FLIM;
25 en donde dicha fuente láser está acoplada a un medio óptico para transportar radiación electromagnética, tal como una o más fibras ópticas, comprendiendo dicho medio óptico un extremo distal configurado para dirigirse cerca del material biológico, para transportar por transmisión radiación electromagnética.
2. Un aparato (200) según la reivindicación 1, en donde uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales (6), preferiblemente todos los dichos compartimentos de placas de cultivo comprenden su propia tapa individual (14), en donde cada una de dichas tapas está configurada para poder cambiar entre una configuración abierta que proporciona acceso al compartimento de placas de cultivo correspondiente (6) y una configuración cerrada en la que el compartimento de placas de cultivo correspondiente se hermetiza con respecto al entorno.
3. Un aparato (200) según la reivindicación 1 o 2, que comprende además un medio de regulación de la temperatura (16) para la regulación individual e independiente de la temperatura en uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales (6), preferiblemente en cada uno de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales.
4. Un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además un medio de regulación de la composición del gas (22) para la regulación individual de la composición del gas, tal como la concentración de oxígeno, dióxido de carbono y/o nitrógeno en uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales (6), preferiblemente en cada uno de dichos compartimentos individuales de dichas placas de cultivo.
- 40 5. Un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde con respecto a uno o más de dichos compartimentos de placas de cultivo individuales (6), preferiblemente con respecto a cada compartimento de placas de cultivo individual, dicho compartimento de placas de cultivo individual comprende un estante transparente (24) para transportar una placa de cultivo; y en donde dicho dispositivo de captación de imágenes (10) y dicha unidad FLIM (11), o al menos las partes de la misma que transmiten y reciben radiación electromagnética, está/están
45 dispuesto/s debajo de dichos estantes y está/n adaptado/s para poder moverse de modo que pueda/n transmitir y/o captar radiación electromagnética, a través de dichos estantes (24), hacia/desde dicho material biológico (2) alojado en cualquiera de dicha placa de cultivo (8) alojada en cualquiera de dichos compartimentos de placas de cultivo (6).
6. Un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha unidad FLIM está configurada para autofluorescencia de nicotinamida adenina (NADH) y/o para autofluorescencia de flavín adenín

dinucleótido (FAD) que están implicados en el metabolismo del material biológico.

7. Un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho aparato está configurado para funcionar en un modo de recuento de fotones individuales correlacionado con el tiempo (TCSPC).

5 8. Un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho aparato está configurado para funcionar en un modo FRET o en un modo FRAP o en un modo PLIM (microscopía de imágenes de tiempo de vida de imágenes fosforescentes).

9. Un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho aparato durante las operaciones de fluorescencia está configurado para funcionar en el dominio de tiempo o en el dominio de frecuencia.

10 10. Un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho aparato está configurado para incubar dos o más materiales biológicos en forma de ovocitos o embriones; en donde dicho aparato con respecto a cada específico de dichos dos o más materiales biológicos está configurado, en función de imágenes captadas por dicho dispositivo de captación de imágenes (10), para identificar un estado morfológico predeterminado de dicho material biológico específico; y en donde dicho aparato está configurado, en el caso de que se haya alcanzado un estado morfológico predeterminado con respecto a un material biológico específico, para captar un espectro FLIM de dicho material biológico específico.

15

11. Un aparato (200) según la reivindicación 10, en donde dicho aparato está configurado, con respecto a cada específico de dichos dos o más materiales biológicos, para identificar dos o más estados morfológicos diferentes y predeterminados, en función de dichas imágenes captadas por dicho dispositivo de captación de imágenes (10), de ese material biológico específico, y en donde en el caso de que se haya alcanzado un estado morfológico diferente y predeterminado con respecto a un material biológico específico, dicho aparato está configurado para captar un espectro FLIM de dicho material biológico específico con respecto a cada estado morfológico predeterminado de este tipo.

20

12. Un aparato (200) según la reivindicación 11, en donde dicho aparato con respecto a cada uno de dichos dos o más materiales biológicos está configurado para analizar diferencias de los espectros FLIM correspondientes a dos o más estados morfológicos diferentes del mismo material biológico.

