

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 310**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2014 PCT/AU2014/000005**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014 WO14106286**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2014 E 14735286 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 2941124**

54 Título: **Método, sistema y aparato para una micromanipulación y un almacenamiento mejorados**

30 Prioridad:

07.01.2013 AU 2013900039

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

10.11.2023

73 Titular/es:

**GENEA IP HOLDINGS PTY LIMITED (100.0%)
Level 2, 321 Kent Street
Sydney, NSW 2000, AU**

72 Inventor/es:

**VOM, EDUARDO;
ROY, TAMMIE KIM;
LEWIS, CRAIG MATTHEWS;
HOBBS, BENJAMIN RAWLINGSON y
HOBBS, SIMON JAMES**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 953 310 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).

DESCRIPCION

Método, sistema y aparato para una micromanipulación y un almacenamiento mejorados

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

10 [0001] La presente invención se relaciona con el campo de la manipulación y manejo de materiales biológicos. En particular, esta invención se refiere a aparatos y métodos para la micromanipulación de materiales biológicos, por ejemplo, aparatos y metodologías para uso en la crioconservación de materiales biológicos que incluyen ovocitos, embriones y blastocistos, gametos y células madre humanos y no humanos. Si bien la invención se ha desarrollado y tiene aplicación en una amplia gama de situaciones y técnicas de micromanipulación con una variedad de materiales biológicos, encuentra una aplicación particular para su uso en la crioconservación de ovocitos humanos, embriones y células madre mediante vitrificación tal como se aplica durante los procedimientos de fertilización in vitro (FIV).

15 **TÉCNICA ANTERIOR**

[0002] A lo largo de esta especificación, el uso de la palabra "inventor" en forma singular puede tomarse como referencia a un inventor (singular) o más de un inventor (plural) de la presente invención.

20 [0003] Las tecnologías involucradas y aplicadas para la crioconservación de embriones humanos y animales están bien establecidas y con la aplicación de habilidades y conocimientos técnicos adecuados, las tecnologías actuales han logrado una gran mejora en la confiabilidad y el éxito de los procedimientos de fertilización in vitro. A los efectos de esta descripción, se considera que los siguientes términos tienen las siguientes definiciones, con respecto a la manipulación de embriones:

25 "Congelación" es el enfriamiento de un líquido a un estado sólido que puede incluir

"Vitrificación" es el enfriamiento de un líquido a estado sólido sin cristalización.

"Criopreservación" es un proceso en el que las células se conservan enfriándolas a una temperatura bajo cero, normalmente -196 C.

30 "Descongelación" es el proceso de cambiar de un estado sólido congelado a un estado líquido mediante un aumento gradual de la temperatura. Esto se asocia más comúnmente con ovocitos/embriones que se han crioconservado mediante técnicas de congelación lenta. El "calentamiento" es el proceso de cambio de un estado sólido vitrificado a un estado líquido mediante aumentos rápidos de temperatura que evitan la cristalización. Esto se asocia más comúnmente con ovocitos/embriones que han sido criopreservados mediante técnicas de vitrificación.

35 [0004] Las técnicas anteriores, tal como se entienden y aplican, implican la recolección y la crioconservación de embriones, con una pluralidad de pasos que implican la recolección y extracción de ovocitos, la fertilización in vitro de los mismos y la subsiguiente crioconservación y almacenamiento de tales óvulos fertilizados y los embriones resultantes y/o o blastocistos en etapa tardía. La multitud de pasos y etapas de manejo requeridos dependen en gran medida de un alto nivel de conocimientos y habilidades a través de los operadores técnicos. Los embriones o blastocistos, una vez congelados, quedan disponibles según se requiera y pueden descongelarse y transferirse a la receptora, por lo que la implantación exitosa en el útero puede dar como resultado el desarrollo normal de un feto y el embarazo resultante.

45 [0005] Más recientemente, tales técnicas de crioconservación se han aplicado con éxito a óvulos y ovocitos no fertilizados. La crioconservación de ovocitos implica la recolección, congelación y almacenamiento de óvulos u ovocitos de una mujer donante en un estado no fecundado. Dichos óvulos congelados pueden luego extraerse de un banco de almacenamiento, descongelarse y ponerse a disposición para la fertilización y transferirse a un donante a pedido.

50 [0006] Las técnicas de crioconservación aplicadas a ovocitos en lugar de óvulos y embriones fertilizados tienen ciertas ventajas éticas y médicas y han sido objeto de una mayor investigación y experimentación para mejorar las técnicas implicadas

55 [0007] El proceso de crioconservación, particularmente cuando se aplica a materiales biológicos "vivos", implica un alto grado de trauma para el material biológico en cuestión, particularmente teniendo en cuenta los múltiples pasos de manipulación requeridos de acuerdo con las técnicas actuales. Además del trauma experimentado como resultado de la manipulación física, el material biológico también está sujeto a la posible formación de cristales de hielo durante cualquier proceso de congelación, además del choque osmótico y el choque tóxico experimentados durante el movimiento a través de una pluralidad de soluciones químicas de procesamiento.

60 [0008] El método tradicional de preparación de material biológico congelado incluye el enfriamiento lento del material y su solución circundante hasta la temperatura de almacenamiento, con miras a iniciar deliberadamente la formación de cristales de hielo a distancia del material biológico per se. El método tradicional no es óptimo debido a la continua formación de cristales de hielo. Se han desarrollado métodos alternativos de "vitrificación" para abordar los problemas de formación de cristales de hielo, sin embargo, la vitrificación requiere una habilidad técnica considerable para una

ejecución exitosa. La vitrificación implica la transformación de la solución de procesamiento en un sólido amorfo similar al vidrio que no tiene ninguna estructura cristalina, seguido de un enfriamiento extremadamente rápido. El enfriamiento extremadamente rápido es lo que permite que la solución alcance el estado amorfo similar al vidrio.

5 **[0009]** La aplicación del método tradicional de congelación o vitrificación implica el uso de compuestos y soluciones químicas, que se agregan al material biológico para minimizar el daño celular durante los procesos de congelación. Los compuestos químicos y las soluciones se conocen como crioprotectores e incluyen soluciones permeables y no permeables. Los crioprotectores permeantes son pequeñas moléculas que penetran fácilmente en las membranas del material biológico con la formación de enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua del material biológico con el fin de evitar la cristalización del mismo. Ejemplos de tales crioprotectores permeables son el etilenglicol (EG), el sulfóxido de dimetilo (DMSO) y el glicerol. A bajas concentraciones en agua, estos crioprotectores permeables reducen la temperatura de congelación de la solución resultante y pueden ayudar a prevenir y minimizar la cristalización del hielo. En concentraciones más altas que pueden diferir a diferentes velocidades de enfriamiento, estos crioprotectores permeables inhiben la formación de cristales de hielo típicos y pueden conducir al desarrollo de un estado vitrificado o similar al vidrio sólido en el que el agua se solidifica antes de la cristalización o expansión. La toxicidad de dichos crioprotectores permeables aumenta con el aumento de sus concentraciones y es potencialmente tóxico para el material biológico en cuestión y, en consecuencia, el material biológico debe tener una exposición mínima a los crioprotectores permeables durante un período de tiempo muy corto o, alternativamente, exposición a baja temperatura, por lo que se reduce la tasa metabólica del material biológico en cuestión

10
15
20
25 **[0010]** A diferencia de los crioprotectores permeables, los crioprotectores no permeables permanecen extracelulares. Algunos ejemplos de crioprotectores no permeables incluyen disacáridos, trehalosa y sacarosa. Los crioprotectores disacáridos actúan extrayendo agua libre del interior del material biológico y deshidratando los espacios intracelulares. La deshidratación resultante les permite usarse en combinación con crioprotectores permeantes, de manera que la concentración neta del crioprotector permeante puede incrementarse en el espacio intracelular. Estas técnicas ayudan aún más al crioprotector permeante a prevenir o minimizar la formación de cristales de hielo.

30 **[0011]** Durante el proceso de vitrificación, se pueden añadir crioprotectores permeantes a una alta concentración mientras la temperatura del material biológico se controla a un nivel predeterminado por encima de la congelación. Sin embargo, debido a que la toxicidad de concentraciones tan altas de crioprotector permeante puede ser sustancial, no es posible retener el material biológico a tales temperaturas durante períodos prolongados. Alternativamente, puede permitirse un tiempo reducido para el equilibrio después del cual el material biológico, que puede incluir ovocitos o embriones, se sumerge directamente en nitrógeno líquido (en adelante, el nitrógeno líquido se denomina "LN₂") para efectuar la congelación. La tasa de enfriamiento extremadamente rápida minimiza los efectos negativos del crioprotector sobre el material biológico y también minimiza la formación de cristales de hielo al fomentar la vitrificación.

35
40 **[0012]** El proceso de vitrificación implica exponer el material biológico a una serie de soluciones de vitrificación. Las soluciones de vitrificación generalmente se agregan a pozos sucesivos en un plato de cultivo de múltiples pozos, donde el plato y las soluciones se calientan a una temperatura predeterminada, determinada de acuerdo con los requisitos del material biológico en cuestión.

45 **[0013]** En un protocolo convencional, el material biológico se transfiere físicamente a una primera solución en un primer pozo y luego se lava moviendo físicamente el material biológico o la célula a través de la solución en cuestión con un dispositivo de pipeteo de células. El proceso de lavado se repite en un segundo, tercer y cuarto pozo durante períodos de tiempo predeterminados hasta que el material biológico o la célula se consideran listos para la crioconservación. Luego, el material biológico se extrae físicamente con una cantidad predeterminada de solución de vitrificación utilizando una pipeta u otro dispositivo de manipulación. A continuación, se pipetea sobre el dispositivo de vitrificación una gota que contiene el material biológico o la célula que se va a vitrificar. Luego, el dispositivo de vitrificación se transfiere físicamente con la gota y el material biológico adjunto y se sumerge o sella directamente en un recipiente que se sumerge en LN₂ o se coloca sobre la superficie de un bloque de vitrificación que se ha enfriado previamente con LN₂. Una vez que el material biológico y el fluido portador se han vitrificado, el dispositivo de vitrificación se inserta en una pajita preenfriada u otro dispositivo de almacenamiento, ubicado en una ranura en el bloque de vitrificación para su posterior transferencia al almacenamiento en frío a largo plazo en LN₂ o vapor LN₂.

55 **[0014]** Se utilizan varios dispositivos de vitrificación para manipular la muestra durante los procesos de crioconservación. Algunos proponen un dispositivo tipo pipeta en el que la muestra se succiona en un tubo hueco que luego se sumerge directamente en la solución o LN₂. Dicho dispositivo es comercializado por Irvine Scientific y vendido como Cryotip®.

60 **[0015]** Otras técnicas usan un dispositivo de estilo de bucle/gancho que tendrá un bucle cerrado o un gancho abierto hecho de alambre de plástico o metal unido al extremo de un vástago y se usa para transportar la muestra biológica. Dichos dispositivos son comercializados por Cryologic bajo el nombre comercial de fibreplug™ o Cryoloop™ como se define en la solicitud de patente internacional publicada WO00/21365.

65 **[0016]** Se utilizan otras herramientas como se describe en la solicitud internacional WO 02/085110 "Cryotop", que es una tira flexible unida a una pieza de plástico. En el que la muestra se coloca en la tira y se sumerge directamente en

LN₂.

[0017] La técnica anterior actual requiere muchos pasos de manejo de embriones usando múltiples aparatos donde cada paso de manejo aumenta la posibilidad de perder el embrión. Se estima que el 1-2% de los embriones perdidos se atribuyen a errores de manejo durante el paso de vitrificación.

[0018] El trauma asociado con los procesos descritos anteriormente y, en particular, el trauma impuesto por el manejo físico repetido y la manipulación de material biológico extremadamente delicado, incluidos óvulos, células, embriones y blastocistos, impacta en la tasa de supervivencia y, por lo tanto, en el éxito de los procesos y métodos descritos anteriormente. Además, la dinámica física de un embrión vivo que responde a los cambios de osmolalidad introduce una rápida contracción y expansión y otros cambios en la forma del embrión que dificultan aún más cualquier manipulación y, en particular, manipulación automatizada de dichos materiales biológicos. Cualquier automatización debe gestionar dicha dinámica, así como gestionar una gama de diferentes tipos de embriones, movimientos de fluidos junto con una alta gama de viscosidades de fluidos. Claramente, para maximizar las posibilidades de éxito y minimizar el trauma impuesto a los materiales que se manipulan, es muy deseable reducir al mínimo absoluto la manipulación física de materiales tan delicados, lo que debería mitigar la contracción y expansión celular.

[0019] Como se indicó anteriormente, el proceso de vitrificación implica exponer un embrión o célula a concentraciones crecientes de soluciones crioprotectoras (también denominadas soluciones de equilibrio y vitrificación) para que el agua dentro de la célula se elimine y reemplace gradualmente. Las concentraciones de los fluidos, el ritmo de los cambios de concentración de fluidos que experimenta la célula, la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso y el tiempo durante el cual se lleva a cabo son variables importantes para lograr la viabilidad del embrión al final. También son importantes las tasas de transferencia de calor, tanto el enfriamiento durante la vitrificación como el calentamiento para recuperar el embrión. Finalmente, la adición de soluciones de "calentamiento" permite que los crioprotectores que ahora se encuentran dentro de la célula se eliminen y se reemplacen por agua para devolver idealmente al embrión a su estado inicial.

