

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
30 de agosto de 2018 (30.08.2018)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2018/154169 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C12N 5/076 (2010.01) A61D 19/00 (2006.01)
A61B 17/425 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2018/070135

(22) Fecha de presentación internacional:

22 de febrero de 2018 (22.02.2018)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P20170100483

24 de febrero de 2017 (24.02.2017) AR

(71) Solicitante: REPETTO, Constanza Julia [IT/ES]; Conrado Albaladejo, 37, F, Bw 19, 03540 Alicante (ES).

(72) Inventor; y

(71) Solicitante: REPETTO, Herberto Ernesto Héctor [AR/AR]; Pedro Rivera 4946, Caba, 1431 (AR).

(74) Mandatario: SALIS, Eli; Goleta, 17, Esc. 2, 2º C, 03540 Alicante (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR SEPARATING MOBILE CELLS

(54) Título: DISPOSITIVO Y MÉTODO DE SEPARACIÓN DE CÉLULAS MÓVILES

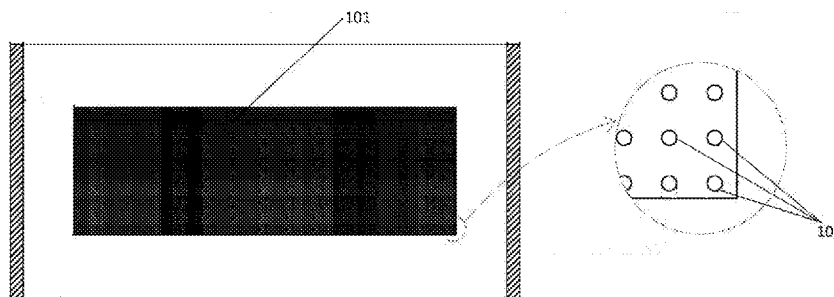


Figura 1

(57) Abstract: The invention relates to a device for separating mobile cells, formed by two reservoirs that share a side formed by a perforated plate in which at least one channel has a narrowed diameter, adopting a conical shape. A sample containing the cells is deposited in the first reservoir and the second reservoir is filled with a culture medium, with a level mark higher than that of the first reservoir, producing a current towards same. The device is used to select, in a semen sample, the most suitable spermatozoa for use in assisted reproduction techniques.

(57) Resumen: Dispositivo para separar células móviles, formado por dos reservorios que comparten un lado constituido por una placa cribada en la que al menos un canal presenta una disminución de su diámetro adoptando una forma cónica. El primer reservorio es donde se deposita la muestra que contiene las células y el segundo reservorio se carga con un medio de cultivo con un nivel de enrase superior al del primer reservorio, lo que origina una corriente hacia el mismo. El dispositivo se emplea para seleccionar en una muestra de semen, los espermatozoides más aptos utilizados en técnicas de reproducción asistida.

[Continúa en la página siguiente]



WO 2018/154169 A1

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

DISPOSITIVO Y MÉTODO DE SEPARACIÓN DE CÉLULAS MÓVILES

Campo de la técnica

La presente invención describe un dispositivo de separación de células móviles a partir de una población celular y un método de separación. Especialmente se enmarca dentro de las técnicas de recuperación de espermatozoides para una ART (técnica de reproducción asistida) donde se necesita recuperar cantidad y calidad de espermatozoides relacionada a su movilidad, morfología e integridad del ADN (1) sin necesidad de otros dispositivos.

Estado de la técnica

Los métodos y dispositivos de separación de células son abundantes en el estado de la técnica, se basan en propiedades características de las células móviles tipo espermatozoides, tales como reothaxis (4), entre otras. Los dispositivos y métodos de separación del estado de la técnica utilizan membranas filtrantes, gradientes de densidad, membranas perforadas que impiden el paso de las células, entre otros.

Las patentes US6129214 (A) y US6357596B1 describen un método y un aparato para separar a los mejores espermatozoides utilizando una membrana; donde los espermatozoides que penetren la membrana podrán ser mantenidos en un medio adecuado. Este dispositivo, según se menciona en la descripción, separa los espermatozoides móviles cuando éstos atraviesan una membrana con poros de entre 5 y 8 μm . Este aparato no separa a los espermatozoides por reotaxis sino que sólo filtra espermatozoides inmóviles.

La solicitud de patente estadounidense US2008311653 (A1), describe un método y aparato para regular de manera óptima el flujo de semen y la separación de los espermatozoides móviles. El aparato consiste de un contenedor cilíndrico, una membrana compuesta por poros (agujeros con diámetro de entre 10 y 150 μm), y un segundo contenedor cilíndrico que se acopla al primer contenedor cilíndrico. El método de separación se basa en la capacidad de los espermatozoides de nadar contracorriente (swim-up). Este método utiliza un sistema de corriente que va induciendo la reotaxis, pero resulta más compleja su realización requiriendo un grado de especialización y aparataje que el dispositivo de la presente invención no precisa, la cantidad de medio que debe disponer este método es mayor y no puede prescindir de una estufa.

La solicitud internacional WO2008104042A1 describe un proceso de separación de células espermáticas utilizando un sistema de filtración por membrana con poros de entre 2 y 3

micrones. La membrana puede ser de varios materiales como PES, PVDF, MCE, PTFE, Nylon, policarbonato, etc. Este tipo de dispositivo no permite el paso de las células móviles, sino que quedan retenidas en los poros de la membrana.

La patente US5575914A describe un filtro para separar espermatozoides con baja movilidad de aquellos con alta movilidad, donde dicho filtro está compuesto de lana de vidrio compacta. Tampoco se basa en reotaxis, filtra espermatozoides inmóviles.

La solicitud de patente CA2834007A1 describe un dispositivo de separación de espermatozoides, donde dicho dispositivo utiliza un arreglo radial de microcanales configurados para dirigir a los espermatozoides desde un depósito a otro. El ancho de dichos microcanales es de entre 50 y 300 micrones, la altura de entre 100 y 200 micrones y la longitud de entre 6 y 9 mm. Los microcanales son de forma cilíndrica. Este dispositivo es de diseño y fabricación compleja. Los espermatozoides no nadan contra corriente y por lo tanto lo que hace es dirigirlos bajo la definición de "wall swimming", es decir, a través de la forma de los canales redirige a los espermatozoides. Este dispositivo, además, necesita necesariamente de una estufa. En cambio, la presente invención logra una autoselección aprovechando la capacidad de los espermatozoides de penetrar y nadar contra la corriente, ya que se genera en el dispositivo una corriente inicial hacia el sitio donde se colocan los espermatozoides. Además, la forma de los canales de la presente invención logran rendimientos extraordinarios sin requerimientos de dispositivos adicionales.

La solicitud US2016017273 divulga un método y dispositivo para la separación de espermatozoides a través de la técnica de swim-up.