25

13. Un sistema (300) para la incubación de un material biológico viable;

dicho sistema comprende:

-un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12, en combinación con

-una o más placas de cultivo (8).

30 14. Uso de un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12 o de un sistema (300) según la reivindicación 13 para la incubación de un material biológico viable (2); con la condición de que dicho uso no se relacione con el uso comercial industrial y/o destructivo de un embrión humano.

15. Uso según la reivindicación 14 con el propósito adicional de determinar empíricamente protocolos óptimos relacionados con las condiciones físicas y/o químicas de un material biológico (2) durante la incubación del mismo.

35 16. Un método para evaluar las condiciones óptimas de incubación de un material biológico viable, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

i) proporcionar un aparato (200) según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 12 o un sistema (300) según la reivindicación 13;

40 ii) alojar al menos dos placas de cultivo, comprendiendo cada una de las cuales uno o más materiales biológicos viables en compartimentos separados para placas de cultivo de dicho aparato;

iii) incubar dichos materiales biológicos en condiciones de incubación, en donde las condiciones de incubación físicas y/o químicas con respecto al material biológico que se aloja en un compartimento de placa de cultivo difieren en uno o más parámetros de las condiciones de incubación físicas y/o químicas con respecto al material biológico que se aloja en otro compartimento de placas de cultivo;

45 iv) durante la etapa iii), usar la unidad FLIM de dicho aparato para captar espectros FLIM;

v) evaluar la calidad del material biológico en función de dichos espectros FLIM;

con la condición de que dicho método no implique el uso comercial industrial y/o destructivo de un embrión humano.

17. Un método según la reivindicación 16, en donde se determinan las condiciones de incubación físicas y/o químicas más óptimas, en función de dichos espectros FLIM.

200

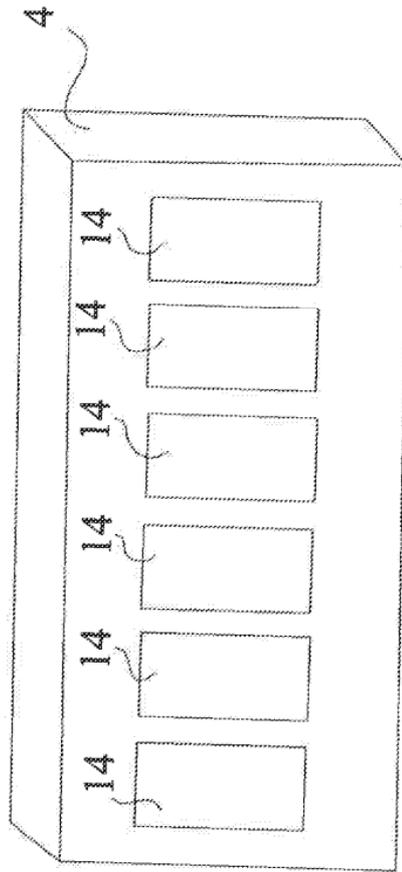
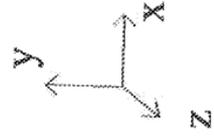