[0020] El documento WO2011/146998 describe un aparato para la micromanipulación de material biológico, que incluye un recipiente que tiene un depósito en el que el recipiente tiene un canal formado en una parte del depósito, y el canal incluye una restricción intermedia dimensionada para resistir el paso del material biológico. pero permite el paso de soluciones líquidas de tratamiento. El recipiente puede estar provisto de un tapón o tapa, en el que el sellado es un sello mecánico o un sello térmico químico. Alternativamente, se puede proporcionar una tapa o tapadera con una abertura despegable.

[0021] Además de la discusión anterior, hay una serie de inconvenientes con la técnica anterior, que se pueden resumir de la siguiente manera: es un proceso muy difícil y que consume mucho tiempo que requiere un(os) operador(es) muy capacitado(s). La pérdida de embriones depende únicamente de la habilidad del operador. La variación en las habilidades significa la variación en los resultados tanto en la recuperación del embrión (donde simplemente no se encuentra un embrión) como en la capacidad de supervivencia del embrión (el embrión no sobrevivió). La variación entre el entorno del laboratorio, es decir, algunos laboratorios pueden estar funcionando a 20 °C mientras que otros estarán a 30 °C, presenta problemas. Se sabe que las variaciones de temperatura o las condiciones de temperatura dadas pueden acelerar o disminuir la reacción biológica del embrión. La sobreexposición o la subexposición pueden dañar el embrión. La variación en el tiempo de procesamiento por humanos significa que algunos embriones quedan sobreexposados mientras que otros quedan subexposados, es decir, sobreexponer el embrión en la solución final por 30 segundos puede dañar el embrión. Los consumibles actuales adaptados para la vitrificación cerrada se sellan con calor y, por lo tanto, requieren un corte para recuperar la muestra. El paso difícil y lento de tomar demasiado tiempo para recuperar la muestra dañará el embrión, es decir, más de 20 segundos. En la práctica, el traslado de embriones a concentraciones crecientes de soluciones crioprotectoras se realiza en una cantidad mínima de pasos, generalmente 2 o 3, y esto expone a las células a un choque osmótico asociado con una contracción considerable y la posterior expansión de las células, con el estrés asociado que provoca en las membranas celulares y citoesqueleto.

[0022] En consecuencia, la variabilidad puede ser uno de los principales problemas con los sistemas actuales de la técnica anterior. La variabilidad de la vitrificación puede ocurrir en las siguientes áreas:

- Tipo de dispositivo de vitrificación que se utiliza. Actualmente hay más de 15 tipos en el mercado.
- Los medios que se utilizan. Actualmente hay más de 10 proveedores de medios.
- Habilidades y experiencia del embriólogo
- Protocolo (tiempo de paso, temperatura, tasa de enfriamiento, tasa de calentamiento, volumen del medio)
- Ambiente (temperatura, humedad)

[0023] Debido a la variabilidad en el ambiente, la participación humana y los protocolos han contribuido en gran medida a la falta de consistencia en la crioconservación de material biológico y las bajas tasas de embarazo resultantes.

[0024] Por lo tanto, es deseable eliminar la variabilidad proporcionando un sistema automatizado para controlar el entorno y asegurar una crioconservación repetible de materiales biológicos.

[0025] Existen 3 tipos de dispositivos de vitrificación sistema "cerrado", "semicerrado" y sistema "abierto". Un sistema "cerrado" se refiere a un sistema de vitrificación que evita el contacto directo entre LN₂ y el material biológico. Cryotip® se considera un sistema "cerrado". Un sistema "abierto" se refiere a un sistema de vitrificación que permite el contacto directo entre LN₂ y el material biológico. Fibreplug™, Cryoloop™ y Cryotop® se consideran un sistema "abierto". El problema con los sistemas abiertos es el contacto directo con la solución de refrigeración LN₂ requerida con el riesgo de transmisión de patógenos a la muestra biológica en el momento de la congelación o durante el almacenamiento. Como el material biológico está en contacto con el LN₂, la contaminación de la muestra puede ocurrir si el LN₂ está contaminado o el LN₂ puede estar contaminado si la muestra está contaminada. Muchos países han prohibido los sistemas abiertos debido al alto riesgo de contaminación de las muestras.

Ejemplo de protocolo Cryotip®.

[0026] En el ejemplo particular del sistema Cryotip®, hay una serie de pasos de proceso riesgosos que varían de naturaleza de riesgo bajo a medio a alto. Por ejemplo, en las etapas de vitrificación se incluyen los pasos de introducir el medio de equilibrio, luego el medio de vitrificación y luego la carga y la vitrificación, que generalmente toma un tiempo estimado de unos 16 minutos. Como protocolo de inicio para esta etapa, los embriones se transfieren generalmente a un máximo de dos a la vez desde la placa de cultivo hasta la gota de solución de equilibrio (ES) con un temporizador de inicio. Luego, para los medios de equilibrio, el embrión se incuba sin perturbaciones durante unos 6-10 minutos y 2 minutos antes de completarlo, se dispensan cuatro gotas de 20 ml de solución de vitrificación (VS1-4) seguidas. Al final del tiempo de equilibrio, los embriones se transfieren a una solución de vitrificación (VS), se cargan, se sellan y se sumergen en 90 segundos transfiriendo los embriones con un volumen mínimo de medio de ES a VS1 durante 5 segundos, luego se transfieren a VS2 durante 5 segundos. segundos y luego transfiera a VS3 durante 10 segundos. Luego, los pasos de alto riesgo ocurren con la carga y la vitrificación propiamente dichas, en las que se requiere conectar asépticamente el extremo ancho de un dispositivo Cryotip® a una herramienta de aspiración, como una jeringa luer, utilizando el conector Cryotip®. Cuando las muestras están listas para cargarse en la Cryotip®, la funda protectora de metal se desliza asépticamente con cuidado a lo largo de la pajilla para exponer el extremo de la punta fina. A continuación, las muestras se cargan con cuidado en el Cryotip® entre la segunda y la tercera marca mediante aspiración con el émbolo de la jeringa para controlar la absorción del medio y las muestras, teniendo cuidado de no llenar los ovocitos o embriones por encima de la tercera marca. Luego, la punta fina se sella con calor debajo de la primera marca y luego se desliza la cubierta de metal hacia abajo sobre la punta fina para protegerla. A continuación, se retiran el conector y la jeringa y se sella con calor el extremo ancho de la Cryotip® por encima de la cuarta marca. Finalmente, el Cryotip® sellado se sumerge con el lado cubierto de metal hacia abajo primero en el depósito de LN₂.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0027] Un objeto de las formas de realización descritas en este documento es superar o aliviar al menos uno de los inconvenientes mencionados anteriormente de los sistemas de la técnica relacionada o de la técnica anterior o al menos proporcionar una alternativa útil a los sistemas de la técnica anterior.

[0028] En un primer aspecto de la invención se proporciona un aparato como se define en la reivindicación 1. Las formas de realización preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-9.

[0029] El canal puede comprender además una muesca que tiene un volumen de entre aproximadamente 0,04 µl y aproximadamente 0,30 µl adaptado para retener y/o colocar un embrión dentro de al menos un mínimo de solución.

[0030] La superficie del canal expuesta al material biológico ya las soluciones de tratamiento de líquidos se trata preferiblemente en la superficie para permitir que el fluido se humedezca y se extienda sobre la superficie del canal. Además, las paredes del canal pueden comprender material polimérico y el aparato está formado por moldeo por inyección y compresión que comprende una construcción de dos partes. El polímero puede comprender polipropileno.

[0031] La construcción de dos partes puede comprender un primer molde de inyección de material polimérico y un segundo molde de inyección de material polimérico. Una de las primeras o segundas inyecciones de molde puede comprender la formación del canal.

[0032] Alternativamente, la construcción en dos partes puede comprender dos partes formadas por separado del aparato.

[0033] Preferiblemente, el grosor de la pared es de aproximadamente 0,08 mm-0,12 mm. El inventor ha descubierto que en este rango promueve una transferencia de calor rápida y lo suficientemente gruesa para evitar la transferencia de gas y líquido.

[0034] Preferiblemente, el tratamiento superficial comprende uno o una combinación de los siguientes métodos: tratamiento superficial con plasma, tratamiento corona, esterilización, tratamiento con llama o tratamiento químico.

[0035] El aparato comprende una construcción de dos partes y dos partes del aparato están adaptadas para

termosellarse con un material secundario entre las dos partes antes de un paso del proceso de vitrificación.

5 **[0036]** De nuevo, la construcción en dos partes puede comprender una primera inyección de molde de material polimérico y una segunda inyección de molde de material polimérico. Una de las primeras o segundas inyecciones de molde también puede comprender la formación del canal.

[0037] También, de nuevo alternativamente, la construcción de dos partes puede comprender dos partes formadas por separado del aparato.

10 **[0038]** En el aparato mencionado anteriormente, el material secundario permite la separación por pelado de la construcción de dos partes.

15 **[0039]** El aparato puede comprender una cápsula para acomodar dicho material biológico o una pipeta para transferir dicho material biológico.

20 **[0040]** El aparato está preferentemente adaptado para uno o una combinación de posicionamiento, conexión, localización o suministro de contacto térmico mediante asociación operativa con una disposición de imanes. Los imanes están ubicados en una estructura preexistente en la que se adapta el aparato para su inserción o movimiento. La estructura preexistente comprende uno o una combinación de un casete, un cartucho o un bote. Además, el aparato de las formas de realización preferidas está adaptado para flotar en un baño de LN₂.

[0041] La construcción de dos partes comprende material polimérico. Preferiblemente, las dos partes comprenden polipropileno y el material secundario es un laminado adaptado para evitar la entrada de LN₂ al aparato.

25 **[0042]** En otro aspecto adicional de las formas de realización descritas en el presente documento, se proporciona un sistema como se define en la reivindicación 8. En otros aspectos adicionales de la invención, se proporciona un método como se define en la reivindicación 10, un sistema como se define en la reivindicación 13 y un programa informático como se define en la reivindicación 15. Las formas de realización preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes.

30 **[0043]** La temperatura puede controlarse en un intervalo de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 40 °C. Además, la temperatura se controla preferiblemente en un intervalo de alrededor de 19°C a alrededor de 37°C.

35 **[0044]** El volumen de dispensación y aspiración de fluido puede controlarse en un rango de aproximadamente 0,1 µl a aproximadamente 15 µl con una precisión de aproximadamente 1 µl ± 0,2 µl a aproximadamente 10 µl ± 1 µl.

[0045] La dispensación de fluido y la velocidad de aspiración pueden controlarse en un rango de aproximadamente 0,01 µl/s a aproximadamente 5 µl/s.

40 **[0046]** El paso de termosellado en el método de la reivindicación 10 se puede realizar con una condición previa de detección óptica de la presencia de un consumible para contener material biológico cargado en el aparato.

45 **[0047]** Preferiblemente, los pasos son realizados por uno o una combinación de brazos robóticos independientes de un solo eje donde cada brazo robótico de un solo eje está montado en un conjunto estático donde una combinación de brazos robóticos proporciona un sistema de coordenadas global para el movimiento en al menos dos grados de libertad.

50 **[0048]** Debe tenerse en cuenta para los fines de esta descripción que el término "consumibles" se utiliza como referencia a cápsulas, pipetas, viales de medios u otros aparatos consumibles que pueden usarse en el sistema y el aparato para la micromanipulación o vitrificación de especímenes biológicos tales como embriones.

[0049] Otros aspectos y formas preferidas se describen en la memoria descriptiva y/o se definen en las reivindicaciones adjuntas.

55 **[0050]** En esencia, las formas de realización de la presente invención se derivan de la comprensión de que el proceso de vitrificación permanece sin automatizar. Los métodos actuales requieren que el embriólogo realice transferencias múltiples de ovocitos/embriones a través de diversos medios utilizando una pipeta de forma manual. Una vez que se procesa el embrión, se traslada a un dispositivo de plástico para reducir la masa térmica y permitir un enfriamiento y almacenamiento rápidos. El proceso de vitrificación requiere mucho tiempo, es tedioso y complicado. Más significativamente, la calidad de salida depende en gran medida de la habilidad del técnico. Las formas de realización de la presente invención permiten automatizar la vitrificación integrando el procesamiento del embrión y la congelación/almacenamiento en el mismo dispositivo. En una forma de realización particular, se ha desarrollado un dispositivo que permite intercambiar medios mientras se cultiva el embrión sin transferencia con pipeta. Como el dispositivo tiene muy poca masa térmica, el dispositivo se presta para ser utilizado como dispositivo de congelación/almacenamiento. Además de esto, las formas de realización de la presente invención proporcionan un consumible patentado y una estación de trabajo de instrumentos.

