РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2019 125 565** (13) **A**

(51) МПК
A61K 35/52 (2015.01)
A01N 1/02 (2006.01)
G01N 1/02 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: **2019125565, 19.01.2018**

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
20.01.2017 US 62/448,829;
10.11.2017 US 62/584,557

(43) Дата публикации заявки: **20.02.2021** Бюл. № **5**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **20.08.2019**

(86) Заявка PCT:
US 2018/014474 (19.01.2018)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2018/136772 (26.07.2018)

Адрес для переписки:
101000, ул. Мясницкая, д. 13, стр. 5, Москва, Россия, ООО "Союзпатент"

(71) Заявитель(и):
ИНГУРАН, ЛЛК (US)

(72) Автор(ы):
ГИЛЛИГАН, Томас Б. (US),
ГОНСАЛЕС-МАРЕН, Клара (US),
ВИШВАНАТХ, Рамакришнан (NZ)

(54) СПОСОБ ОБРАБОТКИ СПЕРМЫ, АППАРАТ И СВЯЗАННЫЕ КОМПОЗИЦИИ СРЕД

(57) Формула изобретения

1. Среда для окрашивания спермы, содержащая:
буфер;
ДНК-селективный краситель; и
криопротектор.

2. Среда для окрашивания спермы по п. 1, отличающаяся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт, низкомолекулярный амид или метиламид.

3. Среда для окрашивания спермы по п. 1, отличающаяся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт.

4. Среда для окрашивания спермы по п. 3, отличающаяся тем, что многоатомный спирт содержит сахарный спирт, выбранный из группы, состоящей из: этиленгликоля; глицерина; эритрита; треита; арабита; рибита; ксилита; сорбита; галактита; идита; волемита; фуцита; инозита; глицилглицита и их комбинаций.

5. Среда для окрашивания спермы по п. 3, отличающаяся тем, что многоатомный спирт содержит гликоль, выбранный из группы, состоящей из: пропиленгликоля, бутантриола и их комбинаций.

6. Среда для окрашивания спермы по п. 1, дополнительно содержащая антиоксидант, выбранный из группы, состоящей из: витамина B12; витамеров витамина B12; витамина E; витамеров витамина E; токоферола; токотриенола; α-токоферила; альфа-кетоглутарата; их производных и их комбинаций.

RU 2019125565 A

RU 2019125565 A

7. Среда для окрашивания спермы по п. 1, отличающаяся тем, что буфер содержит один или более компонентов, выбранных из группы, состоящей из: HEPES, бикарбоната натрия, BSA, яичного желтка, MOPS, TRIS, TES, TALP, TCA, PBS, молока, их производных и их комбинаций.

8. Среда для окрашивания спермы по п. 1, отличающаяся тем, что ДНК-селективный краситель содержит хехст 33342.

9. Среда для окрашивания спермы по п. 8, отличающаяся тем, что хехст 33342 присутствует в среде для окрашивания в концентрации: от примерно 10 мкМ до примерно 200 мкМ; от примерно 20 мкМ до примерно 100 мкМ: или от примерно 30 мкМ до примерно 70 мкМ.

10. Среда для окрашивания спермы по п. 1, отличающаяся тем, что среда для окрашивания спермы дополнительно содержит инкубированную среду для окрашивания спермы, инкубированную при температуре: от примерно 30°С до примерно 39°С; от примерно 32°С до примерно 37°С; или примерно 34°С.

11. Среда для окрашивания спермы по п. 1, отличающаяся тем, что среда для окрашивания содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 1%; от примерно 1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 3%; от примерно 3% до примерно 4%; от примерно 2% до примерно 4%; или от примерно 1,5% до примерно 3%.