Los dispositivos y métodos presentes en el estado de la técnica poseen desventajas técnicas en comparación con la presente invención por el hecho de que el medio que utilizan para la separación puede taparse, necesitan de la manipulación por una persona con ciertas habilidades técnicas en el manejo de instrumental de laboratorio y por ende también es necesaria su manipulación en ambientes controlados imposibilitando su uso en campo o en consultorios. Por otra parte, la mayoría de ellos necesitan de operaciones extras de filtración y/o centrifugación, propiciando posibles contaminaciones de la muestra, pérdida de material, alteración del ADN etc., ya sea por aumento en el tiempo de maniobra de la muestra o por la presión producida por las revoluciones durante la centrifugación.

La presente invención proporciona un dispositivo y un método de separación de células móviles que no necesita de operaciones de filtración y/o centrifugación, de sencilla manipulación logrando excelentes resultados de separación de aquellas células móviles de una población celular, inclusive la separación de células móviles con ADN dañado. Una

característica destacada de la presente invención es que no requiere de estufa para realizar la separación de las células móviles, esto permite realizar las acciones necesarias para la inseminación artificial tanto de animales como de humanos en condiciones elementales, sin necesidad de equipamientos usuales en este tipo de técnicas. El dispositivo de la presente invención, incluso permite la inseminación artificial en campo.

Breve descripción de la invención

El dispositivo de separación de células móviles, de la presente invención, a partir de una población celular, preferentemente espermatozoides, comprende un primer reservorio y un segundo reservorio vinculados por al menos una placa cribada, caracterizado porque dicha placa cribada comprende al menos un canal con al menos un extremo que presenta una reducción de su diámetro hacia el interior de dicho canal. Y donde dicha placa cribada está constituida, preferentemente de un material seleccionado del conjunto comprendido por: vidrio, PET, metal, polímero, fibra de carbono y sus mezclas o combinaciones. Donde dicho canal comprende, preferentemente, en al menos uno de sus extremos una forma seleccionada del conjunto comprendido por cónica e hiperboloide, y dicha placa cribada comprende, en un modo preferido de realización de una pluralidad de canales.

Además, dicho canal comprende, en otra forma de realización preferida sus dos extremos con formas seleccionadas del conjunto comprendido por cónica, paraboloide e hiperboloide.

Donde dicha placa cribada comprende una pluralidad de canales que permite la separación de espermatozoides móviles de un lado de dicha placa cribada y de elementos o células no traslativas que quedan del otro lado de dicha placa cribada.

Preferentemente, dicho dispositivo de separación de células móviles de la invención presenta canales que comprenden un primer diámetro externo de entre 50 y 200 μm , un diámetro interno de entre 6 y 15 μm y una longitud de entre 50 y 600 μm ; más preferentemente comprenden un primer diámetro externo de entre 50 y 200 μm , un segundo diámetro externo de entre 10 y 50 μm , un diámetro interno de entre 8 y 15 μm y una longitud de entre 50 y 350 μm .

Además, el dispositivo de separación de células móviles de la presente invención presenta, preferentemente, dicha placa cribada con entre 1000 a 20.000 canales / cm^2 ; y preferentemente el volumen de dicho primer reservorio es de entre 1 y 5mL, y el volumen de dicho segundo reservorio de entre 0,5 y 1,5 ml; y donde dicho segundo reservorio comprende un enrase superior a dicho primer reservorio. Además, dicho segundo reservorio se carga con

un medio de cultivo generándose una corriente de dicho medio de cultivo hacia dicho primer reservorio.

Donde dicha placa cribada está constituida de un material seleccionado del conjunto comprendido por: vidrio, PET, metal, cerámica, polímero, fibra de carbono y sus mezclas o combinaciones.

El dispositivo de separación de células móviles de la invención permite lograr una disminución del semen con ADN dañado en dicho segundo reservorio, con respecto a una muestra de semen fresco. La presente invención logra disminuir hasta nueve veces el valor del ensayo de TUNEL (daño del DNA) respecto del método directo. En particular se observa una disminución de al menos 3 veces para la invención realizada en PET (de 35% a 10%, para la muestra D, tabla 1); y hasta 9 veces para la invención en vidrio (de 35% a 4% para la misma muestra D). Además, el dispositivo de la presente invención incrementa la cantidad de espermatozoides con morfología normal en al menos un 80% (valores de morfología para la muestra D).

Otro objeto de la presente invención es un método de separación de células móviles a partir de una población celular que comprende los siguientes pasos:

- a. Colocar el medio de cultivo para que inunde la cámara 2 y los canales,
- b. poner en contacto la población celular con una cara de una placa cribada que comprende al menos un canal con al menos un extremo que presenta una reducción de su diámetro hacia el interior de dicho canal, enrasando por debajo del nivel del medio de la cámara 2, lo que permite que siga pasando medio hacia la cámara 1 y así producirse el efecto de contracorriente inicial
- c. incubar;
- d. recuperar las células móviles con mayor porcentaje de morfología normal de la otra cara de dicha placa cribada.

Donde dicho método de separación de células móviles a partir de una población celular, en el paso "b" comprende una corriente de un medio de cultivo en sentido contrario al sentido de paso de dichas células móviles, donde dicha corriente es generada por una diferencia de presión, o por capilaridad; y preferentemente dicha diferencia de presión se genera por diferencia de nivel entre los reservorios que se encuentran a ambos lados de dicha placa cribada. Además, dicho paso "c" comprende incubar por un tiempo de entre 1 y 90 minutos a una temperatura entre 35 y 37°C. Preferentemente, entre 10 y 90 minutos. Y, preferentemente, el método de la presente invención hace uso del dispositivo de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

FIGURA 1: representa vista frontal, con corte donde se muestra la placa cribada (101), donde en la imagen aumentada se muestran los canales de la placa (102).

FIGURA 2: representa el corte lateral del dispositivo donde se observan el primer reservorio (201), la placa cribada (203) y el segundo reservorio (202). Además, se muestra en aumento la forma preferida del tipo de canal de la placa cribada.

FIGURA 3: representa, el esquema completo posible del dispositivo de la presente invención, donde se observan el primer reservorio (201), la placa cribada (203) y el segundo reservorio (202).

FIGURA 4: representa el dispositivo adaptado a la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

FIGURA 5: esquemas de algunas de las formas que pueden adoptar los canales de la placa cribada de la presente invención.

FIGURA 6: representa una forma alternativa de realización del dispositivo de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo a la presente invención, una población celular comprende un fluido que puede ser un medio de cultivo, o un fluido biológico con una gran variedad de células, donde en dicho fluido hay células con capacidad locomotora, llamadas de ahora en más células móviles. El ejemplo de la presente invención comprende la separación de células móviles del tipo espermáticas, sin embargo, el dispositivo y método también son aplicables a otro tipo de células móviles, tales como microorganismos o parásitos.