60

65

[0051] Las ventajas proporcionadas por la presente invención comprenden lo siguiente:

- Las pipetas modificadas y los mecanismos de control de las formas de realización preferidas entregan volúmenes de tolerancia más pequeños que proporcionan un mayor control sobre un proceso de vitrificación;
- Sellado térmico para evitar dañar los embriones;
- Los tubos de termosellado se activan selectivamente en función de la detección óptica para actuar solo sobre el casete ocupado;
- La configuración general de la máquina permite la separación de los mecanismos de sellado de los mecanismos de intercambio de solución;
- Uso de un material laminado de alta resistencia que sella contra el almacenamiento de vitrificación para brindar un fuerte sello despegable. A este respecto, ningún otro dispositivo de almacenamiento de vitrificación utiliza un sello secundario. Por lo general, están sellados entre sí y, por lo tanto, es necesario cortarlos para abrirlos. El laminado se puede sellar con material de polipropileno;
- El sello evita la entrada de LN₂ en el interior;
- La integridad del sello se mantiene a temperaturas LN₂;
- El instrumento de las formas de realización preferidas puede proporcionar un entorno controlado para garantizar un procesamiento de embriones constante en todo momento;
- Procesamiento de múltiples dispositivos de vitrificación al mismo tiempo;
- De uno a muchos dispositivos de una sola vez.

[0052] El alcance adicional de la aplicabilidad de las formas de realización de la presente invención resultará evidente a partir de la descripción detallada que se proporciona a continuación. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican formas de realización preferidas de la invención, se proporcionan únicamente a modo de ilustración, ya que varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, resultarán evidentes para los expertos en la materia de esta descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0053] La descripción adicional, los objetos, las ventajas y los aspectos de las formas de realización preferidas y otras de la presente invención pueden ser mejor entendidos por los expertos en la técnica relevante con referencia a la siguiente descripción de las formas de realización tomadas junto con las adjuntas. dibujos, que se proporcionan únicamente a modo de ilustración y, por lo tanto, no limitan la descripción del presente documento, y en los que:

La Figura 1 ilustra algunos pasos típicos del proceso de acuerdo con un flujo de trabajo de una forma de realización preferida de un instrumento de vitrificación automatizado de acuerdo con la presente invención;

La Figura 2 ilustra esquemáticamente una disposición de instrumentos de acuerdo con una forma de realización preferida;

La Figura 3 es un gráfico que ilustra un desglose de cada uno de los componentes de un instrumento de acuerdo con la presente invención;

La Figura 4 muestra un instrumento ejemplar de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención con cubiertas colocadas;

La Figura 5 muestra el módulo principal de un instrumento de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención;

La Figura 6 muestra un módulo de pipeta de acuerdo con una forma de realización de la presente invención;

La Figura 7 muestra un módulo de transferencia de tapa y termosellador de acuerdo con una forma de realización de la presente invención;

La Figura 8 muestra un conjunto de eje transversal utilizado en un instrumento de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención;

La Figura 9 muestra un cubo de transferencia LN₂ de ejemplo utilizado en formas de realización de la presente invención;

La figura 10 ilustra una pantalla de interfaz de usuario ejemplar de acuerdo con una forma de realización preferida de la presente invención;

La Figura 11 muestra una bandeja de ejemplo en funcionamiento con consumibles y medios cargados en ella de acuerdo con una forma de realización de la presente invención;

La Figura 12 muestra un ejemplo de un casete con cápsulas cargadas de acuerdo con una forma de realización de la presente invención;

La Figura 13 muestra un cartucho de medios de ejemplo de acuerdo con formas de realización de la presente invención;

La Figura 14 muestra un ejemplo de un cartucho consumible usado en formas de realización de la presente invención;

La Figura 15 muestra una cápsula y una tapa de acuerdo con una forma de realización de la presente invención;

La Figura 16 es una sección transversal en perspectiva de la cápsula de la Figura 15;

La Figura 17 es otra sección transversal en vista en perspectiva de la cápsula de la Figura 15;

La Figura 18 es una ilustración en sección transversal de la cápsula de la Figura 15 y un canal de volumen controlado de una forma de realización preferida de la presente invención;

La Figura 19 muestra un ejemplo de un bote de acuerdo con una forma de realización de la presente invención con todos los casetes cargados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- [0054]** A los efectos de esta descripción, se aplican las siguientes definiciones. El término "embrión" en este documento se refiere a un embrión, mamífero o no mamífero, que incluye, entre otros, un embrión humano en etapas que ocurren comúnmente durante el período en que los embriones pueden mantenerse en condiciones in vitro en el laboratorio, comúnmente los días 1 a 6 desde la recuperación del ovocito. El término "embrión" implica también el "ovocito", a menos que se especifique lo contrario, cuando se considera que un ovocito es un óvulo de 1 célula en metafase II no fertilizado antes de la fecundación o un ovocito en etapa GV inmaduro antes de la maduración final del ovocito. "Solución" se refiere al fluido utilizado con el propósito de crioconservación de un embrión. El término "consumible" se refiere a dispositivos desechables de bajo costo diseñados para acomodar y manipular el embrión o el ovocito para su introducción y preparación para la vitrificación como lo maneja un usuario o técnico e interfaces para instrumentación de laboratorio. Un "casete" puede ser el soporte/plataforma en el que se contienen múltiples consumibles durante el proceso de vitrificación, y que también sirve como plataforma de almacenamiento a largo plazo. Un "cartucho" se refiere a un contenedor diseñado para contener soluciones de vitrificación, desechos, tapas y/o puntas necesarias para el proceso de vitrificación y un cartucho puede diseñarse para ser de un solo uso por proceso o de un solo uso por consumible. Se considera que un "protocolo" es la secuencia de intercambios de solución, incluidos su tiempo, velocidad, temperatura y volúmenes, que preparan un embrión para el paso final de vitrificación sumergiéndolo en LN₂. "Recuperación" se refiere a una etapa en la que se localiza y recolecta un embrión que ha pasado por el proceso completo de vitrificación y calentamiento, listo para ser procesado más. "Supervivencia" se refiere a un embrión que se ha sometido al proceso completo de vitrificación y calentamiento y se ha recuperado, muestra signos claros de viabilidad celular y de desarrollo después de un período en cultivo equivalente o menor al que se utiliza actualmente para los embriones después de la criopreservación y el calentamiento. Más específicamente, para los fines de esta descripción, supervivencia significa que el embrión se considera clínicamente adecuado para procesos clínicos posteriores (tales como fertilización para ovocitos, transferencia de embriones para embriones).
- [0055]** Se puede proporcionar un instrumento y aparato para automatizar el proceso de preparación de vitrificación. El paso de vitrificación real, en el que el embrión y el fluido circundante entran en un estado vitrificado, también puede automatizarse. Además, se proporciona un consumible que permitirá que el proceso de vitrificación se lleve a cabo sin necesidad de mover el embrión una vez colocado en él, y también permite que los procedimientos de calentamiento se realicen manualmente, sin comprometer la viabilidad del embrión.
- [0056]** En promedio, una clínica de FIV de tamaño mediano puede congelar aproximadamente 800 embriones o menos cada año. Una clínica grande de FIV puede congelar hasta unos 4000 embriones u ovocitos cada año. Actualmente, el proceso incluye pasos y/o procedimientos y protocolos de tiempo crítico que requieren el control de habilidades motoras finas. La interacción del usuario prevista para esto se describe a continuación.
- [0057]** Un impulsor clave es mantener el instrumento simple. Como tal, el instrumento utiliza un eje X para mover las cápsulas de embriones (cápsulas) desde el área de carga hasta las distintas posiciones dentro del instrumento, como la posición de dispensación o la posición de sellado. Las otras funciones se mueven hacia un carro de pórtico en la dirección Z.
- [0058]** En un aspecto preferido, las formas de realización de la invención proporcionan un canal de volumen controlado que comprende una muesca para retener y/o posicionar el embrión para su procesamiento. Al hacerlo, se proporciona al divot un volumen de divot controlado, preferiblemente en el rango de aproximadamente 0,04 µl a aproximadamente 0,30 µl, que será suficiente para acomodar al menos una cantidad mínima o limitada de solución en el embrión que se puede desechar. Esto sirve para evitar que los embriones se sequen. También controla el remanente de soluciones anteriores a lo largo del procesamiento. La chuleta ayuda con el posicionamiento inicial del embrión y prevé la retención del embrión durante el intercambio de fluidos. De acuerdo con la invención, el canal comprende paredes de un espesor en el rango de alrededor de 0,01 mm a alrededor de 0,90 mm y preferiblemente de alrededor de 0,08 mm para permitir que se produzca una rápida transferencia de calor dentro de la cápsula.
- [0059]** Una función central del instrumento es completar el proceso de preparación de vitrificación y, potencialmente, también facilitar la vitrificación del embrión. Para lograrlo, los pasos principales que debe completar el instrumento en un protocolo típico se representan en la figura 1. El instrumento también puede completar otras funciones, como mantener las temperaturas de la cápsula y la solución durante todo el proceso. El instrumento, en formas de realización preferidas, realizará un intercambio de fluidos preciso con la cápsula. Nominalmente, esto sería a través de puntas de pipeta OEM estándar. El instrumento también sella la cápsula para que el sistema se convierta en un sistema 'cerrado' con respecto a la posible contaminación con LN₂. Un proceso típico de preparación de instrumentos implica que un usuario realice los siguientes pasos:
- El usuario inicia el instrumento y selecciona el protocolo
 - Llenar el cubo de LN₂ y cárguelo en el instrumento

- Cargar el cartucho de medios y el cartucho de consumibles en la fila correspondiente en la bandeja de operaciones.
- (Idealmente) Precalear la bandeja de operación a la temperatura de protocolo esperada
- Poner el embrión y 2-8 µl de solución tampón adecuada, por ejemplo, Cryobase®, en cápsulas adecuadas y colocar (si aún no lo han hecho) en Casete
- Cargar la bandeja de operaciones en el instrumento
- Cargar el casete en el instrumento:
- Presionar Iniciar

10 **[0060]** El proceso típico de descarga del instrumento implica los pasos de:

- Atender el instrumento cuando suena una alarma de advertencia
- Quitar o abrir la tapa del cubo LN₂
- Cuando suene la alarma "Descargar casete", abrir rápidamente la puerta de acceso y retirar el casete
- Sumergir rápidamente el casete en LN₂.
- A continuación, se retira el cubo de LN₂ del instrumento para transferir el casete al almacenamiento a largo plazo.

20 **[0061]** Se puede acceder a los datos registrados a través de una tarjeta SD, o su equivalente, que puede capturar información relevante para evaluar el procesamiento correcto en una fecha posterior cuando se investigan las posibles causas del calentamiento del embrión y los resultados de viabilidad. Se prevé que el personal de servicio pueda conectarse al instrumento a través de una conexión externa y una PC. Lo más probable es que esto sea a través de las interfaces RS232 o RS485 y puede haber una funcionalidad de depuración limitada disponible a través de una GUI, como apreciaría el experto en la materia.

25 **[0062]** Con referencia a la figura 5, en una forma de realización preferida, el instrumento automatizado emplea un solo eje X para mover una bandeja de operación que acomoda los embriones entre un robot de intercambio de soluciones, un robot de transferencia de tapas y selladores térmicos. El eje X mueve la bandeja de operación a la ubicación requerida para que cada una de las funciones se realice con movimiento independiente en dirección Z únicamente.

30 **[0063]** Se han considerado tres opciones básicas para la detección de los consumibles cargados, a saber, conmutación física, conmutación óptica y detección de imágenes. Un flujo de trabajo típico previsto para la detección de consumibles es el siguiente:

Detección de imágenes

- Activar para detección (ya sea un sensor de puerta o una entrada de pantalla de usuario)
- Capturar imagen de la bandeja de consumibles
- Realizar análisis de imágenes/algoritmo de detección para detectar componentes
- Verificar que los componentes estén cargados en un estado permitido
- Si todo está bien, continuar o, si no, proporcionar comentarios al usuario para corregir

Detección de conmutación óptica

- Activar para detección (ya sea un sensor de puerta o una entrada de pantalla de usuario)
- Realizar una verificación óptica en la cápsula, el cartucho de medios, la punta y la tapa.
- Verificar que los componentes estén cargados en un estado permitido
- Si todo está bien, continuar o, si no, proporcionar comentarios al usuario para corregir

50 **[0064]** Se han tenido en cuenta una serie de características clave y consideraciones de diseño para la detección de consumibles como, por ejemplo,

- Resolución adecuada (y color, si corresponde) para detectar cápsulas, cartuchos y componentes (viales, puntas, tapas)
- Detección de presencia de las partes mencionadas anteriormente
- Detección de la orientación correcta de las piezas mencionadas anteriormente
- Control de condiciones de iluminación para permitir que un algoritmo de detección 'razonable' funcione en la iluminación típica de laboratorio (es posible que no requiera que sea robusto en condiciones extremas)
- Control de brillo LED
- Efecto controlado de la iluminación externa (por ejemplo, cubiertas tintadas)

60 **[0065]** El intercambio de solución es una consideración importante y se ha contemplado como sigue. Para equilibrar los embriones, el instrumento debe dispensar con precisión en la cápsula y también eliminar la solución. El sistema Solution Exchange se proporciona para permitir que las puntas de dosificación se coloquen correctamente en cada uno de los cuatro consumibles de cápsulas y para realizar los intercambios de fluidos necesarios para el equilibrio de los embriones antes de la vitrificación. Las velocidades de dispensación de fluidos se consideran un factor importante en la presente invención y las formas de realización preferidas proporcionan un instrumento con la capacidad de tener velocidades variables de dispensación y aspiración para acomodar ovocitos y una variedad de tipos de embriones. Esta funcionalidad de velocidades de dosificación variables se correlaciona con protocolos de equilibrio variables para

ES 2 953 310 T3

proporcionar secuencias de equilibrio controlables.