12. Способ обработки спермы, включающий:

окрашивание образца спермы, содержащего жизнеспособную сперму, несущую X-хромосому, и жизнеспособную сперму, несущую Y-хромосому, средой для окрашивания;

приведение окрашенного образца спермы в контакт с проточной жидкостью в потоке; и

манипуляцию соотношением жизнеспособной спермы, несущей X-хромосому, к жизнеспособной сперме, несущей Y-хромосому, с образованием по меньшей мере одной подвергнутой манипуляции популяции спермы;

отличающийся тем, что одна или более из проточной жидкости и среды для окрашивания содержит криопротектор.

13. Способ по п. 12, дополнительно включающий стадию сбора подвергнутой манипуляции популяции спермы в среде для сбора.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что среда для сбора содержит некоторое количество криопротектора.

15. Способ по п. 12, отличающийся тем, что каждая из среды для окрашивания, проточной жидкости и среды для сбора включает некоторое количество криопротектора.

16. Способ по п. 12, отличающийся тем, что стадия манипуляции соотношения жизнеспособной спермы, несущей X-хромосому, к жизнеспособной сперме, несущей Y-хромосому, для получения по меньшей мере одной подвергнутой манипуляции популяции спермы дополнительно включает выбор спермы для разделения и сбора или фотоповреждения и сбора.

17. Способ по п. 12, дополнительно включающий стадию замораживания подвергнутого манипуляции образца спермы.

18. Способ по п. 12, дополнительно включающий одну или более из следующих стадий обработки: выдерживание; транспортирование; буферизация; охлаждение; нагревание; разбавление; концентрирование; возбуждение лазером; загрузка; отведение; абляция; сбор; встряхивание; осцилляция; магнитная сепарация; насыщение кислородом; маркировка; осаждение; центрифугирование; повторное суспендирование; перемешивание; диализ; криостабилизация; обработка посредством микрочипа; и проточная цитометрия.

19. Способ по п. 12, отличающийся тем, что стадия обработки и стадия приведения

RU 2019125565 A

RU 2019125565 A

окрашенного образца спермы в контакт с проточной жидкостью дополнительно включает:

впрыскивание окрашенного образца спермы в поток проточной жидкости;

подвергание окрашенного образца спермы в потоке проточной жидкости действию источника электромагнитного излучения, который вызывает детектируемый ответ ДНК-селективного красителя;

детектирование ответа ДНК-селективного красителя на воздействие электромагнитного излучения;

анализ детектируемого ответа;

классификация спермы в образце спермы на основе анализа детектируемого ответа; и

сбор одной или более жизнеспособных субпопуляций спермы из образца спермы в одну или более сред для сбора на основе классификации спермы.

20. Способ по п. 19, дополнительно включающий стадию электромагнитного изменения направления капель, содержащих сперму, на основании классификации.

21. Способ по п. 12, отличающийся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт, выбранный из группы, состоящей из: этиленгликоля; глицерина; эритрита; треита; арабита; рибита; ксилита; сорбита; галактита; идита; волемита; фуцита; инозита; глицилглицита и их комбинаций.

22. Способ по п. 12, отличающийся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт, выбранный из группы, состоящей из: пропиленгликоля, бутантриола и их комбинаций.

23. Способ по п. 12, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из проточной жидкости и среды для окрашивания дополнительно содержат антиоксидант.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что антиоксидант включает антиоксидант, выбранный из группы, состоящей из: пирувата, витамина B12; витамеров витамина B12; витамина E; витамеров витамина E; токоферола; токотриенола; α-токоферила; альфа-кетоглутарата; их производных и их комбинаций.

25. Способ по п. 12, отличающийся тем, что проточная жидкость содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 6%.

26. Способ по п. 12, отличающийся тем, что проточная жидкость содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 4%; от примерно 4% до примерно 6%; от примерно 1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 3%; от примерно 3% до примерно 4%; от примерно 4% до примерно 5%; от примерно 5% до примерно 6%; от примерно 2% до примерно 6%; или от примерно 3% до примерно 5%.