La presente invención describe un dispositivo y un método de separación de células móviles, preferentemente espermáticas, que no se basa en los presupuestos de un swim-up o en los que utilizan la mayoría de los otros sistemas, sino que se basa en dos aspectos 1) la búsqueda que realiza la gameta, o célula, de un espacio por donde entrar, búsqueda que es aleatoria, auxiliada por la forma del canal y 2) las micro corrientes que generan los mismos espermatozoides y que terminan guiando a los siguientes por reotaxis (primero inducida por diferencia de presión y luego auto-inducida por el paso a través del estrecho canal).

El dispositivo de la presente invención no requiere ningún otro elemento de laboratorio para poder lograr su cometido, esto es ni tubos adicionales, ni centrífuga ni estufa. Tampoco requiere electricidad, lo que lo convierte en una herramienta básica e innovadora a la hora de extender las prácticas de fertilidad asistida a todo el mundo, habilitando tanto a los

profesionales de la salud como a los veterinarios a disponer por ellos mismos de una herramienta para ser dispuesta hasta en los lugares menos provistos. La incubación que requiere el método de la presente invención puede realizarse manteniendo el dispositivo encerrado en el puño de un adulto o en contacto con el cuerpo humano.

5 El dispositivo de la presente invención comprende un primer reservorio (201), donde se coloca la muestra de semen de la cual se desean separar los espermatozoides, un segundo reservorio (202) a donde migran y se recogen los espermatozoides o células móviles vinculados ambos reservorios mediante una placa cribada (203). Dicha placa cribada comprende una o más perforaciones que conforman canales por donde migran las células
10 móviles. Dichas perforaciones, llamadas canales, pueden tener iguales o diferentes diámetros de acuerdo a la sección de dicho canal que se mida, esto es, teniendo en cuenta la sección que se vincula al primer reservorio, la sección que se vincula al segundo reservorio y la sección que queda entre medio de las anteriormente mencionadas (ambas llamadas secciones externas), llamada de ahora en más sección intermedia.

15 En un aspecto preferente de la presente invención, los canales que presenta la placa cribada poseen diámetros iguales en todas las secciones de dichos canales.

En otro aspecto de la presente invención, el diámetro de los canales es diferente en las secciones que se vinculan a los reservorios respecto de la sección intermedia. En una forma preferida de la presente invención, dichas secciones externas de dichos canales poseen un
20 diámetro superior al diámetro de la sección intermedia de dicho canal.

En otro aspecto de la presente invención dichas secciones externas de dichos canales poseen formas geométricas del tipo cónica, hiperbólicas o parabólicas.

El dispositivo de la presente invención opera en ausencia de un filtrado o la aplicación de electromagnetismo, o corrientes estáticas o métodos de marcación inmunológica. El
25 dispositivo de la presente invención logra que el espermatozoide nade del mismo modo que lo haría *in vivo*, migrando en conjunto desde un reservorio pasando a través de una placa cribada hacia otro reservorio dejando atrás los detritus, espermatozoides con ADN dañado en su mayoría y células no móviles. Se aprovecha esencialmente la propiedad de reotaxis, el diseño y comportamiento natural de la gameta para penetrar interfases (este comportamiento
30 se observa en mayor medida en espermatozoides con ADN no dañado). El dispositivo utiliza la propiedad de reotaxis de los espermatozoides generada por una diferencia de presión entre los dos reservorios, lográndose esto como consecuencia de un mayor nivel inicial del segundo reservorio (donde se recuperan los espermatozoides móviles) que se mantendrá hasta el momento en que se equilibren las dos presiones, aunque también se involucran como fuerzas

impulsoras de tal corriente la capilaridad y posiblemente la diferencia de concentraciones en ambos reservorios. Más allá del fenómeno que provoque la corriente es un hecho que existe una corriente de fluido desde el segundo reservorio hacia el primero, lo que genera el impulso para que los espermatozoides saludables nadan en contracorriente. Hasta ese instante, las corrientes inducidas a través de cada una de los canales desde el medio de cultivo hacia dicho primer reservorio de colección del semen entero, favorece la reotaxis de los espermatozoides que conservan esa propiedad intacta, quedando a partir de ese momento (el de equilibrio de presión o flujo cero) el sistema autosustentado por las microcorrientes inducidas ahora por el grupo de espermatozoides que continúa pasando a través de la placa cribada.

Esta condición de los espermatozoides más aptos a pasar o atravesar la placa cribada de la presente invención se condice, en los resultados, con el incremento significativo en el porcentaje de morfología normal y de la disminución altamente significativa en el porcentaje de espermatozoides con ADN dañado. Las características de la presente invención permiten una autoselección en las gametas con características traslativas lineales rápidas, que coinciden, como es de esperar, con un porcentaje en una morfología normal aumentada y con un mayor porcentaje de ADN conservado (sin alteraciones).

En el dispositivo de la presente invención los espermatozoides están siguiendo una microcorriente producida por la el flujo entre el compartimiento de medio de recuperación y el compartimiento del semen y luego autosustentada por los que siguen. En otras palabras, después de que uno ha encontrado la entrada los demás ven favorecido su camino por las microcorrientes que produce el primer flagelo a la que se van sumando las microcorrientes de los sucesivos flagelos, potenciando, de esa manera, la corriente y por ende el efecto de reotaxis. De este modo los espermatozoides abandonan por sí mismos el plasma seminal para acceder al medio de cultivo de inseminación, dejando atrás en el plasma seminal todo tipo de elementos no espermatozoides no traslativos (células, detritus, espermatozoides inmóviles y también espermatozoides sin capacidad de reotaxis) ya que no presentan esta capacidad de los espermatozoides de penetrar este tipo de orificios.

El dispositivo de la presente invención comprende al menos una placa cribada con uno o más canales de formas seleccionadas entre cónica, hiperbólica, paraboloide de revolución, entre muchas otras que permitan un ensanchamiento en al menos uno de los extremos del canal tal como se puede apreciar en la figura 5. La cantidad calidad y tipo de canales varía de acuerdo al material usado para fabricar la placa. También puede variar el tamaño de los reservorios para la muestra de semen según la cantidad de muestra a procesar, entre otros. Los métodos constructivos son conocidos en el estado del arte y pueden realizarse con laser, entre otros mecanismos de perforación.

En un aspecto preferido de la presente invención, la placa cribada comprende una densidad de canales de entre 1.000 y 20.000 por cm^2 .

En otro aspecto de la presente invención, las perforaciones o canales de la placa cribada de la presente invención comprenden una longitud de entre 100 y 600 μm .

- 5 Tal como se mencionó anteriormente, los canales de la presente invención comprenden tres secciones con diámetros distintos, un primer diámetro externo vinculado dicho primer reservorio (donde se coloca el semen), un diámetro interno, y un segundo diámetro externo que vincula la placa cribada con dicho segundo reservorio (donde se recogen las células móviles en un medio de cultivo provisto para tal fin). Así, dicho primer diámetro externo
10 comprende entre 50 y 200 μm , dicho diámetro interno comprende entre 8 y 15 μm , y dicho segundo diámetro externo comprende entre 10 y 50 μm .