[0066] El sistema puede usar características en las cápsulas para guiar la punta a la colocación correcta. Un flujo de trabajo típico anticipado para la vitrificación automatizada es

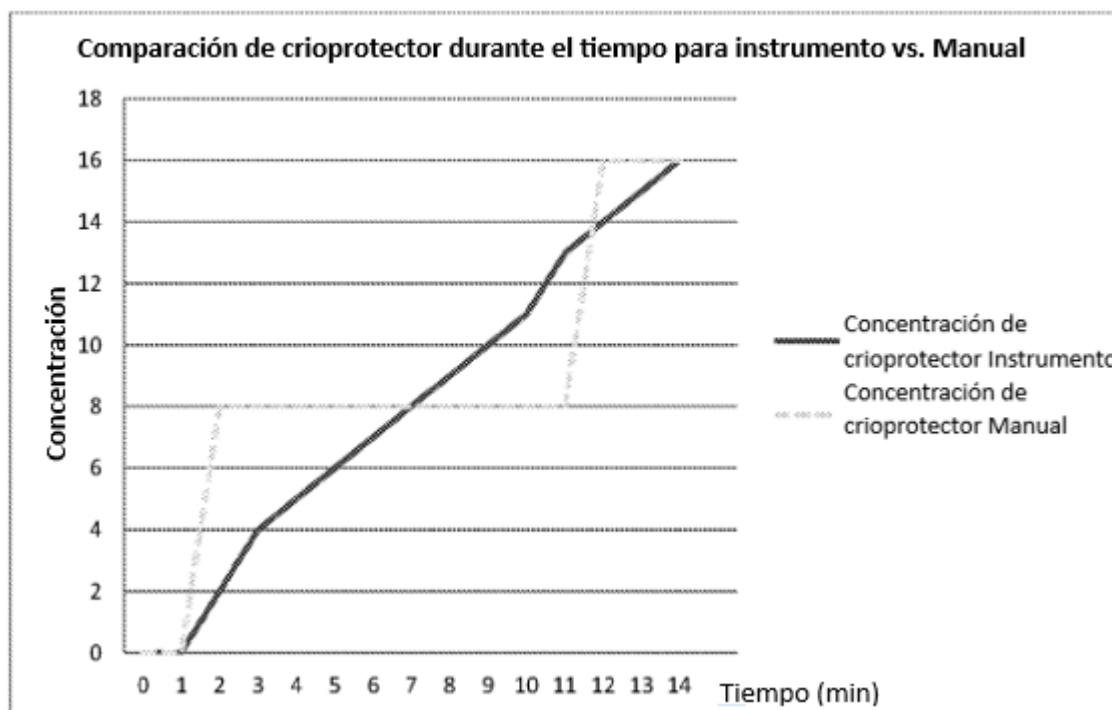
- 5 • Compruebe el instrumento para garantizar que la cápsula, el cartucho de consumibles y el cartucho de medios estén en la posición correcta
- Coloque nuevas puntas desechables estériles en el sistema de fluidica
- aspire la solución tampón de la cápsula, dejando solo el volumen requerido de aproximadamente 0,1 µL protegiendo al embrión en el divot formado, desde la ubicación deseada
- 10 • Dispense la solución drenada en un contenedor de desechos
- Solución de equilibrio de aspiración 3 (ES3)
- Dispense lentamente alrededor de 5 µL de solución de equilibrio 3 en el módulo en las ubicaciones deseadas a una velocidad de dispensación de 0,1-3,0 ul por segundo
- Espere el tiempo de protocolo requerido (4-20 minutos)
- 15 • Drene lentamente la Solución de equilibrio 3 de la cápsula, dejando solo aproximadamente 0,1 µL que protegen al embrión en la chuleta, desde la ubicación deseada
- Dispense la solución drenada en un contenedor de desechos o en la posición de desechos deseada
- Recoja la solución de vitrificación 4 (VS4)
- Dispense alrededor de 1 ml de solución de vitrificación 4 en la cápsula en la(s) ubicación(es) deseada(s)
- 20 • Espere el tiempo de protocolo requerido (30-120 seg)
- Expulse puntas del sistema
- Levante la tapa y colóquela sobre la cápsula
- Caliente la tapa en la cápsula
- Quite manual o automáticamente el casete y colóquelo en LN₂
- 25 • Coloque el casete en el tanque de crioalmacenamiento

El instrumento

- Mantendrá la esterilidad de las soluciones que ingresan a la cápsula
- 30 • Prevendrá cualquier contaminación cruzada entre embriones en la misma corrida o corridas subsiguientes
- Drenará la cápsula de aproximadamente 2ul-8ul (o hasta aproximadamente 10 µL) de solución tampón y nuevamente de VS3
- Dosificará unos 5 µL ± 15% ES3
- Dispensará alrededor de 1 µL ± 20 % VS4 La velocidad de aspiración y dispensación se controlará a 0,01 ul-2 ul por segundo
- 35 • Controlará la temperatura de procesamiento a una temperatura predeterminada. La temperatura debe ser de aproximadamente 19 a aproximadamente 37 grados.
- Usará una nueva punta estéril desechable para cada cápsula
- La interfaz de fluidica de la bomba a una punta desechable, y la punta desechable a la cápsula es una consideración. Esta interfaz debe ser confiable y permitir diferencias en la altura de inserción de la punta y las tolerancias de descentramiento de la punta (hasta aproximadamente 1,016 mm)
- 40 • El mecanismo de fluidica está adaptado para interactuar con el sistema de control electrónico
- El dispensador de fluidos está adaptado para montarse en un sistema de posicionamiento de puntas

45 **[0067]** Otra ventaja del diseño del instrumento y la cápsula es que el software puede controlar el intercambio de fluidos para aumentar gradualmente la concentración de los medios de vitrificación, lo que a su vez disminuirá el choque osmótico en el embrión y aumentará la calidad de la crioconservación, como se ve en el gráfico a continuación.

50 **[0068]** El gráfico comparativo a continuación que contrasta los medios automáticos y manuales indica el aumento de concentración de los crioprotectores.

5
10
15
20
25

30 [0069] Para realizar los pasos de intercambio de solución, el instrumento se ha adaptado para recoger puntas y después de realizar el último intercambio de solución, expulsará las puntas.

35 [0070] En una forma de realización, el sistema automatizado implementa un perfil de acero inoxidable doblado que acopla las pipetas por encima de la punta de manera que un movimiento vertical hacia arriba por el eje de la pipeta desacoplaría las puntas en un recipiente debajo. Esta forma de eliminación funciona de forma fiable. Además, se debe considerar cuidadosamente la facilidad de uso de la extracción de puntas para garantizar que sea fácil de usar y segura, de modo que el sistema dificulte que un usuario entre en contacto con las puntas o soluciones contaminadas. Con esto en mente, las formas de realización tienen interfaces con especificaciones que proporcionan lo siguiente:

- Una punta por pipeta por ejecución
- Las puntas normalmente se empujan con una fuerza de aproximadamente 10 N por punta
- Las puntas normalmente se quitan con menos fuerza de la necesaria para empujarlas
- Las puntas se deben expulsar en un recipiente fácilmente extraíble con un fondo y un costado cerrados (puede tener la parte superior abierta) para desechar las puntas de manera fácil y segura

45 [0071] El embrión o líquido vitrificado. En particular, una forma de realización preferida proporciona la transferencia de una tapa y el termosellado de la tapa a una cápsula para evitar que LN₂ entre en contacto con el embrión o el fluido de vitrificación durante la vitrificación y el almacenamiento. La Figura 7 muestra un sistema de termosellado en una forma preferida de instrumento de acuerdo con la presente invención que comprende un solo eje, para transferencia de tapa y termosellado combinados

50 [0072] El sellado mecánico tiene riesgos técnicos no mitigados que incluyen proporcionar una impermeabilidad sustancial, la congelación rápida de características estresadas requeridas para lograr un sello mecánico, y luego también hay preocupaciones sobre esas características nuevamente durante el proceso de calentamiento. Además, los espacios permitidos para las características que facilitan el sellado mecánico limitan significativamente las tasas de transferencia de calor debido al gas y los vapores de LN₂. El termosellado se realiza comúnmente, tanto con materiales de aluminio existentes como con el termosellado de una pajilla de polímero. En un ejemplo de disposición de termosellado, se colocaron ventosas para recoger la tapa dentro de un cabezal de sellado calentado. En una forma preferida, el Instrumento está adaptado para transferir una tapa desde la posición en la que está cargada, a la cápsula y esto puede realizarse mediante ventosas individuales y una fuente de vacío. El sellado de la tapa se puede lograr aplicando una presión de alrededor de 5-8 N a una temperatura nominal de alrededor de 140-175 °C durante aproximadamente 2-3 segundos. Las pruebas han demostrado que puede ser beneficioso para mantener una temperatura estable en el embrión aplicar y usar una temperatura más alta durante menos tiempo. Por el contrario, para las cápsulas esterilizadas y tratadas en la superficie, es posible que se requiera una temperatura más baja según las pruebas de integridad del sello. La temperatura óptima está en el intervalo de aproximadamente 140°C a aproximadamente 155°C. Un flujo de trabajo esperado típico para el sellado de consumibles es el siguiente:

- Precalentar cabezal de sellador térmico
- Mover los robots a la posición para recoger la tapa

- Encender la succión para asegurar la tapa al robot Z
 - Mover la tapa a la posición de la cápsula
 - Liberar tapa
 - Mover los robots a la posición para sellar la tapa durante el tiempo requerido. En una forma de realización, después de este paso, se prevé que el flujo de aire pueda invertirse para soplar aire sobre la tapa.
- 5
- Mover rápidamente los robots fuera del camino
 - Mover rápidamente el casete a la posición de descarga
 - Sonar la alarma para descarga del usuario
- 10
- [0073]** La viabilidad del embrión es sensible a la temperatura, especialmente en solución VS4. Se considera que la temperatura del embrión no debe superar los 37,5°C. En ciertas formas de realización, la temperatura de los embriones, preferiblemente, no debería aumentar más de aproximadamente 5 °C durante el período de 10 s después del sellado. Estas dos limitaciones deben considerarse cuidadosamente, ya que pueden afectar en gran medida el diseño del instrumento y el flujo de trabajo.
- 15
- [0074]** Se ha visto que la alineación del cabezal de termosellado con las cápsulas en formas de realización preferidas afecta la consistencia del sellado. Esto se ha tenido en cuenta en el diseño para que se cree un sello consistente y uniforme, incluso en el caso de una ligera desalineación en la carga de las cápsulas o el casete.
- 20
- [0075]** El instrumento debe detectar cuando una tapa no está presente en el instante antes del termosellado y no hacer contacto con esa cápsula. Esto asegurará que el sellador térmico no se contamine con el polipropileno derretido de la cápsula.
- 25
- [0076]** Un resumen de especificaciones e interfaces para el termosellado es el siguiente:
- Tiempo de sellado nominalmente alrededor de 2,5 s a 6,0 s
 - Temperatura del sello nominalmente alrededor de 140°C a alrededor de 155°C como se muestra en la prueba de integridad del sello térmico
 - Mantener la precisión de la temperatura objetivo en la cara de sellado dentro de $\pm 2,5$ °C
 - Sellar fuerza nominalmente alrededor de 0.08MPa-0.2MPa
- 30
- Detectar las tapas que faltan y evitar que el sellador térmico entre en contacto con las cápsulas desnudas
 - Atender la desalineación presente en las cápsulas/tapas sin comprometer el sello
- 35
- [0077]** Preferiblemente, se emplea un módulo Peltier o cualquier otro dispositivo de transferencia de calor termoeléctrico equivalente en las formas de realización para mantener los embriones a la temperatura del protocolo objetivo durante los pasos de equilibrio en el instrumento. Además, el Peltier puede servir preferiblemente para asociar operativamente la cápsula por medio de uno o una combinación de ubicación, proporcionando contacto térmico y conexión confiable, donde la ubicación y liberación del casete del Peltier puede ser asistida por la disposición de imanes. Estas funciones pueden aplicarse a otros consumibles. En este sentido, las cápsulas y los medios se mantienen a una temperatura determinada durante todo el protocolo. Como la temperatura ambiente en los laboratorios puede estar por encima de la temperatura mínima del protocolo, también se debe permitir el enfriamiento. La otra motivación para el enfriamiento es permitir un tiempo más corto entre protocolos de diferentes temperaturas, en lugar de depender de la difusión térmica ambiental. Para hacer esto, el Carro Transversal comprende una etapa de aluminio montada en el Robot del Eje X, usando un Peltier y un sensor de temperatura para mantener una temperatura precisa. Las cápsulas y los viales de medios tienen un buen contacto térmico con la placa de interfaz del módulo Peltier, o un contacto térmico tan bueno como se puede lograr en la práctica. En consecuencia, se considera y dispone lo siguiente:
- 40
- El instrumento está adaptado para ejecutar protocolos con un rango de temperatura entre aproximadamente 19 °C y aproximadamente 37 °C
 - El instrumento se adapta aún más para operar en entornos entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 27 °C
 - La bandeja de operación del instrumento opera dentro de aproximadamente 0-2°C de la temperatura de protocolo deseada lograda a través de medios de ajuste de temperatura controlados por software apropiados, como apreciará un experto en la técnica.
 - La temperatura del fluido en el consumible y las soluciones de vitrificación están dentro de aproximadamente 0-2°C entre sí logradas a través de medios de ajuste de temperatura controlados por software apropiados como apreciará un experto en la técnica.
 - Se puede controlar la temperatura de la cápsula, los viales de medios y las puntas de pipeta mediante el uso de al menos un módulo Peltier.
- 45
- 50
- 55
- 60
- [0078]** Se proporciona un medio de robot de eje transversal para mover el Módulo Peltier a cada posición X según lo requiera el protocolo. Esto puede ser impulsado por la decisión de diseño. Por lo tanto, el Instrumento puede tener un eje transversal que se mueve un carro a cada ubicación x según sea necesario, por ejemplo, para mover los selladores térmicos en línea con las tapas, o colocar el extremo de la punta en la cápsula para dispensar. En una forma de realización preferida, los medios del eje transversal proporcionan una precisión posicional dentro de aproximadamente 0,1 mm para satisfacer la pila de tolerancia entre el instrumento construido, una punta cargada con su descentramiento de 1,016 mm y cualquier tolerancia debida al ajuste entre las cápsulas y el carro. Esto se calcula en función del
- 65