27. Способ по п. 12, отличающийся тем, что проточная жидкость содержит физиологический раствор, забуференный фосфатами, цитрат TRIS или HEPES.

28. Способ по п. 12, отличающийся тем, что криопротектор добавляют в среду для окрашивания в первом количестве и добавляют в проточную жидкость во втором количестве, и отличающийся тем, что второе количество составляет более первого количества.

29. Способ по п. 12, отличающийся тем, что среда для окрашивания содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 5%.

30. Способ по п. 12, отличающийся тем, что среда для окрашивания содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 1%; от примерно 1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 3%; от примерно 3% до примерно 4%; от примерно 2% до примерно 4%; или от примерно 1,5% до

RU 2019125565 A

RU 2019125565 A

примерно 3%.

31. Система, содержащая:

источник образца, содержащий образец спермы;

источник проточной жидкости, содержащий проточную жидкость, содержащую криопротектор;

структуру для доставки жидкости, которая генерирует коаксиальный поток образца спермы из источника образца, окруженного проточной жидкостью из источника проточной жидкости, при этом указанная система доставки жидкости направляет коаксиальный поток через участок проведения измерения;

источник электромагнитного излучения, который облучает сперму на участке проведения измерения;

по меньшей мере один детектор, который генерирует сигналы в ответ на облучение спермы на участке проведения измерения;

анализатор, который определяет характеристики спермы на основании сигналов, производимых по меньшей мере одним детектором.

32. Система по п. 31, отличающаяся тем, что структура для доставки жидкости включает сопло.

33. Система по п. 31, отличающаяся тем, что структура для доставки жидкости включает проточный канал.

34. Система по п. 31, дополнительно содержащая устройство отбора для отбора спермы на основании определенных характеристик спермы.

35. Система по п. 34, отличающаяся тем, что устройство отбора включает:

осциллятор для преобразования коаксиального потока в капли;

зарядный штифт для зарядки образующих капель, содержащих сперму, на основе определенных характеристик спермы;

отклоняющие пластинки заряжены и расположены так, чтобы отклонять капли в соответствии с зарядом, передаваемым на капли зарядным штифтом.

36. Система по п. 34, отличающаяся тем, что устройство отбора включает: абляционный лазер, который выбирает сперму на основании определенных характеристик спермы.

37. Система по п. 31, отличающаяся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт, выбранный из группы, состоящей из: этиленгликоля; глицерина; эритрита; треита; арабита; рибита; ксилита; сорбита; галактита; идита; волемита; фуцита; инозита; глицилглицита и их комбинаций.

38. Система по п. 31, отличающаяся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт, выбранный из группы, состоящей из: пропиленгликоля, бутантриола и их комбинаций.

39. Система по п. 31, отличающаяся тем, что проточная жидкость содержит антиоксидант.

40. Система по п. 39, отличающаяся тем, что указанный антиоксидант включает антиоксидант, выбранный из группы, состоящей из: витамина B12; витамеров витамина B12; витамина E; витамеров витамина E; токоферола; токотриенола; α-токоферила; альфа-кетоглутарата; их производных и их комбинаций.

41. Проточная жидкость по п. 31, дополнительно содержащая цитрат TRIS, цитрат, лимонную кислоту, моногидрат лимонной кислоты или цитрат натрия.

42. Система по п. 31, отличающаяся тем, что проточная жидкость содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 6%.

43. Система по п. 31, отличающаяся тем, что проточная жидкость содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно

RU 2019125565 A

RU 2019125565 A

2%; от примерно 2% до примерно 4%; от примерно 4% до примерно 6%; от примерно 1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 3%; от примерно 3% до примерно 4%; от примерно 4% до примерно 5%; от примерно 5% до примерно 6%; от примерно 2% до примерно 6%; или от примерно 3% до примерно 5%.

44. Система по п. 31, отличающаяся тем, что проточная жидкость содержит физиологический раствор, забуференный фосфатами, цитрат TRIS или HEPES.