En otro aspecto de la presente invención, las perforaciones de la placa cribada comprenden diferentes formas geométricas tales como cilíndricas, cónicas, parabólica, hiperbólica, hiperbólica de revolución. De forma preferente, la forma geométrica de entrada y salida de las
15 perforaciones es una curva de revolución que puede ser entre una recta (que genera un cono) o una curva tipo sección de parábola o hipérbola que resulta en una figura de revolución con un diámetro exterior mayor al interior (204).

Se ha encontrado, sorprendentemente que las formas descritas de dichas perforaciones que dan origen a los canales de dicha placa cribada, al ser ensanchados en el ingreso propician
20 una conformación que aumenta notablemente la eficiencia del dispositivo de la invención para obtener una mayor concentración de células móviles viables.

Los reservorios del dispositivo de la presente invención comprenden una capacidad volumétrica que depende de varios factores: la cantidad de muestra a procesar, las dimensiones de la placa cribada, entre otros. De manera preferente, los reservorios utilizados
25 para una placa cribada de 1x3 cm varían entre 0.5 y 4,0 ml. Es fundamental resaltar que el dispositivo de la presente invención genera una corriente en el fluido o medio de cultivo de tal manera que las células móviles, preferentemente los espermatozoides, utilicen su capacidad de nadar contracorriente para su separación; dicha corriente se genera mediante una diferencia de presión en los reservorios. Para generar la diferencia de presión, el segundo
30 reservorio contiene mayor nivel, de esa manera se genera una corriente hacia el primer reservorio a través de la placa cribada. De manera preferida, en el dispositivo de la presente invención, en dicho primer reservorio se carga la muestra a separar, y dicho segundo reservorio se carga con un medio de cultivo o fluido para recuperar las células móviles separadas del resto de la población por su paso a través de dicha placa cribada. Para generar

la diferencia de presión y consecuentemente generar una corriente con sentido hacia el primer reservorio, primero debe cargar el segundo reservorio hasta un nivel o enlace superior al de dicho primer reservorio; luego se carga el primer reservorio con la muestra poblacional de células a separar.

- 5 El dispositivo de la presente invención separa los espermatozoides móviles en un tiempo de entre 1 y 90 minutos. Preferentemente, entre 10 y 90 minutos.

En otro aspecto de la presente invención, la misma puede realizarse en ausencia de estufa, ya que funciona aún cuando es calefaccionada por el calor emitido por el propio operador.

- En otro aspecto de realización de la presente invención, el dispositivo es adaptado para la
10 técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). La inseminación con micro inyección de semen a un ovocito puede ser de utilidad realizar la separación de espermatozoides de alta performance en la misma placa de inyección. Se basa en una realización alternativa del dispositivo de la presente invención, pero con las dimensiones
acordes al proceso de ICSI. Una alternativa preferida de realización de la presente invención
15 con sólo un canal que está esquematizada en la figura 4, comprende dichos dos reservorios, también llamados microcubas (402 y 403) comunicados por un canal con entrada en forma de embudo que comunica ambos reservorios (404). Ambos reservorios se hallan cubiertos por un cubreobjeto (401) habilitando de este modo un canal de 10 μ . Este sistema permite la recuperación in situ de espermatozoides de alta calidad. En esta forma de realización
20 alternativa la criba contiene sólo un canal.

- En otra forma alternativa de realización de la presente invención, la misma comprende una forma cilíndrica tal como lo muestra la figura 6, que comprende una tapa (601), un agujero cercano a la apertura de dicho tubo (602), un primer reservorio (604) y un segundo reservorio (603) donde se puede observar que el enrase del segundo reservorio, reservorio de salida y
25 recolección de los espermatozoides seleccionados, es mayor que el enrase del primer reservorio donde va la muestra de semen con los espermatozoides a separar. En la figura 6 se muestra una ampliación de la sección donde se muestra la placa cribada (605) con los canales (606) por donde fluyen los espermatozoides.

30 Ejemplos de aplicación

Ejemplo 1

Dispositivo con placa cribada de vidrio. Ensayos D, E y F

En placa de vidrio. El dispositivo de separación de células móviles, de la presente invención (MXM) consta de dos reservorios separados por una placa cribada de vidrio de $130 \pm 40 \mu\text{m}$ de espesor, con canales de forma cónica de la longitud del ancho del vidrio, es decir de $130 \pm 40 \mu\text{m}$, un primer diámetro (entrada) de $15 \mu\text{m}$ y un segundo diámetro (salida) de $8 \mu\text{m}$. En primer lugar, se colocó el medio de recuperación Ham F10 1X con HEPES, suplementado con SSS y Penicilina/streptomycin en el reservorio de recuperación (segundo reservorio); luego se colocó muestra de semen D, E y F previamente procesadas según protocolo de la OMS2010 en el reservorio restante (primer reservorio).

En este ejemplo la placa es de $1\text{cm} \times 2\text{cm}$, con una densidad de 6600 perforaciones/ cm^2 . El primer reservorio, donde se coloca la muestra a procesar posee una capacidad volumétrica máxima de 3mL , y el segundo reservorio comprende una capacidad máxima de 1mL .

Ejemplo 2

Dispositivo con placa cribada de PET. Ensayos A, B, C y D

La placa cribada hecha en PET se realizó con 2500 canales, cada una de $200\mu\text{m}$ de largo. Los canales de forma cónica comprenden un primer diámetro (entrada) de $15 \mu\text{m}$ y un segundo diámetro (salida) de $10 \mu\text{m}$. La dimensión de la placa de PET es de $1\text{cm} \times 2\text{cm}$. Los reservorios son los mismos utilizados para la placa cribada de vidrio del ejemplo 1. En primer lugar, se colocó el medio de recuperación Ham F10 1X con HEPES, suplementado con SSS y Penicilina/streptomycin en el reservorio de recuperación (segundo reservorio); luego se colocó muestra de semen A, B, C y D previamente procesadas según protocolo de la OMS2010 en el reservorio restante (primer reservorio).

El procedimiento para ambos ejemplos, para la utilización del dispositivo de la presente invención es el siguiente:

Paso 1- Se coloca el medio Ham F10 1X con HEPES ($0.6\text{-}0.7\text{ml}$) hasta el enrace del segundo reservorio. Se carga el HamF10 1X con HEPES con una pipeta Pasteur de punta capilar (para poder entrar en la cubeta); al llenarse ésta, permite rellenar las cribas con el medio HTF que bañará todo su interior y la superficie inmediata del lado del semen.