descentramiento de puntas anterior y una acumulación de tolerancia razonable debido a las precisiones incorporadas. El medio es capaz de moverse a velocidades estimadas de hasta aproximadamente 100 mm/s. La pérdida de pasos no debe ocurrir de manera confiable o la detección de pérdida de pasos debe implementarse de manera que la pérdida de pasos no provoque una posible falla de ninguna función del instrumento. El eje transversal y el carro pueden tener muchas interfaces, algunas de las cuales se analizan con más detalle a continuación. Una interfaz crítica es entre el eje transversal y el eje Z (o pórtico, como se le puede llamar). La tecnología central depende de las precisiones posicionales que son impulsadas tanto por el eje transversal como por el eje Z. En consecuencia, el eje transversal se monta de forma segura en el chasis del instrumento. La tolerancia en esto puede ser mayor que en el eje Z siempre que el sistema de detección de consumibles pueda manejarlo. Para el mantenimiento, los componentes del eje transversal se diseñan preferiblemente para que se puedan reemplazar directamente en el instrumento o intercambiando un subconjunto.

[0079] En las formas de realización preferidas se proporciona un medio de robot de eje Z o un pórtico para mover los sistemas de intercambio de solución y sellado de consumibles en la dirección Z, a cada altura requerida por el protocolo. También se utiliza para empujar las puntas de pipeta hacia las pipetas y también para retirar las puntas de las pipetas. En general, el eje Z utiliza un motor paso a paso para impulsar un carro montado en husillo de avance/husillo de bolas. El soporte y la restricción adicionales se proporcionan al carro a través de dos cojinetes lineales montados en el lado de intercambio de soluciones de la placa del pórtico. Esto se debe a que las tolerancias son más críticas para la interacción entre la punta y la cápsula en comparación con el sellado térmico. En una forma de realización preferida, las puntas se extrajeron de las bombas dispensadoras utilizando una función de extracción de puntas unida al carro calentado. Al mover las bombas dispensadoras hacia abajo y luego el carro transversal, las puntas pueden mantenerse en su lugar con un extractor de puntas mientras se conduce un robot Dispense Axis hacia arriba para extraer las puntas desechables de los adaptadores de las bombas dispensadoras. El espacio alrededor del carro transversal y la interacción del usuario se pueden simplificar agregando un eje simple separado para mover un "quita puntas" a su lugar, lo que permite que las puntas se vuelvan a colocar en su soporte original en lugar de requerir un contenedor separado.

[0080] Para permitir la vitrificación de los embriones, se requiere nitrógeno líquido (LN₂). En la figura 9 se representa un recipiente de almacenamiento de LN₂ de ejemplo para el instrumento y se observa que se puede agregar un asa. El alojamiento para LN₂ se encuentra dentro del espacio ocupado por el instrumento, de modo que para la vitrificación manual, el baño de LN₂ está convenientemente ubicado para una inmersión rápida del casete cuando finaliza el protocolo. En una forma de realización particular, se automatiza el traslado del Casete a LN₂ para su vitrificación. En el caso de la vitrificación manual, las capacidades de LN₂ detectan la presencia y el nivel de LN₂. En el caso de vitrificación automatizada, el Instrumento preferiblemente también transfiere el Casete desde el Carro Transversal al baño LN₂. Esta transferencia puede incluir agitación según lo determinen las pruebas. El instrumento está adaptado para detectar que hay suficiente LN₂ en el baño para transferir el casete para la vitrificación de embriones al final de los pasos de equilibrio automático. Para la vitrificación manual, dependerá del usuario asegurarse en última instancia de que tiene suficiente LN₂ en un recipiente para vitrificar, pero el instrumento debe ser capaz de proporcionar información de vacío/demasiado bajo, suficiente, etc. Para la vitrificación automatizada a bordo, la detección/comprobación del nivel de LN₂ puede ser parte del rendimiento crítico, ya que si no hay suficiente LN₂ cuando el instrumento transfiere el casete, los embriones no sobrevivirán. En cualquier caso, el Instrumento está preferiblemente adaptado para realizar la verificación al comienzo del protocolo, preferiblemente cuando verifica la presencia de consumibles. El baño de LN₂ está formado para ser lo suficientemente grande y tener una evaporación controlada para que, dentro del rango del entorno operativo del instrumento (18 °C a 27 °C), el LN₂ no se evapore por debajo del nivel mínimo requerido en unos 30 minutos. Preferiblemente, el LN₂ debe estar aislado del área de carga de tal manera que un operador no pase su mano a través de los vapores de LN₂ y de modo que no sea posible hacer que los vapores de LN₂ pasen sobre los consumibles cargados o alteren la temperatura. control del carro transversal. Cualquier contenedor removible con LN₂ tendrá preferiblemente un asa por razones de OH&S. Por motivos de seguridad similares, el material elegido es preferiblemente capaz de resistir el choque térmico repetido de estar a temperatura ambiente y verter LN₂ en él. Un producto preferido se fabrica a partir de HDPE.

[0081] Para reducir el tamaño de un baño que puede durar 30 minutos, varios factores pueden reducir la tasa de evaporación de LN₂. A este respecto, las propiedades de aislamiento del propio baño probablemente tengan el mayor efecto. Además, la adición de una tapa reducirá aún más la tasa de evaporación del LN₂. En resumen, el alojamiento de la instrumentación para LN₂ se puede resumir de la siguiente manera:

- Debe almacenar suficiente LN₂ para durar unos 30 minutos en un ambiente entre unos 18 °C y unos 27 °C
- Se adapta al chasis y las cubiertas del instrumento
- La geometría asegura que después de unos 30 minutos, todas las cápsulas en un casete permanezcan sumergidas
- Incluye una tapa para usar fuera del instrumento
- Incluye un asa por razones de seguridad y salud ocupacional al transportar el contenedor con LN₂ en él.

[0082] Todos los conjuntos de subsistemas de la instrumentación se montan en un chasis. Los subsistemas se ubican preferiblemente con precisión, ya que cualquier desalineación puede agregarse para crear una desalineación en la cápsula. Esto podría tener graves consecuencias, como la colocación incorrecta de la punta en la cápsula o la falta de alineación de las tapas de las cápsulas.

[0083] Una forma de realización preferida ha incorporado un submódulo que aísla todos los sistemas involucrados en operaciones de alta precisión. Estas operaciones críticas involucran interacciones entre elementos en el Carro Transversal y cualquiera de los sistemas de Intercambio de Solución o Sellado de Consumibles. Para minimizar los requisitos de composición para las tolerancias, se proporciona un módulo transversal y de "pórtico" combinado que se puede ensamblar en el chasis principal. El chasis principal puede tener tolerancias "estándar" para el ajuste general de los componentes. En una forma de realización preferida, las dimensiones y el peso del instrumento corresponden a unas dimensiones máximas de unos 750 mm de ancho x unos 700 mm de profundidad x unos 600 mm de alto con un peso máximo de unos 45 kg.

[0084] Como una interfaz de usuario adecuada, se usa una pantalla táctil a color para el control del instrumento por parte del usuario, por ejemplo, una pantalla táctil LCD. La figura 10 muestra capturas de pantalla de ejemplo de una GUI en una forma de realización preferida. Si bien otras opciones de visualización pueden proporcionar la funcionalidad, se considera que las expectativas actuales del mercado exigen una pantalla táctil a color para controlar un instrumento de este nivel de tecnología y una GUI incorpora dicha interfaz de usuario. En una forma de realización preferida, la GUI comprende una pantalla de 5,7", mientras que otras formas de realización implican diferentes tamaños de pantalla, como una pantalla de 4,3". Se consideran adecuadas las pantallas táctiles resistivas y capacitivas. Se proporciona una pantalla táctil resistiva en una forma de realización preferida sobre la base de su competitividad y tiempo de desarrollo. Por lo general, no se permiten alcohol ni sustancias aromáticas en los laboratorios clínicos y, por lo general, solo se permiten agua y jabón suave para la limpieza, por lo que no existe un requisito específico para una cubierta de vidrio sobre la pantalla, pero se puede proporcionar.

[0085] El registro de datos puede ocurrir de dos formas. Un nivel de registro es tal que solo el personal de servicio tendrá acceso a él y registrará datos detallados del instrumento para cada ejecución de protocolo. El otro nivel de registro registrará los datos relevantes para confirmar los detalles del protocolo utilizado para un embrión calentado en una fecha posterior, incluida la confirmación de la función del instrumento de alto nivel (por ejemplo, la temperatura del carro). Estos "registros" pueden rastrearse mediante un identificador único y un sello de fecha y hora.

[0086] En general, el instrumento en las formas de realización preferidas está diseñado de acuerdo con un estándar apropiado como, por ejemplo, 'ANSI/AAMI/IEC 62366:2007 Dispositivos médicos - Aplicación de la ingeniería de usabilidad a dispositivos médicos' utilizando la guía del estándar, 'ANSI/AAMI HE75:2009 Ingeniería de factores humanos - Diseño de dispositivos médicos'.

[0087] Con respecto a las consideraciones de seguridad, en formas de realización preferidas, el instrumento seguirá el estándar internacional IEC 61010 o el equivalente según lo dictan los requisitos reglamentarios. Se puede realizar un análisis de peligros para identificar las áreas que requieren atención para aumentar la seguridad.

[0088] Todos los subconjuntos que tienen componentes que pueden desgastarse o fallar se han diseñado teniendo en cuenta un nivel apropiado de reemplazo. Por ejemplo, Peltiers puede fallar o los rodamientos o las guías pueden desgastarse, lo que puede provocar una falla. Donde sea práctico, estos han sido diseñados para ser reemplazados con relativa facilidad.