Fig. 1

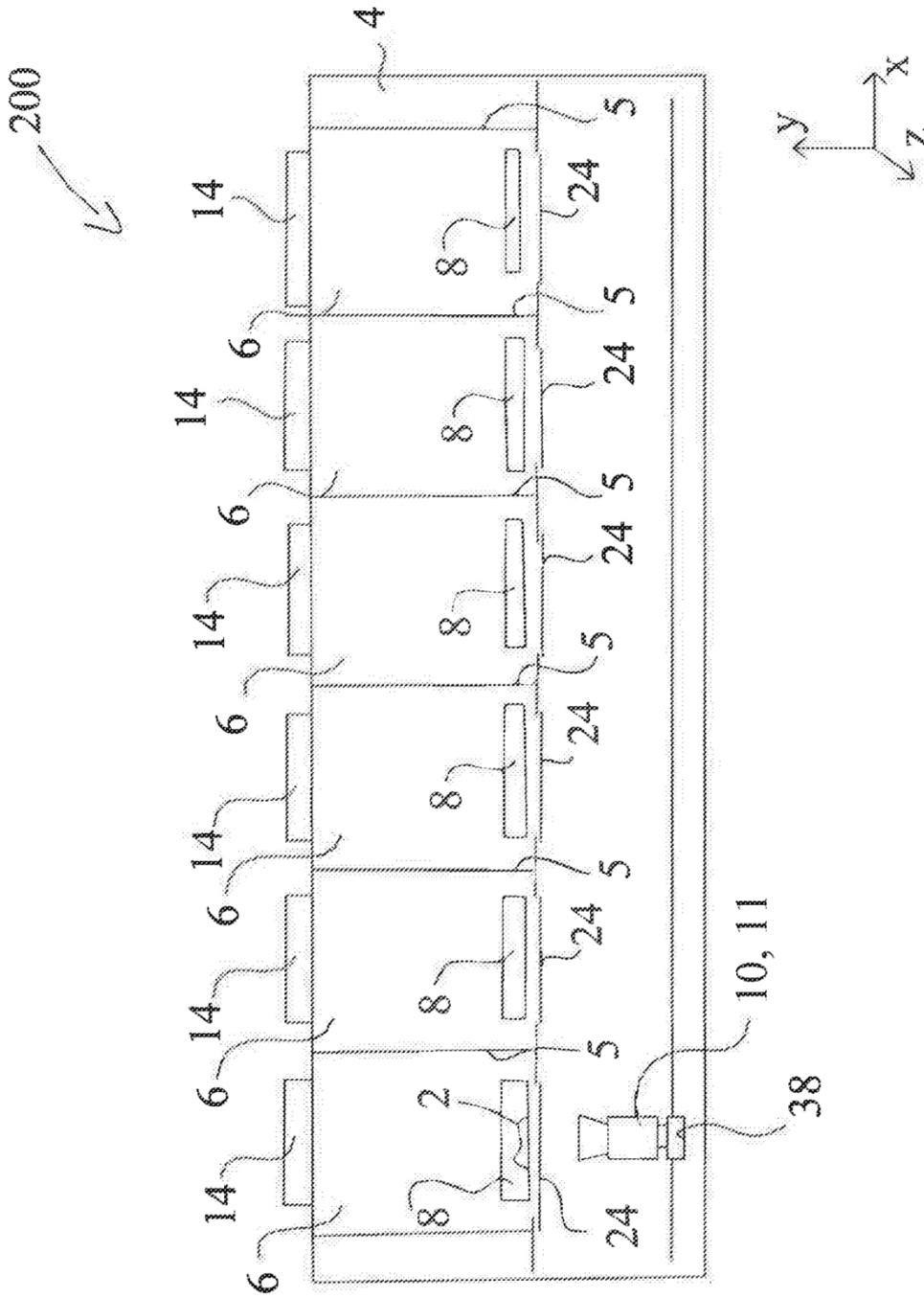


Fig. 2