Paso 2 - Inmediatamente después se procede a colocar la muestra de semen en el primer reservorio. Debe de asegurarse de tapar completamente la placa cribada con la muestra a procesar y aprovechar al máximo la superficie cribada.

Paso 3 - Se procede a la incubación de una hora (que puede ser entre 1 minutos y 90 minutos) en contacto con el cuerpo, aunque puede ser realizado en estufa.

Paso 4 - Se retira el dispositivo del estado de incubación (ya sea de estufa o en contacto con el cuerpo), se utilizó una estufa para el ejemplo 2, a 36 °C y el puño para el ejemplo 1. Se toma la muestra procesada del medio de recuperación (es decir, del segundo reservorio) con jeringa y aguja de tuberculina. Esta muestra procesada está lista para ser utilizada en
5 inseminación artificial.

Para la evaluación del semen antes y después de su recuperación se siguieron los lineamientos de OMS 2010. Para evaluar el DNA se utilizó el test de TUNEL con el uso de un citómetro de flujo o microscopio de fluorescencia.

Resultados

10 Los resultados de las pruebas del instrumento muestran que con el método de la presente invención (MXM) para el material de **vidrio** duplican el % formas normales (morfología estricta) con respecto al semen sin tratamiento pasando de 13.3% en el método directo (promedio de muestras D, E, F) de formas normales a 27,0% (n:3) con el dispositivo de la presente invención. Comparando MXM de la presente invención (Vidrio), con el swim-up, la
15 presente invención logra una mejora del 50 % (muestras D, E, F) en la morfología de los espermatozoides seleccionados. (Tabla 1)

Para el caso de a presente invención empleando material PET, se triplico el % de espermatozoides con formas normales respecto del directo, pasando de 10.3% a 36.0% (para las muestras A, B, C, D), valores promedios de los resultados obtenidos en cada ensayo.
20 Mientras que en el caso de swim-up solo llega casi a duplicarse el valor de espermatozoides con formas normales, pasando de 11.3% de formas normales a 18.0% con el método de la presente invención. Cabe acotar que la técnica swim-up es la técnica básica normal para la recuperación de espermatozoides con vistas a una inseminación artificial, de alta o baja complejidad, con la desventaja de que dado el tiempo de exposición y manipulación junto con
25 centrifugación que puede conducir a alteraciones del ADN.

Por otra parte, la morfología se evalúa según la OMS según el criterio de Kruger. Tomada una muestra cuyo estudio de Túnel (2) para evaluar la integridad de ADN arrojó un valor de 35 % (patológica dado que los valores de referencia deben ser menor a 20%) se procedió a realizar ese mismo estudio sobre un swim-up y sobre el MXM de PET y de vidrio, de la misma muestra
30 (muestra D). Los valores obtenidos, como se observa en la tabla que sigue, indican una mejora significativa al utilizar MXM en PET se reduce en más de un tercio del valor original (se pasa de un valor de 35 a uno de 10), altamente significativa. Por otro lado, los valores del ensayo de Túnel para los métodos tanto de swim-up como en MXM en vidrio de la presente invención para la muestra D, muestran una mejora en dicho valor con una reducción casi nueve veces.

Si bien se observa que el swim-up logra para la muestra D una disminución en el daño del DNA de los espermatozoides que es casi igual a la encontrada para MXM, este último método de la presente invención en vidrio logra una muestra de espermatozoides con una mejor morfología de tres veces para dicha muestra.

5

Tabla 1: resultados de ensayos realizados en ejemplos 1 y 2

MUESTRA	Presente invención en PET		Presente invención en VIDRIO		Swim Up		DIRECTO	
	MORFOLOGIA	TUNEL	MORFOLOGIA A	TUNEL	MORFOLOGIA A	TUNEL	MORFOLOGIA	TUNEL
A	22				13		12	
B	43				26		6	
C	43				18		10	
D	35	10	24	4	8	3	13	35
E			31		26		15	
F			26		20		12	
% de incremento del % de morfología normal con respecto al semen sin tratamiento	comparando A,B,C,D pasa de un promedio de 10,3% de formas normales en semen sin tratamiento a 35,7%. implica que se triplica el % de normales		comparando D,E,F pasa de 13,3% de formas normales promedio en semen sin tratamiento a 27,0% de formas normales. Implica que se duplican las formas normales		Comparando A,B,C,D,E,F pasa de 11,3% de formas normales promedio de semen sin tratamiento a 18,5% . Incrementa menos del doble las formas normales		0	
% de incremento del % de morfología normal con respecto al s.up	comparando A,B,C,D pasa de un promedio de 16 ,3% de formas normales en el swim up a 35,7% con el MXM. implica que se incrementaron las formas normales en 120%		Comparando D,E,F pasa de 18,0% a 27,0% esto es un incremento en la morfología para MXM del 50% respecto del swim up					

disminución del % de espermatozoi des con ADN dañado con respecto al semen fresco (solo muestra D)		Disminuyó el % de espermatozo ides dañados respecto de la muestra sin tratamiento al tercio		Disminuyó el % de espermato zoides dañados respecto de la muestra sin tratamient o al décimo		Disminuyó el % de espermatoz oides dañados respecto de la muestra sin tratamienta l décimo		
--	--	--	--	---	--	---	--	--

Referencias

(1)Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon--not waving but drowning. Adv Exp Med Biol 2003;518:85- 98

5 (2)A Agarwal, SS Allamaneni - Minerva Ginecol, 2004 - clevelandclinic.org

(3)D Mortimer - Human Reproduction, 1991 – ESHRE

(4)K Miki, DE Clapham - Current Biology, 2013 - Elsevier

REIVINDICACIONES

Habiendo así descrito y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica, lo que se declara reivindicar como invención y de propiedad exclusiva, es:

1. Un dispositivo de separación de células móviles a partir de una población celular que comprende un primer reservorio y un segundo reservorio vinculados por al menos una placa cribada, caracterizado porque dicha placa cribada comprende al menos un canal con al menos un extremo que presenta una reducción de su diámetro hacia el interior de dicho canal
2. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho canal comprende en al menos uno de sus extremos una forma seleccionada del conjunto comprendido por cónica, paraboloide e hiperboloide.
3. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dicha placa cribada comprende una pluralidad de canales.
4. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dicho canal comprende sus dos extremos con formas seleccionadas del conjunto comprendido por cónica, paraboloide e hiperboloide.
5. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dichas células comprenden espermatozoides.
6. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dicha placa cribada comprende una pluralidad de canales que permite la separación de espermatozoides móviles de un lado de dicha placa cribada y de elementos o células no traslativas que quedan del otro lado de dicha placa cribada.
7. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dichos canales comprenden un primer diámetro externo de entre 50 y 200 μm , un diámetro interno de entre 6 y 15 μm .
8. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 4 caracterizado porque dicho canal comprende un primer diámetro externo de entre 50 y 200 μm y un segundo diámetro externo de entre 10 y 50 μm , un diámetro interno de entre 8 y 15 μm .
9. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dicha placa cribada comprende entre 1000 a 20.000 canales / cm^2 .

10. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque el volumen de dicho primer reservorio es de entre 1 y 5 mL, y el volumen de dicho segundo reservorio de entre 0,5 y 1,5 mL.
11. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1, caracterizado porque el volumen de dicho primer reservorio es de entre 1 y 5mL, el volumen de dicho segundo reservorio de entre 0,5 y 1,5 mL y donde dicho segundo reservorio comprende un enlace superior a dicho primer reservorio.
12. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 10, caracterizado porque dicho segundo reservorio se carga con un medio de cultivo generándose una corriente de dicho medio de cultivo hacia dicho primer reservorio.
13. El dispositivo de separación de células móviles de la reivindicación 1 caracterizado porque dicha placa cribada está constituida de un material seleccionado del conjunto comprendido por: vidrio, PET, metal, cerámica, polímero, fibra de carbono y sus mezclas o combinaciones.
14. El dispositivo de separación de células móviles de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque la disminución de semen con ADN dañado obtenido en dicho segundo reservorio, con respecto al semen fresco es de al menos tres veces.
15. El dispositivo de separación de células móviles de cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque incrementa la morfología normal de los espermatozoides en al menos 80% respecto al método directo.
16. Un método de separación de células móviles a partir de una población celular caracterizado porque comprende los siguientes pasos:
- Colocar el medio de cultivo para que inunde la cámara 2 y los canales,
 - poner en contacto la población celular con una cara de una placa cribada que comprende al menos un canal con al menos un extremo que presenta una reducción de su diámetro hacia el interior de dicho canal, enrasando por debajo del nivel del medio de la cámara 2, lo que permite que siga pasando medio hacia la cámara 1 y así producirse el efecto de contracorriente inicial,
 - incubar;
 - recuperar las células móviles con mayor porcentaje de morfología normal de la otra cara de dicha placa cribada.
17. El método de separación de células móviles a partir de una población celular de la reivindicación 16 caracterizado porque el paso "b" comprende una corriente de un medio de cultivo en sentido contrario al sentido de paso de dichas células móviles, donde dicha corriente es generada por una diferencia de presión.

18. El método de separación de células móviles a partir de una población celular de la reivindicación 16 caracterizado porque dicha diferencia de presión se genera por diferencia de nivel entre los reservorios que se encuentran a ambos lados de dicha placa cribada.

5 19. El método de separación de células móviles a partir de una población celular de la reivindicación 16 caracterizado porque dicho paso "c" comprende incubar por un tiempo de entre 1 y 90 minutos a entre 35 y 37°C.

20. El método de separación de células móviles a partir de una población celular de la reivindicación 16 caracterizado porque dicho paso "c" comprende incubar por un tiempo de entre 10 y 90 minutos a entre 35 y 37°C

10 21. El método de separación de células móviles a partir de una población celular de la reivindicación 16 caracterizado porque comprende la utilización del dispositivo de separación de la reivindicación 1.