Consumibles y accesorios

[0089] La cápsula permite el intercambio automatizado de fluidos y la vitrificación de un embrión. Los embriones suelen tener aproximadamente entre 50 y 300 μm de diámetro, aunque durante el proceso pueden colapsar y volver a expandirse, por lo que a veces son mucho más pequeños que esto. El proceso de vitrificación requiere que el embrión se exponga a varias soluciones durante períodos específicos y a temperaturas específicas para reemplazar el agua dentro y alrededor de la(s) célula(s) embrionaria(s) con crioprotectores para eliminar o reducir el daño debido a la criopreservación y, como se señaló anteriormente, el daño típico se debe a los cristales de hielo. De acuerdo con la presente descripción, el dispositivo de cápsula evita que el embrión se extraiga con fluido aspirado pero permite que tenga lugar el intercambio de fluido y permite altas tasas de transferencia de calor en un sistema 'cerrado'. Un sistema 'cerrado' en este caso se refiere a un sistema de vitrificación que evita el contacto directo entre LN_2 y el embrión. Las Figuras 15 a 18 ilustran una cápsula típica de acuerdo con formas de realización preferidas de la presente invención. Esencialmente, la cápsula en estas formas de realización comprende tres componentes, a saber, un portador para soporte, una tapa y un canal. El canal incluye una muesca para acomodar el embrión de muestra, que se describe en la especificación PCT publicada No. WO 2011/146998. El diseño de cápsula preferido tiene las siguientes características:

- Permita una carga fácil mediante una región de colocación de embriones claramente identificable en virtud del divot, como se muestra en la figura 18
- Puede ser ópticamente transparente con el fin de ayudar al operador a localizar el embrión
- Puede tener una superficie humectable para permitir el intercambio de fluidos sobre el embrión
- Sellado herméticamente para evitar la contaminación por LN_2
- Permitir una tasa de vitrificación y calentamiento superior a unos 7000 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
- Minimice el arrastre de soluciones (p. ej., entre la solución tampón y la solución de equilibrio, y entre la solución de equilibrio y la solución de vitrificación)

- Trabaja para diferentes tipos y edades de desarrollo y etapas de embriones. Por ejemplo, debe funcionar para embriones humanos, pero también debe funcionar para embriones de ratón debido a los requisitos de desarrollo, y debe tener al menos potencial (en espera de una mayor optimización del protocolo) para embriones de otras especies de mamíferos y no mamíferos. Puede funcionar para ovocitos hasta blastocistos completamente eclosionados
- Cumplir con la tasa de recuperación y supervivencia según los procesos manuales cerrados actualmente establecidos
- Permite vitrificar un embrión y hasta dos ovocitos en el mismo recipiente cuando se utiliza con embriones humanos
- Permitir el calentamiento y el reequilibrio del embrión y el ovocito
- La cápsula debe ser abierto fácilmente por un usuario
- La cápsula debe permitir encontrar fácilmente el embrión después del calentamiento. Esto también dicta que la cápsula tenga una buena claridad óptica y no tenga una geometría que obstruya la visualización del embrión.
- La cápsula se puede esterilizar entre aproximadamente 20 kGy y aproximadamente 35 kGy (nominalmente 25 kGy)
- La cápsula permitirá el termosellado al material laminado de aluminio/polipropileno. Esto requiere que la cara de sellado de la cápsula sea de polipropileno/polietileno
- Sellado térmico pelable en comparación con el sellado térmico destructivo

[0090] Las funciones anteriores se realizan a pesar de la complejidad añadida de que los embriones son células vivas, muy pequeñas (alrededor de 50-300 pm), frágiles, no fácilmente disponibles, cambian de forma durante el proceso, flotan y son muy sensibles, etc.

[0091] En una forma de realización preferida, se almacenan cuatro cápsulas en un casete, que también sirve como contenedor de almacenamiento final para ser colocado en tanques de LN₂, sin reducir la capacidad de almacenamiento actual en los tanques de almacenamiento de LN₂ o líquido o vapor LN₂. Las cápsulas también están adaptadas para encajar en el pozo del carro transversal para que haya una transferencia de calor adecuada para mantener un buen control de la temperatura durante el procesamiento.

[0092] Preferiblemente, el canal de cápsula se fabrica por separado y podría combinarse en una sola pieza unitaria. Las cápsulas están adaptadas para encajar en el carro transversal para que haya una transferencia de calor adecuada para mantener un buen control de la temperatura durante el procesamiento. El canal es humectable mediante tratamiento superficial u otras modificaciones. Se probaron muchos tratamientos de superficie, incluidos, entre otros, tratamiento con llama, tratamiento químico, corona y plasma. La cápsula se trata preferentemente mediante tratamiento con plasma. La claridad óptica del Canal es relevante para su usabilidad. El Canal está adaptado para sellar al Portador para ser impermeable a LN₂. El volumen máximo de líquido que se puede agregar a una cápsula es de aproximadamente 55µL. El Portador es la parte de la cápsula que llevará la etiqueta y proporcionará los medios para manejar el Canal. En este sentido, proporciona espacio para LN₂, etiquetado de prueba y una superficie adecuada. El soporte se fija al casete a temperatura ambiente hasta aproximadamente -196 °C y puede retirarse en el mismo rango de temperatura.

[0093] En general, la tapa contendrá un sellado térmico laminado de aluminio/polipropileno como se mencionó anteriormente, y se sellará al canal de la cápsula y al portador. La tapa está diseñada de tal manera que se quita fácilmente al calentarse para agregar rápidamente las soluciones de reequilibrio.

[0094] Un casete es la parte que puede contener cualquier número adecuado, preferiblemente hasta cuatro, cápsulas a la vez y se muestra un ejemplo en la figura 12. Es un reemplazo de los 'bastones' que se usan en los sistemas actuales para almacenar múltiples vitrificaciones. dispositivos como ganchos, Cryotop®, pajuelas, etc. del mismo paciente en los tanques de almacenamiento de LN₂ o vapor. El casete incluye preferiblemente un mango que permite que un usuario sostenga el casete para vitrificar los embriones en las cápsulas. El casete también está equipado para tener un área adecuada para un código de barras y otra identificación. En una forma, el casete está adaptado para que alguna forma de identificación pueda leerse desde arriba de un bote lleno de casetes, como se muestra en la figura 12. El casete tiene preferiblemente las siguientes características:

- La carga y descarga de una cápsula es fácil e intuitiva, en virtud del diseño característico de la forma del portador de la cápsula.
- Es fácil sumergir y agitar rápidamente el Casete en LN₂ sin que el usuario se queme los dedos.
- Al intentar recuperar un Casete en particular del almacenamiento, un usuario querrá poder identificar ese Casete sin quitar otros Casetes de un Recipiente u otra forma de almacenamiento.
- Necesita ajustarse a un paso de aproximadamente 28,5 mm

[0095] Con referencia a las interfaces con las cápsulas, las cápsulas están adaptadas para una fácil inserción en el casete a temperatura ambiente. Cuando se cargan en el instrumento, las cápsulas pueden moverse para ubicarse en el carro en lugar de estar restringidas por el casete. Las cápsulas se pueden quitar con LN₂ o vapores y no se caen fácilmente del casete. Para permitir una extracción constante de la cápsula del casete, se aplica una fuerza repetible mediante imanes adecuadamente colocados que están adaptados para ejercer una intensidad de campo magnético

de magnitud dada sobre el metal ferroso que reside en la cápsula. Con este fin, los imanes se colocan preferiblemente en ubicaciones distribuidas dentro de los casetes. El casete interactúa con el instrumento a través del carro y con un recipiente almacenado. Además, el casete se puede quitar fácilmente del recipiente mientras se mantienen todos los embriones dentro de LN₂ o vapor. La cápsula puede diseñarse con suficiente flotabilidad para flotar en caso de que se separara del casete en el tanque de LN₂.

[0096] Con referencia a la figura 14, se proporciona una bandeja de consumibles para viales de soluciones de vitrificación, desechos y puntas de pipeta. Se asienta sobre un banco o placa caliente y permite la transferencia de calor a través de la cápsula y las soluciones. También se maneja fácilmente y se carga con facilidad y precisión en su posición en el carro calentado. Las cápsulas están ubicadas en la bandeja de consumibles por el ajuste del casete y también canalizan características en la bandeja de consumibles que ayudan a la transferencia de calor a las soluciones dentro de la cápsula. Los viales encajan perfectamente en la bandeja de consumibles por razones de ubicación y transferencia de calor.

[0097] La bandeja de consumibles también está adaptada para permitir que los consumibles pasen por debajo de las diversas estaciones a una altura de espacio libre baja para reducir los recorridos del eje Z para cada estación. Sin embargo, las puntas son preferiblemente mucho más altas que los otros componentes. Teniendo en cuenta este requisito y el requisito de descansar plano sobre un banco, la bandeja se ha diseñado con un soporte de punta flotante para que pueda descansar alto cuando está en un banco o placa caliente, y descansar bajo dentro de un corte cuando se carga en el instrumento. Las puntas se pueden cargar empujando el eje de dosificación hacia abajo contra las puntas contra su soporte en la bandeja de consumibles. La fuerza para recoger las puntas es de unos 60-100 N (6-10 kg) verticalmente hacia abajo. La bandeja está adaptada para ajustarse a un paso de aproximadamente 28,5 mm y está adaptada para encajar positivamente en el instrumento con una altura máxima total de aproximadamente 60 mm.

[0098] Un cartucho de medios puede estar provisto de características que incluyen las siguientes. Está adaptado para contener al menos dos viales de fluido de forma extraíble y estéril. El cartucho de medios está adaptado para ajustarse a un paso de aproximadamente 28,5 mm. Puede maximizar el intercambio de calor a los viales de medios y está adaptado para un acoplamiento positivo de los viales de medios. Se pueden proporcionar viales de medios que contengan un mínimo de aproximadamente 100 µL de solución y se determinen según lo que sea adecuado para la producción de medios y la vida útil.

[0099] Se proporciona un cartucho de punta con las siguientes características. La fuerza necesaria para recoger las puntas es de unos 60-100 N (6-10 kg) verticalmente hacia abajo. El cartucho de punta contiene al menos un vial de residuos transparente para la verificación de embriones posterior al protocolo y contiene al menos una punta de pipeta estéril. Contiene al menos una tapa termosellable estéril y se ajusta a un paso de aproximadamente 28,5 mm. Minimiza el volumen de almacenamiento de componentes secos. También permite retirar la punta de vuelta al consumible/desechable para su eliminación.

[0100] Se proporciona una punta dispensadora y es preferible una punta OEM. En una forma de realización se ha utilizado la punta filtrada Axygen™ TF300 de 10 ml. Las características y consideraciones de diseño para la punta de dosificación incluyen que la punta tiene un extremo distal fino de modo que pueda caber dentro del canal de la cápsula, lo que permite tolerancias de la cápsula, la punta y el instrumento. La punta está adaptada para contener un mínimo de unos 10 µL y debe filtrarse. También es preferible que la punta dispensadora esté adaptada para interactuar con puntas de pipeta.

[0101] Con referencia a la figura 14, se proporcionan botes para su uso como contenedores para contener una serie de casetes en tanques de almacenamiento o dewar. Los sistemas actuales utilizan recipientes para contener bastones, que luego contienen una serie de pajitas u otros dispositivos de vitrificación. En esta realización, los recipientes ejemplares están diseñados para los siguientes sistemas: tanques de almacenamiento LN₂; Tanques de almacenamiento en fase de vapor LN₂, cargadores secos y sistemas de almacenamiento Dewar.

[0102] Con respecto al Dewar Storage, hay capacidad para 16 cañas pequeñas de 3 a 6 embriones cada una, o alternativamente 4 cañas grandes de 7 embriones cada una. La capacidad del recipiente es equivalente a unos 20 pacientes, es decir, 76 embriones, lo que equivale a la capacidad total. Con respecto al almacenamiento del tanque, hay capacidad para 16 cañas pequeñas de 3 embriones cada una, o alternativamente 10 cañas grandes de 7 embriones cada una. La capacidad del recipiente es equivalente a unos 26 pacientes, es decir, 118 embriones. Con una pila de 2 recipientes hay una capacidad equivalente a unos 52 pacientes, es decir, 236 embriones.

[0103] Se ha identificado una necesidad potencial de una herramienta de extracción de cápsula para ayudar a retirar la cápsula de un casete mientras todavía está en LN₂ o vapores. Esto solo sería necesario si la extracción de las cápsulas es difícil en los diseños de cápsula y casete. Sin embargo, por el contrario, es preferible utilizar el sistema de posición del imán como se ha descrito anteriormente.

[0104] Como referencia, se ha observado que debido al aumento de la rigidez de los plásticos a temperaturas criogénicas, las características que normalmente están diseñadas para flexionarse para engancharse y liberación ya no pueden hacerlo bajo una fuerza cómoda para el usuario.

[0105] Aunque esta invención se ha descrito en relación con formas de realización específicas de la misma, se entenderá que es capaz de modificación(es) adicional(es). El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

[0106] Cabe señalar que cuando se usan los términos "servidor", "servidor seguro" o términos similares en este documento, se describe un dispositivo de comunicación que puede usarse en un sistema de comunicación, a menos que el contexto requiera lo contrario, y no debe ser interpretado para limitar la presente invención a cualquier tipo particular de dispositivo de comunicación. Por lo tanto, un dispositivo de comunicación puede incluir, sin limitación, un puente, enrutador, puente-enrutador (enrutador), conmutador, nodo u otro dispositivo de comunicación, que puede ser seguro o no.

[0107] También se debe señalar que cuando se usa un diagrama de flujo en el presente documento para demostrar varios aspectos de la invención, no se debe interpretar como que limita la presente invención a ningún flujo lógico o implementación lógica particular. La lógica descrita puede dividirse en diferentes bloques lógicos (por ejemplo, programas, módulos, funciones o subrutinas) sin cambiar los resultados generales.

[0108] Varias formas de realización de la invención pueden incorporarse en muchas formas diferentes, incluida la lógica del programa informático para su uso con un procesador (p. ej., un microprocesador, un microcontrolador, un procesador de señales digitales o una computadora de uso general y, en realidad, cualquier procesador comercial puede utilizarse para implementar las formas de realización de la descripción, ya sea como un solo procesador, un conjunto de procesadores en serie o en paralelo en el sistema y, como tales, los ejemplos de procesadores comerciales incluyen, entre otros, Merced™, Pentium™, Pentium II™, Xeon™, Celeron™, Pentium Pro™, Efficeon™, Athlon™, AMD™ y similares), lógica programable para usar con un dispositivo de lógica programable (p. ej., una matriz de puerta programable en campo (FPGA) u otro PLD), componentes discretos, circuitos integrados (por ejemplo, un circuito integrado de aplicación específica (ASIC)), o cualquier otro medio que incluya cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización ejemplar de la presente invención, predominantemente toda la comunicación entre los usuarios y el servidor se implementa como un conjunto de instrucciones de programas informáticos que se convierten en un formato ejecutable por computadora, almacenado como tal en un medio legible por computadora, y ejecutado por un microprocesador bajo el control de un sistema operativo.