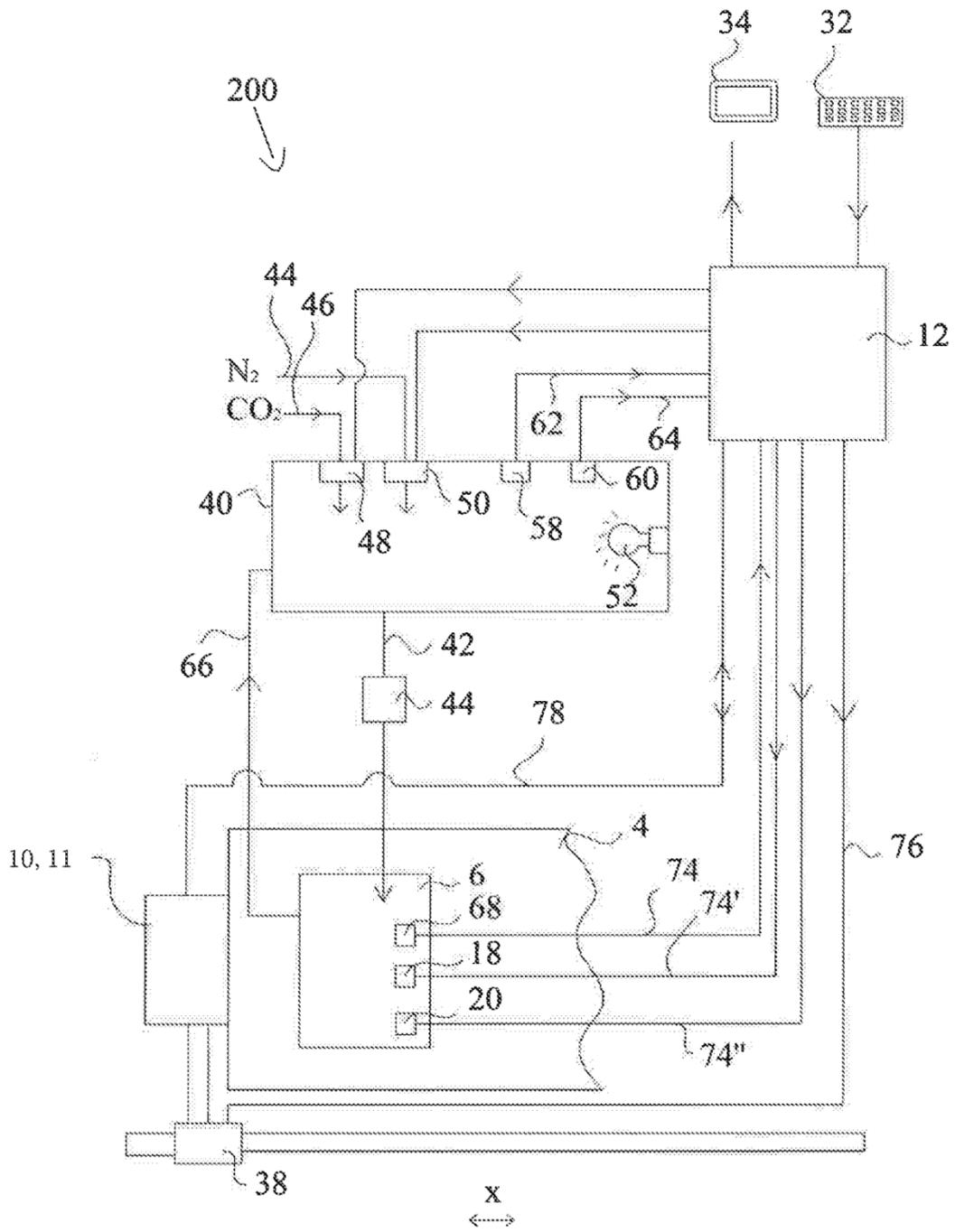


Fig. 3