DIBUJOS

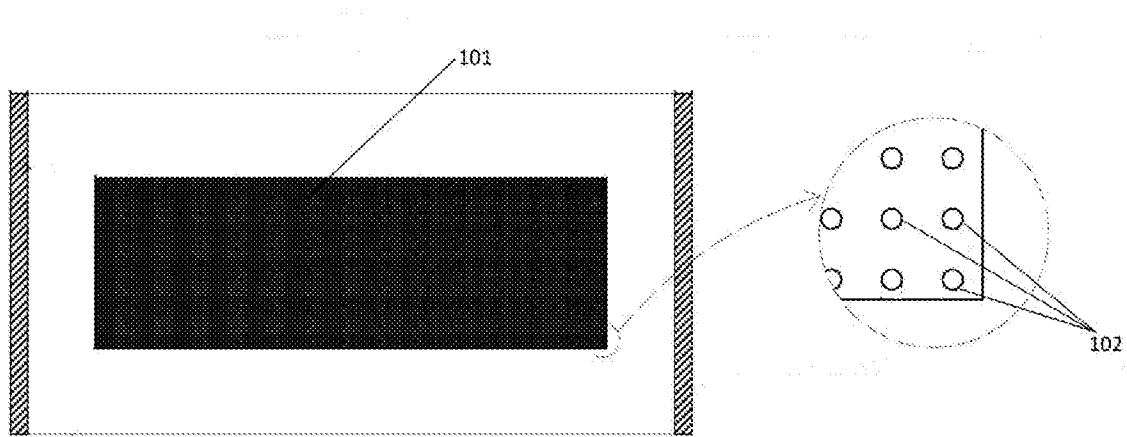


Figura 1

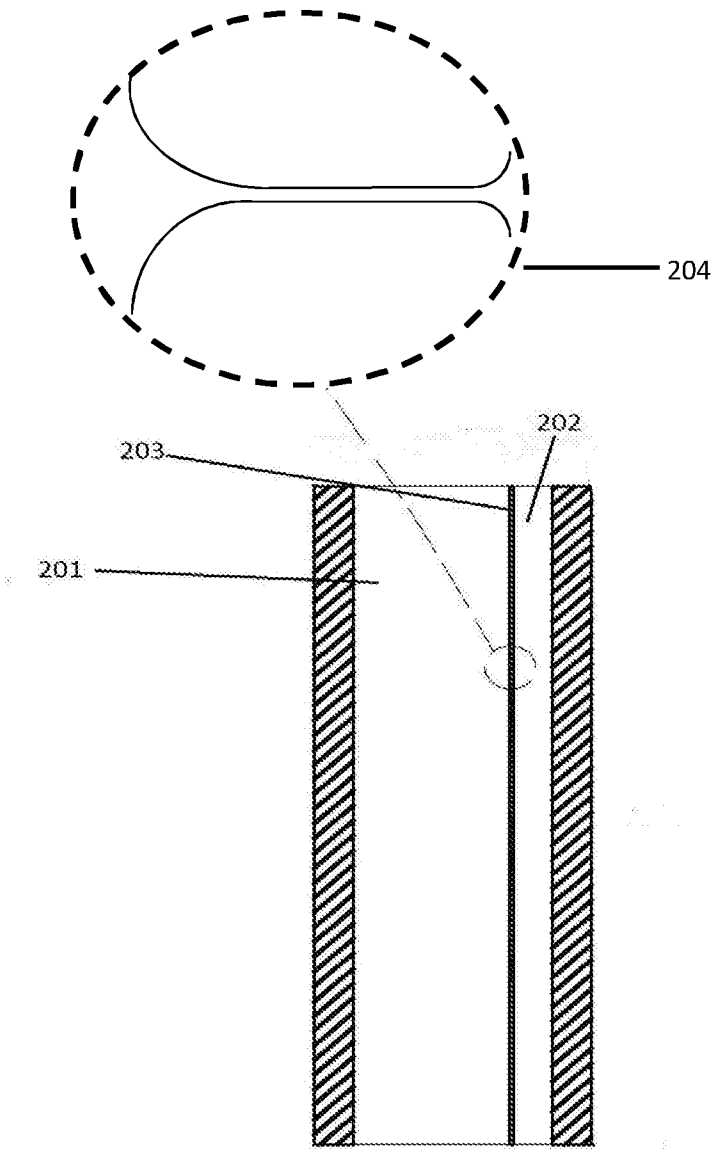
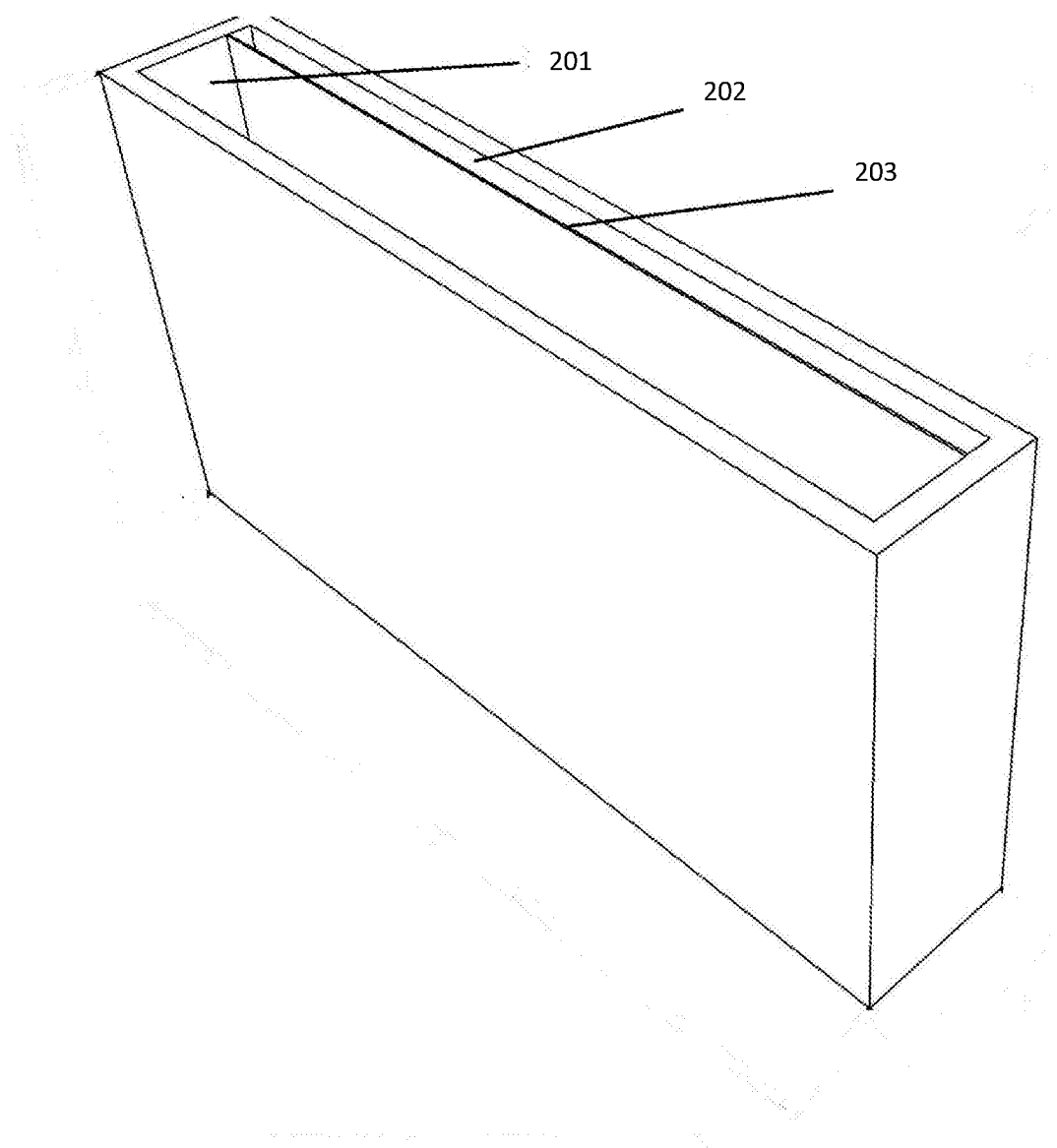