[0109] La lógica del programa informático que implementa la totalidad o parte de la funcionalidad que se describe en el presente documento puede incorporarse de varias formas, incluida una forma de código fuente, una forma ejecutable por computadora y varias formas intermedias (p. ej., formas generadas por un ensamblador, compilador, enlazador o localizador). El código fuente puede incluir una serie de instrucciones de programas informáticos implementadas en varios lenguajes de programación (p. ej., un código objeto, un lenguaje ensamblador o un lenguaje de alto nivel como Fortran, C, C++, JAVA o HTML). Hay cientos de lenguajes informáticos disponibles que se pueden usar para implementar formas de realización de la invención, entre los más comunes se encuentran Ada, Algol, APL, awk, Basic, C, C++, Conol, Delphi, Eiffel, Euphoria, Forth, Fortran, HTML; Icon; Java; Javascript; Lisp; Logo; Mathematica; MatLab; Miranda; Modula-2; Oberon; Pascal; Perl; PL/I; Prolog; Python; Rexx; SAS; Scheme; sed; Simula; Smalltalk; Snobol; SQL; Visual Basic; Visual C++; Linux y XML.) para usar con varios sistemas operativos o entornos operativos. El código fuente puede definir y utilizar varias estructuras de datos y mensajes de comunicación. El código fuente puede estar en un formato ejecutable por computadora (por ejemplo, a través de un intérprete), o el código fuente puede convertirse (por ejemplo, a través de un traductor, ensamblador o compilador) en un formato ejecutable por computadora.

[0110] El programa de computadora puede fijarse en cualquier forma (por ejemplo, forma de código fuente, forma ejecutable por computadora o una forma intermedia) ya sea de forma permanente o transitoria en un medio de almacenamiento tangible, como un dispositivo de memoria semiconductor (por ejemplo, una memoria RAM, ROM, PROM, EEPROM o Flash-Programmable RAM), un dispositivo de memoria magnética (p. ej., un disquete o disco fijo), un dispositivo de memoria óptica (p. ej., un CD-ROM o DVD-ROM), una tarjeta de PC (p. ej., tarjeta PCMCIA) u otro dispositivo de memoria. El programa de computadora puede fijarse en cualquier forma en una señal que se pueda transmitir a una computadora utilizando cualquiera de las diversas tecnologías de comunicación, incluidas, entre otras, tecnologías analógicas, tecnologías digitales, tecnologías ópticas, tecnologías inalámbricas (por ejemplo, Bluetooth), tecnologías de red y tecnologías de interconexión de redes. El programa de computadora se puede distribuir de cualquier forma como un medio de almacenamiento extraíble con la documentación impresa o electrónica que lo acompaña (p. ej., software retractilado), precargado con un sistema informático (p. ej., en la ROM del sistema o en un disco fijo), o distribuido desde un servidor o tablón de anuncios electrónico sobre el sistema de comunicación (por ejemplo, Internet o World Wide Web).

[0111] La lógica de hardware (incluida la lógica programable para su uso con un dispositivo lógico programable) que implementa la totalidad o parte de la funcionalidad donde se describe en este documento puede diseñarse usando métodos manuales tradicionales, o puede diseñarse, capturarse, simularse o documentarse electrónicamente usando varias herramientas, como el diseño asistido por computadora (CAD), un lenguaje de descripción de hardware (p. ej., VHDL o AHDL) o un lenguaje de programación PLD (p. ej., PALASM, ABEL o CUPL). La lógica de hardware también puede incorporarse en pantallas de visualización para implementar formas de realización de la invención y que pueden

ser pantallas de visualización segmentadas, pantallas de visualización analógicas, pantallas de visualización digital, CRT, pantallas LED, pantallas de plasma, pantalla de diodo de cristal líquido y similares.

5 **[0112]** La lógica programable se puede fijar de forma permanente o transitoria en un medio de almacenamiento tangible, como un dispositivo de memoria semiconductor (p. ej., una RAM, ROM, PROM, EEPROM o RAM programable Flash), un dispositivo de memoria magnética (p. ej., un disquete o disco fijo), un dispositivo de memoria óptica (por ejemplo, un CD-ROM o DVD-ROM), u otro dispositivo de memoria. La lógica programable se puede fijar en una señal que se puede transmitir a una computadora utilizando cualquiera de las diversas tecnologías de comunicación, incluidas, entre otras, tecnologías analógicas, tecnologías digitales, tecnologías ópticas, tecnologías inalámbricas (por ejemplo, Bluetooth), tecnologías de red y tecnologías de interconexión de redes. La lógica programable se puede distribuir como un medio de almacenamiento extraíble con documentación impresa o electrónica adjunta (p. ej., software retractilado), precargado con un sistema informático (p. ej., en la ROM del sistema o en un disco fijo) o distribuido desde un servidor o tablón de anuncios electrónico. a través del sistema de comunicación (por ejemplo, Internet o World Wide Web).

15 **[0113]** "Comprende/que comprende" e "incluye/que incluye" cuando se usa en esta especificación se toma para especificar la presencia de características, números enteros, pasos o componentes establecidos, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, números enteros, pasos, componentes o grupos de los mismos. Por lo tanto, a menos que el contexto claramente requiera lo contrario, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, las palabras 'comprende', 'que comprende', 'incluye', 'incluyendo' y similares deben interpretarse en un sentido inclusivo en oposición a un exclusivo o sentido exhaustivo; es decir, en el sentido de "incluyendo, pero no limitado a".

REIVINDICACIONES

1. Aparato para micromanipulación y crioconservación de material biológico, comprendiendo el material biológico un embrión u ovocito, comprendiendo dicho aparato un recipiente que tiene un reservorio en el que dicho recipiente tiene un canal formado en una porción de dicho reservorio, comprendiendo dicho canal una restricción intermedia dimensionada resistir el paso de dicho material biológico pero permitir el paso de soluciones líquidas de tratamiento, en el que el canal comprende paredes de un espesor en el rango de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 0,90 mm, en el que el aparato comprende una construcción de dos partes que comprende material polimérico, en el que dos partes del aparato están adaptadas para termosellarse con un material secundario intermedio entre las dos partes antes de un paso del proceso de vitrificación, y en el que el material secundario permite la separación por pelado de la construcción de dos partes.
2. Aparato según la reivindicación 1, en el que las dos partes comprenden polipropileno y el material secundario es un laminado adaptado para evitar la entrada de LN₂ en el aparato.
3. Aparato según la reivindicación 1 o 2, en el que el canal es un canal de volumen controlado que comprende una muesca para retener y/o posicionar un embrión para su procesamiento.
4. Aparato según la reivindicación 1 o 2, en el que el canal comprende además una muesca que tiene un volumen de entre aproximadamente 0,04 µl y aproximadamente 0,30 µl adaptado para retener y/o colocar un embrión dentro de al menos un mínimo de solución.
5. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la superficie del canal expuesta a material biológico y soluciones líquidas de tratamiento se trata superficialmente para permitir que el fluido humedezca y se extienda sobre la superficie del canal.
6. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grosor de la pared está en el intervalo de aproximadamente 0,01 mm a aproximadamente 0,12 mm.
7. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el grosor de la pared está en el intervalo de aproximadamente 0,08 mm a aproximadamente 0,12 mm.
8. Un sistema que comprende:
 el aparato de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y
 una combinación de brazos robóticos independientes de un solo eje, en la que cada brazo robótico de un solo eje está montado en un conjunto estático, y en la que la combinación de brazos robóticos proporciona un sistema de coordenadas global para el movimiento del aparato en al menos dos grados de libertad, dicho sistema estando adaptado para manejar el aparato a través de al menos dos de los siguientes pasos del proceso:
 carga de embriones;
 equilibrio;
 termosellado;
 vitrificación.
9. El sistema de la reivindicación 8, en el que el sistema está configurado para emplear un solo eje para mover una bandeja operativa que acomoda el aparato entre un robot de intercambio de solución, un robot de transferencia de tapa y selladores térmicos.
10. Un método de micromanipulación y crioconservación de un embrión para ser usado en procedimientos de fertilización in vitro utilizando un aparato como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, comprendiendo el método los pasos de:
 cargar el embrión en el aparato en una solución tampón;
 reemplazar la solución tampón con una solución de equilibrio a un caudal predeterminado;
 equilibrar el embrión cargado en la solución de equilibrio durante un período de tiempo de equilibrio predeterminado;
 reemplazar la solución de equilibrio con una solución de vitrificación a un caudal predeterminado;
 termosellado del aparato;
 sumergir el aparato en un baño líquido refrigerante.
11. El método de la reivindicación 10, donde el paso de termosellado se realiza con una condición previa de detección óptica de la presencia de un consumible para contener el material biológico cargado en el aparato.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que la velocidad de dispensación y aspiración de fluido para reemplazar las soluciones se controla en un intervalo de aproximadamente 0,01 µl/s a aproximadamente 5 µl/s.
13. Sistema adaptado para micromanipular material biológico que utiliza un aparato como se reivindica en cualquiera

de las reivindicaciones 1 a 7, dicho sistema de micromanipulación incluye:

medios procesadores adaptados para operar de acuerdo con un conjunto de instrucciones predeterminado, dicho sistema de micromanipulación, junto con dicho conjunto de instrucciones, estando adaptado para controlar el tiempo, la temperatura, los volúmenes de dispensación y la velocidad del flujo involucrados en la realización de los pasos del método según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.

5

14. Sistema de micromanipulación según la reivindicación 13, en el que el conjunto de instrucciones predeterminadas comprende un software informático adaptado para controlar un intercambio de fluidos para permitir un aumento gradual en la concentración de la solución de vitrificación para disminuir un choque osmótico en el embrión y aumentar la calidad de la crioconservación.

10

15. Un programa de computadora que comprende instrucciones que, cuando se ejecutan en un procesador de computadora configurado para operar el sistema de micromanipulación de la reivindicación 13 o 14, hacen que el sistema de micromanipulación lleve a cabo los pasos del método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde las instrucciones son adaptado para controlar el intercambio de fluidos en el aparato para permitir un aumento gradual en la concentración de la solución de vitrificación para disminuir un choque osmótico al embrión y aumentar la calidad de la crioconservación.