45. Способ обработки спермы, включающий:

окрашивание образца спермы средой для окрашивания, содержащей ДНК-селективный краситель;

впрыскивание окрашенного образца спермы в поток проточной жидкости;

подвергание окрашенного образца спермы в потоке проточной жидкости действию источника электромагнитного излучения, который вызывает детектируемый ответ ДНК-селективного красителя;

детектирование ответа ДНК-селективного красителя на воздействие электромагнитного излучения;

манипуляцию соотношения жизнеспособной спермы, несущей X-хромосому, к жизнеспособной сперме, несущей Y-хромосому, с образованием по меньшей мере одной подвергнутой манипуляции популяции спермы; и

сбор по меньшей мере одной подвергнутой манипуляции популяции спермы в один или более сосудов для сбора, содержащих среды для сбора;

где одна или более из среды для окрашивания, проточной жидкости и среды для сбора содержит криопротектор.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что каждая из среды для окрашивания, проточной жидкости и среды для сбора включает криопротектор.

47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что среда для окрашивания содержит первое количество криопротектора, проточная жидкость содержит второе количество криопротектора, и среда для сбора содержит третье количество криопротектора.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что первое количество криопротектора составляет менее второго количества криопротектора и третьего количества криопротектора.

49. Способ по п. 47, отличающийся тем, что третье количество криопротектора составляет более первого количества криопротектора и второго количества криопротектора.

50. Способ по п. 45, отличающийся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт, выбранный из группы, состоящей из: этиленгликоля; глицерина; эритрита; треита; арабита; рибита; ксилита; сорбита; галактита; идита; волемита; фуцита; инозита; глицилглицита и их комбинаций.

51. Способ по п. 45, отличающийся тем, что криопротектор содержит многоатомный спирт, выбранный из группы, состоящей из: пропиленгликоля, бутантриола и их комбинаций.

52. Способ по п. 45, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из проточной жидкости, среды для окрашивания и среды для сбора дополнительно содержит антиоксидант.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антиоксидант включает антиоксидант, выбранный из группы, состоящей из: витамина B12; витамеров витамина B12; витамина E; витамеров витамина E; токоферола; токотриенола; α-токоферила; альфа-кетоглутарата; их производных и их комбинаций

54. Способ по п. 45, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из проточной жидкости, среды для окрашивания и среды для сбора дополнительно содержит цитрат, лимонную кислоту, моногидрат лимонной кислоты или цитрат натрия.

RU 2019125565 A

RU 2019125565 A

55. Способ по п. 45, отличающийся тем, что проточная жидкость содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 6%.

56. Способ по п. 45, отличающийся тем, что проточная жидкость содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 4%; от примерно 4% до примерно 6%; от примерно 1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 3%; от примерно 3% до примерно 4%; от примерно 4% до примерно 5%; от примерно 5% до примерно 6%; от примерно 2% до примерно 6%; или от примерно 3% до примерно 5%.

57. Способ по п. 45, отличающийся тем, что среда для окрашивания содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 0,1% до примерно 1%; от примерно 1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 3%; от примерно 3% до примерно 4%; от примерно 2% до примерно 4%; или от примерно 1,5% до примерно 3%.

58. Способ по п. 45, отличающийся тем, что среда для сбора содержит криопротектор в об./об. или масс./об. концентрации от примерно 1% до примерно 2%; от примерно 2% до примерно 4%; от примерно 4% до примерно 6%; от примерно 3% до примерно 5%; или от примерно 3,5% до примерно 5,5%; или примерно 4,5%.

59. Способ по п. 45, отличающийся тем, что проточная жидкость содержит физиологический раствор, забуференный фосфатами, цитрат TRIS или HEPES.