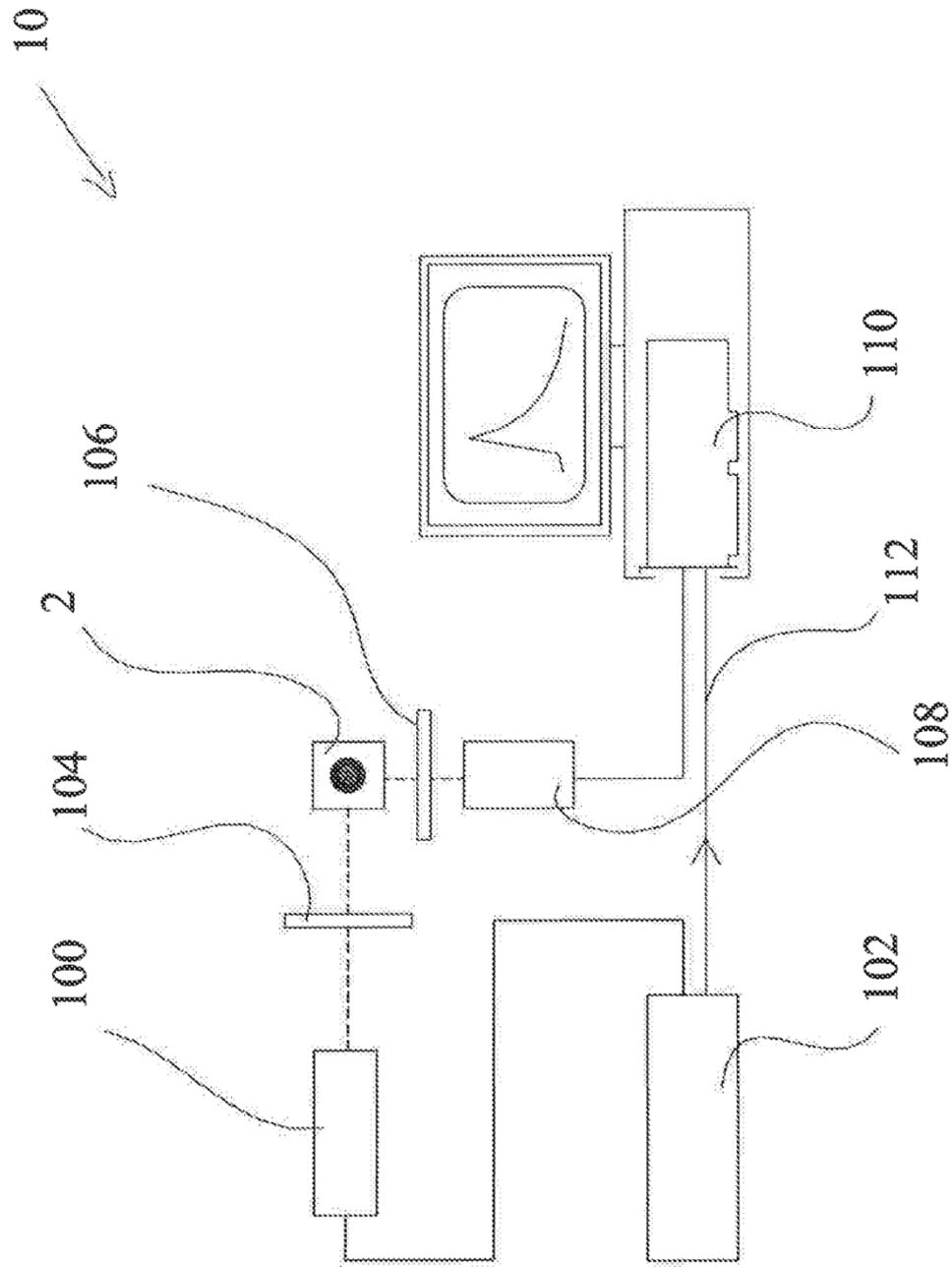


Fig. 4

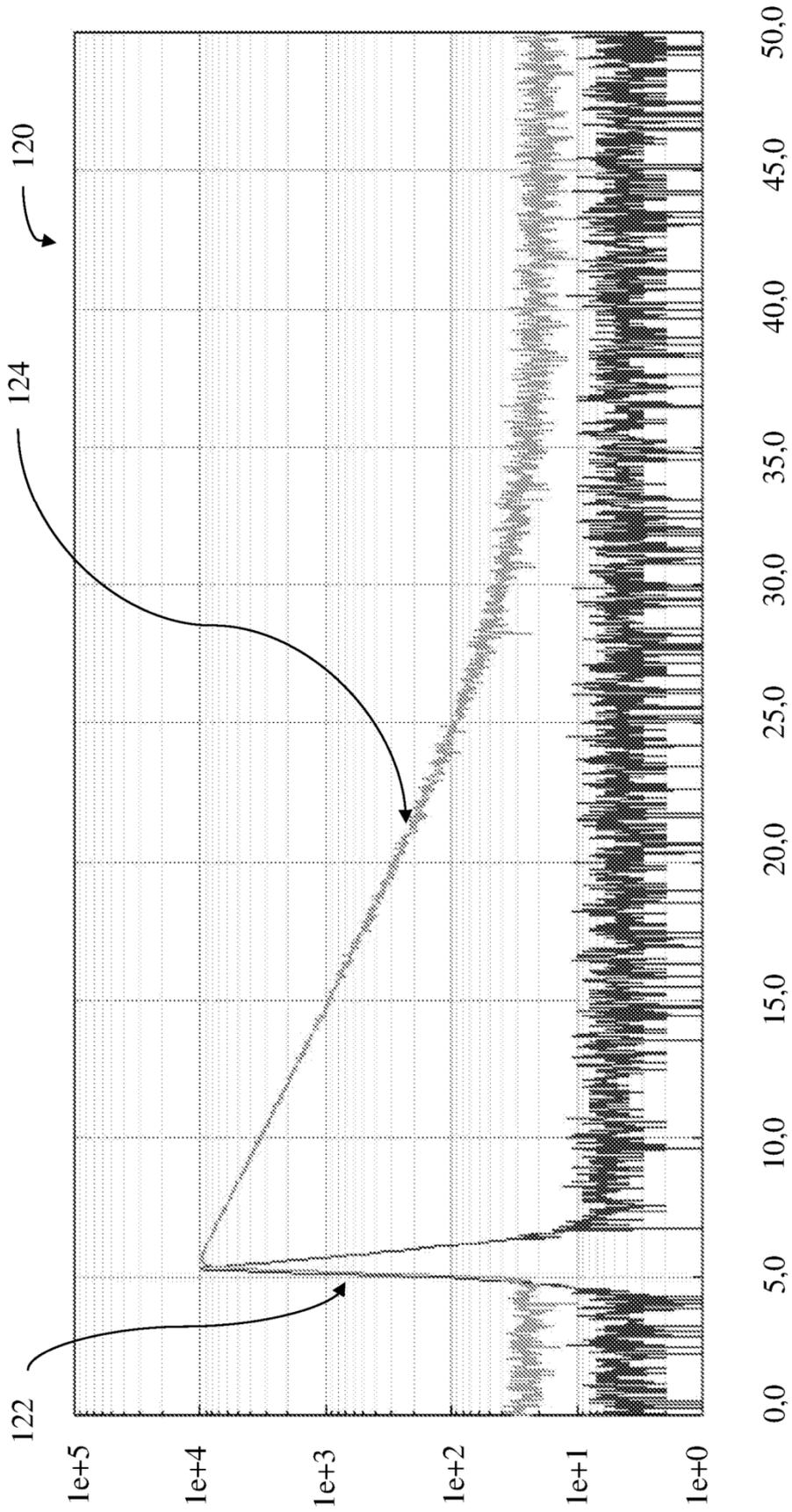