Figura 2

**Figura 3**

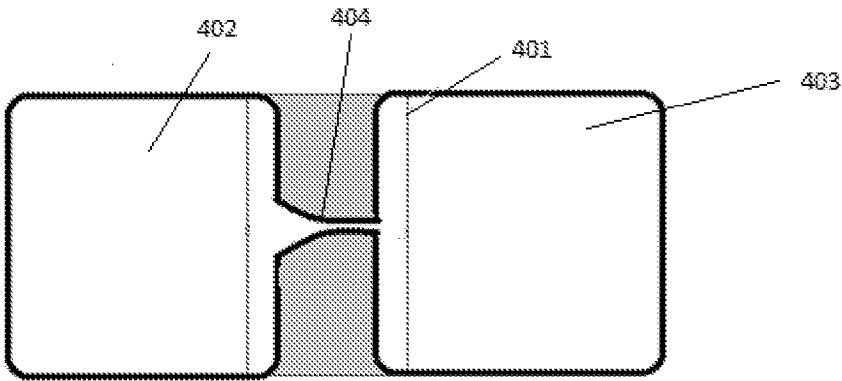


Figura 4

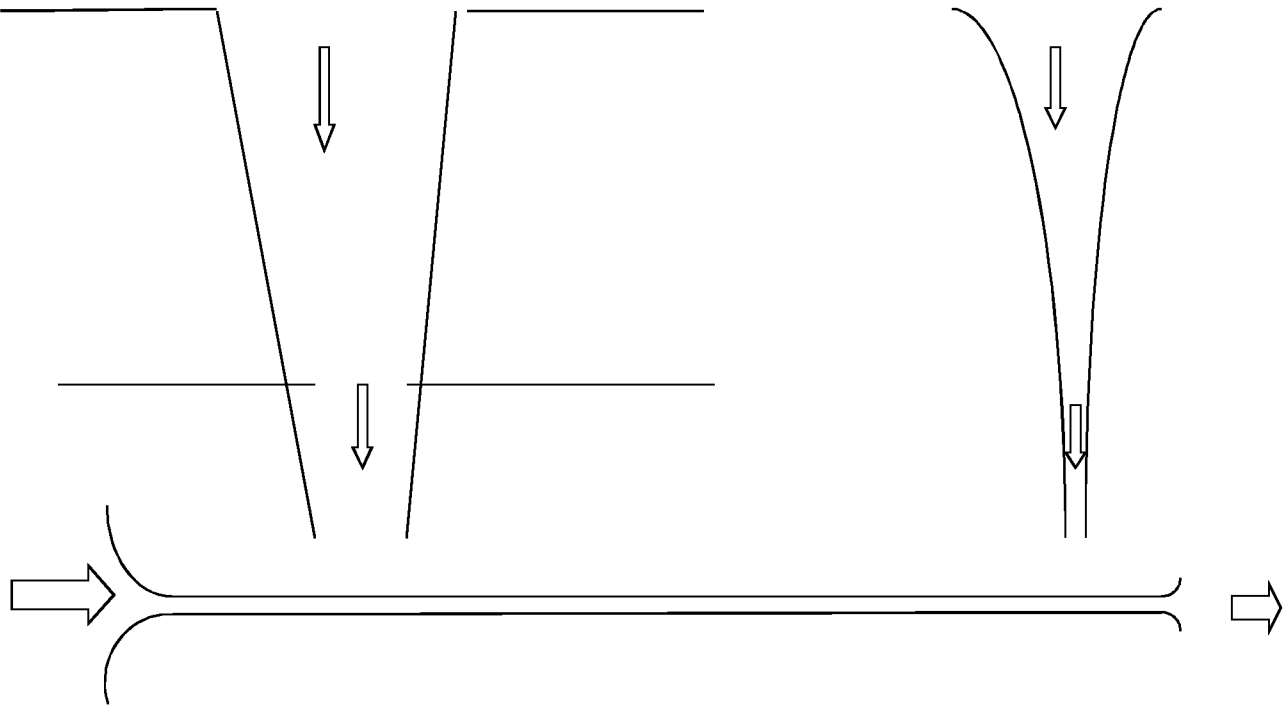


Figura 5

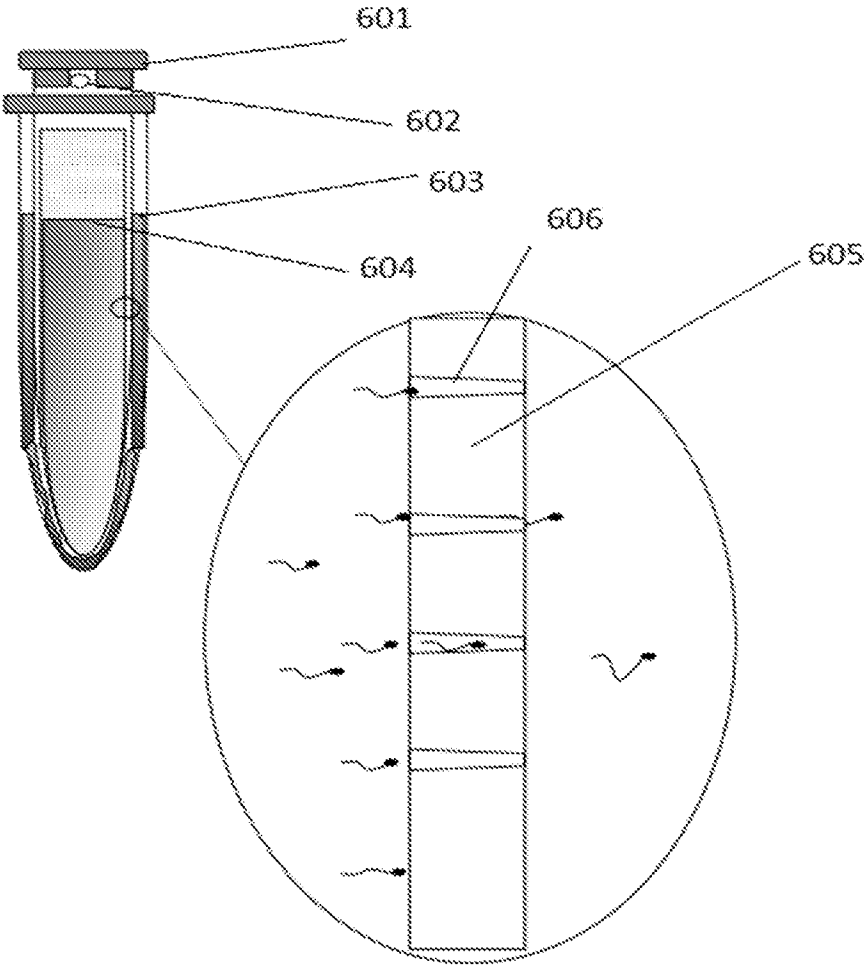


Figura 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070135

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, A61B, A61D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEO, DB et al. "Development of sorting, aligning, and orienting motile sperm using microfluidic device operated by hydrostatic pressure". MICROFLUIDICS AND NANOFUIDICS, October 2007, Vol. 3, Nº 5, pages 561-570, the whole document.	1-21
A	US 20160017273 A1 (YAMASHITA, K. ET AL.) 21.01.2016, the whole document especially Figure 10.	1-21
A	US 20140051112 A1 (TSENG, FG ET AL.) 20.02.2014, the whole document.	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30/05/2018

Date of mailing of the international search report

(01/06/2018)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)

Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer

M. Novoa Sanjurjo

Telephone No. 91 3498466

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070135

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2016017273 A1	21.01.2016	JPWO2014136464 A1	09.02.2017
		JP6202501B B2	27.09.2017
		WO2014136464 A1	12.09.2014
-----	-----	-----	-----
US2014051112 A1	20.02.2014	TW201406954 A	16.02.2014
		TWI503415B B	11.10.2015
		US9023613 B2	05.05.2015
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2018/070135

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/076 (2010.01)

A61B17/425 (2006.01)

A61D19/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2018/070135

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N, A61B, A61D

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SEO, DB et al. "Development of sorting, aligning, and orienting motile sperm using microfluidic device operated by hydrostatic pressure". MICROFLUIDICS AND NANOFUIDICS, Octubre 2007, Vol. 3, Nº 5, páginas 561-570, todo el documento.	1-21
A	US 20160017273 A1 (YAMASHITA, K. ET AL.) 21.01.2016, todo el documento, especialmente Figura 10.	1-21
A	US 20140051112 A1 (TSENG, FG ET AL.) 20.02.2014, todo el documento.	1-21

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
30/05/2018

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
01 de junio de 2018 (01/06/2018)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. Novoa Sanjurjo
Nº de teléfono 91 3498466

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2018/070135

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2016017273 A1	21.01.2016	JPWO2014136464 A1	09.02.2017
		JP6202501B B2	27.09.2017
		WO2014136464 A1	12.09.2014
-----	-----	-----	-----
US2014051112 A1	20.02.2014	TW201406954 A	16.02.2014
		TWI503415B B	11.10.2015
		US9023613 B2	05.05.2015
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N5/076 (2010.01)

A61B17/425 (2006.01)

A61D19/00 (2006.01)