60. Способ замораживания подвергнутого манипуляции образца спермы, включающий:

приведение окрашенного образца спермы в контакт с проточной жидкостью в потоке;

манипуляцию соотношения жизнеспособной спермы, несущей X-хромосому, к жизнеспособной сперме, несущей Y-хромосому, с образованием по меньшей мере одной подвергнутой манипуляции популяции спермы;

сбор подвергнутого манипуляции образца спермы в присутствии криопротектора;

концентрирование собранного образца спермы;

повторное суспендирование сконцентрированного образца спермы в разбавителе для замораживания; и

замораживание повторно суспендированного образца спермы.

61. Способ по п. 60, дополнительно содержащий стадию охлаждения спермы в течение периода 120 минут или периода менее 120 минут.

62. Способ по п. 60, отличающийся тем, что стадия сбора смеси дополнительно включает: сбор смеси в емкость.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что стадия сбора смеси дополнительно включает: сбор смеси в емкость, содержащую от примерно 5 мл до примерно 50 мл среды для сбора.

64. Способ по п. 62, отличающийся тем, что стадия сбора смеси дополнительно включает сбор отсортированного образца спермы из проточного цитометра до заполнения емкости на от примерно 60% до примерно 90% вместимости емкостей.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что стадию концентрирования собранной смеси осуществляют в емкости.

66. Способ по п. 60, отличающийся тем, что после стадии концентрирования собранной смеси следует стадия сбора подвергнутого манипуляции образца спермы в присутствии криопротектора без какого-либо дополнительного разбавления между стадиями.

67. Способ по п. 60, отличающийся тем, что разбавитель для замораживания содержит менее 6% об./об. или масс./об. криопротектора.

68. Способ по п. 60, отличающийся тем, что разбавитель для замораживания содержит

RU 2019125565 A

RU 2019125565 A

от 3,5% до 5,5% об./об. или масс./об. криопротектора.

69. Способ по п. 60, отличающийся тем, что разбавитель для замораживания содержит от 4% до 5% об./об. или масс./об. криопротектора.

70. Способ по п. 60, отличающийся тем, что ресуспендированную смесь выдерживают в течение от 2 часов до 18 часов перед замораживанием.

71. Способ по п. 60, отличающийся тем, что стадия сбора подвергнутого манипуляции образца спермы в присутствии криопротектора дополнительно включает добавление криопротектора к образцу спермы во время стадии окрашивания.

72. Способ по п. 60, отличающийся тем, что стадия сбора подвергнутого манипуляции образца спермы в присутствии криопротектора дополнительно включает добавление криопротектора к проточной жидкости, которую собирают совместно с образцом спермы на стадии сбора.

73. Способ по п. 60, отличающийся тем, что стадия сбора подвергнутого манипуляции образца спермы в присутствии криопротектора дополнительно включает сбор подвергнутого манипуляции образца спермы в емкость, содержащую среду для сбора, причем среда для сбора содержит криопротектор.

74. Способ по п. 60, отличающийся тем, что стадия сбора подвергнутого манипуляции образца спермы в присутствии криопротектора дополнительно включает включение криопротектора в одну или более из: среды для окрашивания, применяемой для окрашивания образца спермы, проточной жидкости и среды для сбора.

75. Способ по п. 60, отличающийся тем, что стадия манипуляции соотношения жизнеспособной спермы, несущей X-хромосому, к жизнеспособной сперме, несущей Y-хромосому, с образованием по меньшей мере одной подвергнутой манипуляции популяции спермы дополнительно включает классификацию клеток в потоке и выбор спермы на основании их классификации.

76. Способ по п. 60, отличающийся тем, что стадия манипуляции соотношения жизнеспособной спермы, несущей X-хромосому, к жизнеспособной сперме, несущей Y-хромосому, с образованием по меньшей мере одной подвергнутой манипуляции популяции спермы дополнительно включает формирование капель, которые, как ожидается, будут содержать выбранную сперму, и отклонение этих капель для сбора или фотоповреждение выделенной спермы в потоке.

RU 2019125565 A

RU 2019125565 A