Fig. 5

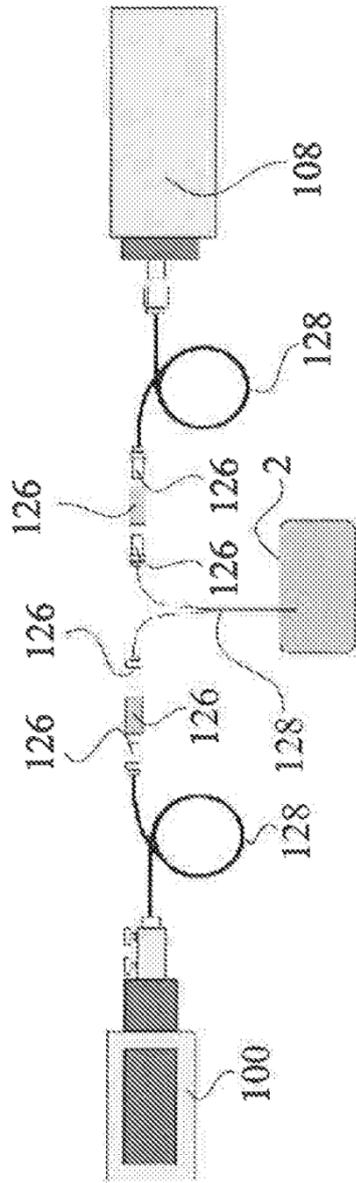


Fig. 6