15

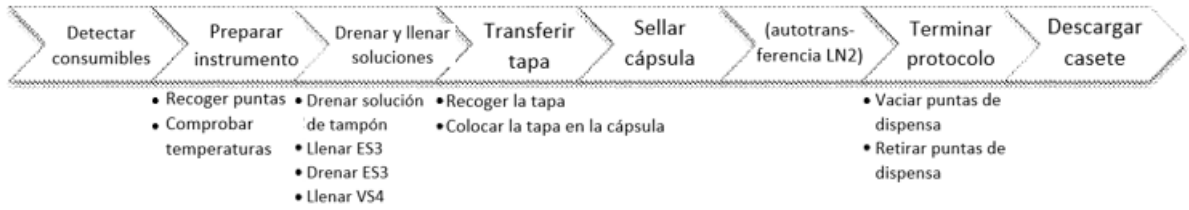


Figura 1 Flujo de trabajo de los instrumentos de vitrificación automatizada

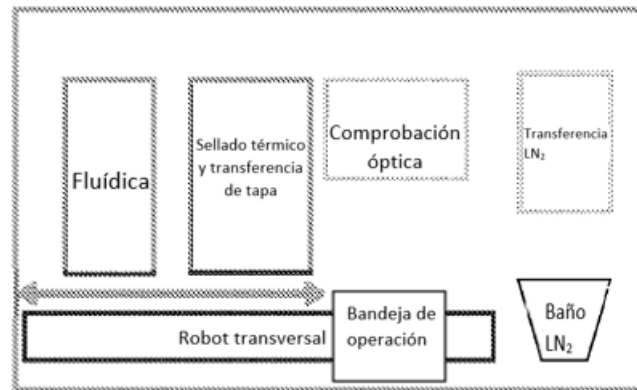


Figura 2 Diagrama de la configuración de los instrumentos

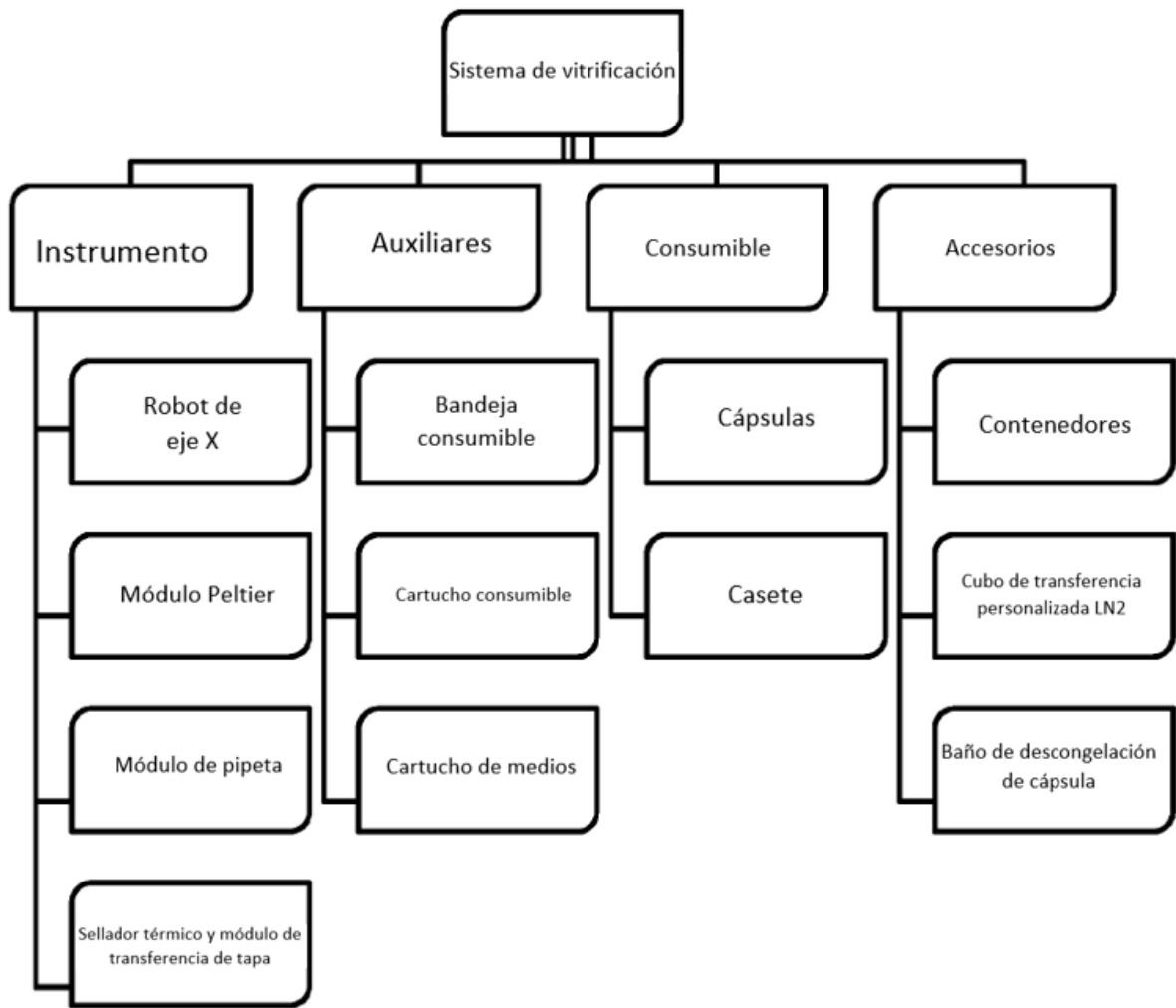


Figura 3 Diagrama de instrumentos con el desglose de cada componente

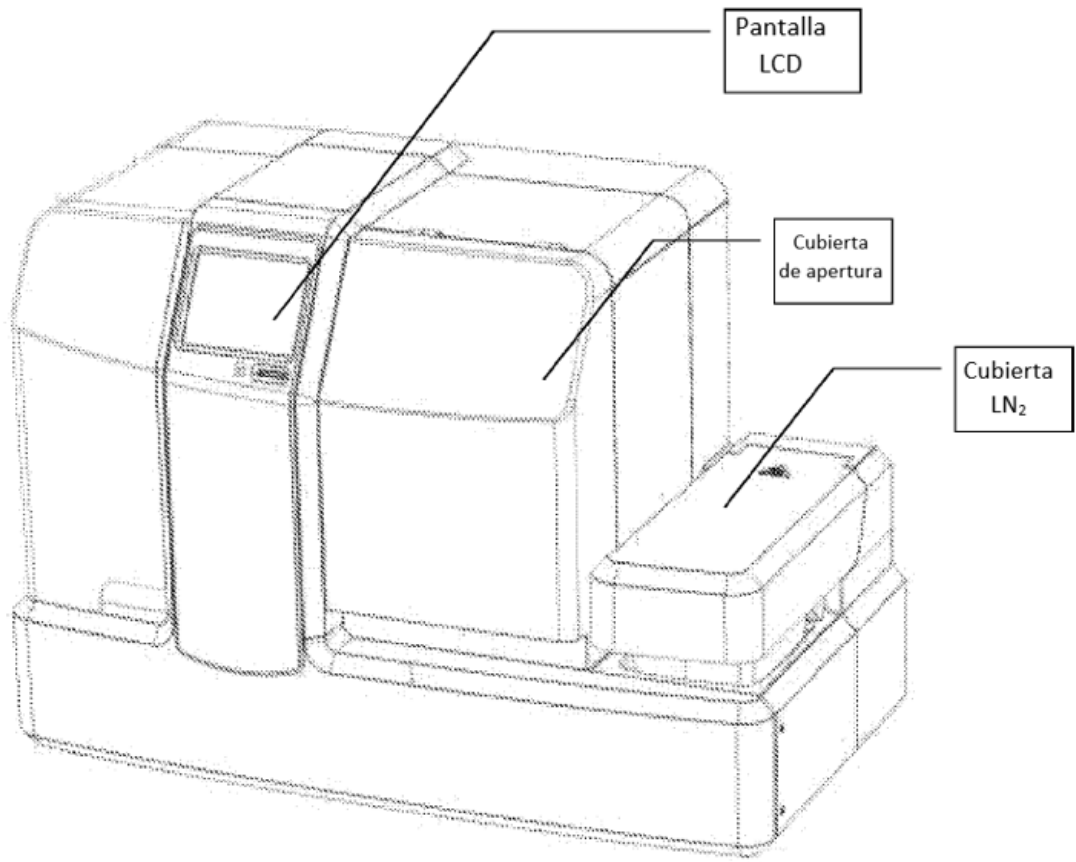


Figura 4 Ilustración del instrumento con cubiertas

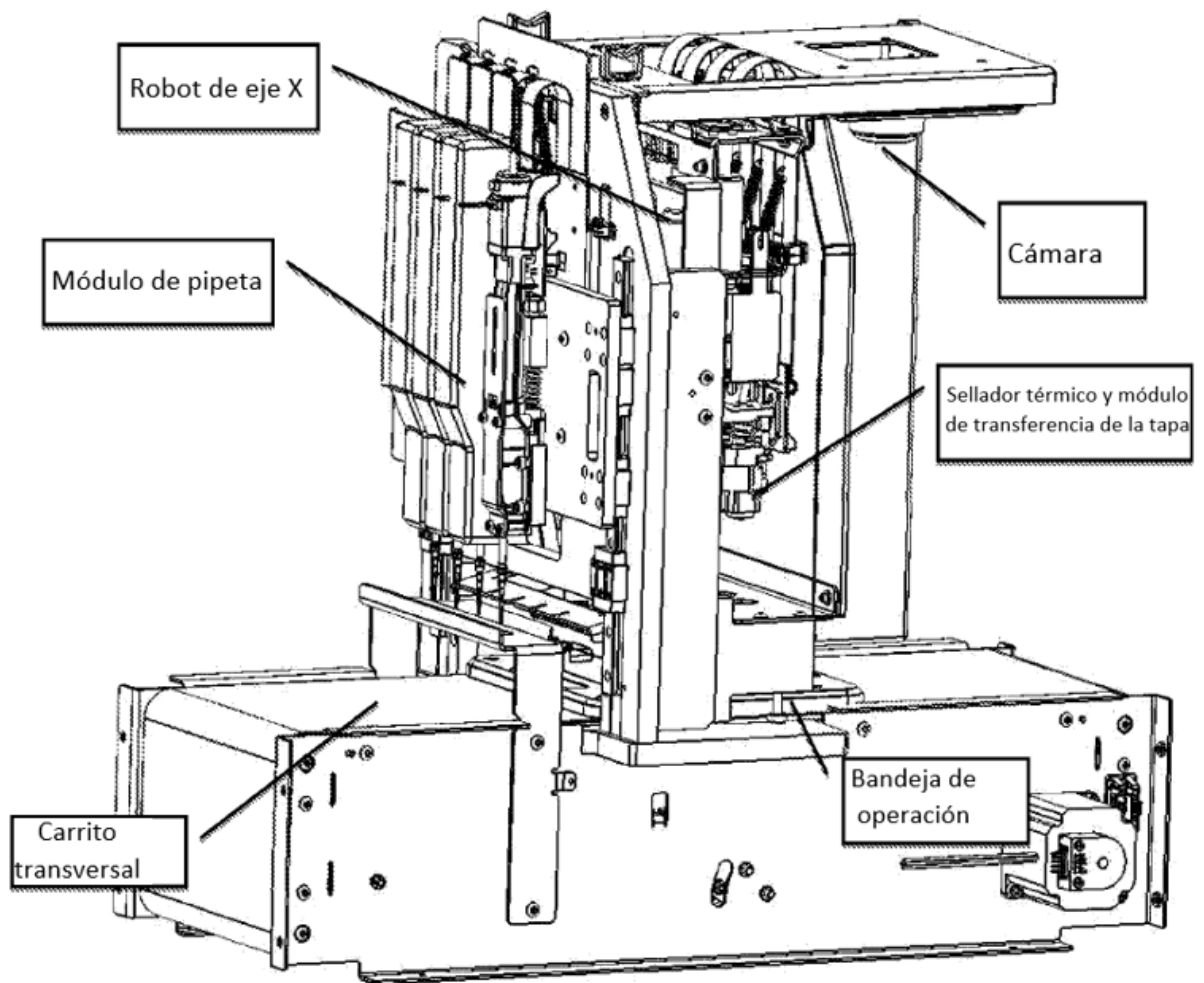


Figura 5 Ilustración del módulo principal

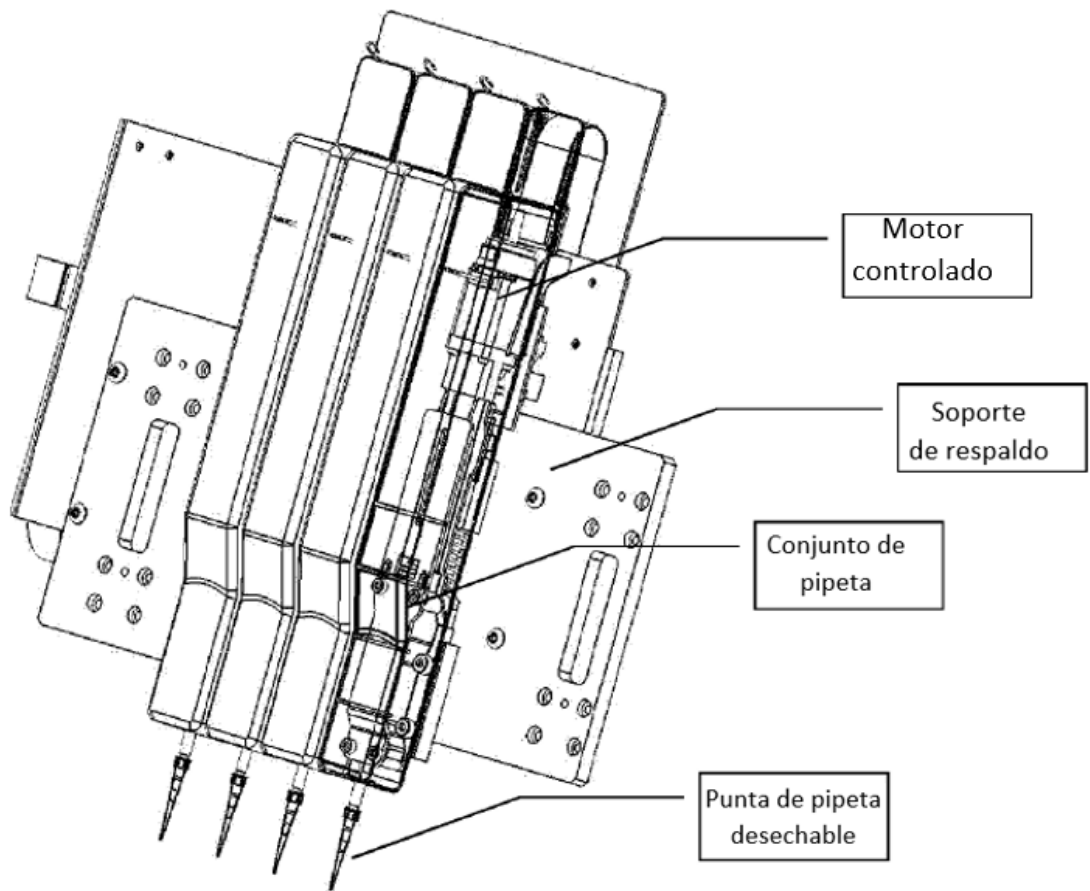


Figura 6 Ilustración del módulo de la pipeta

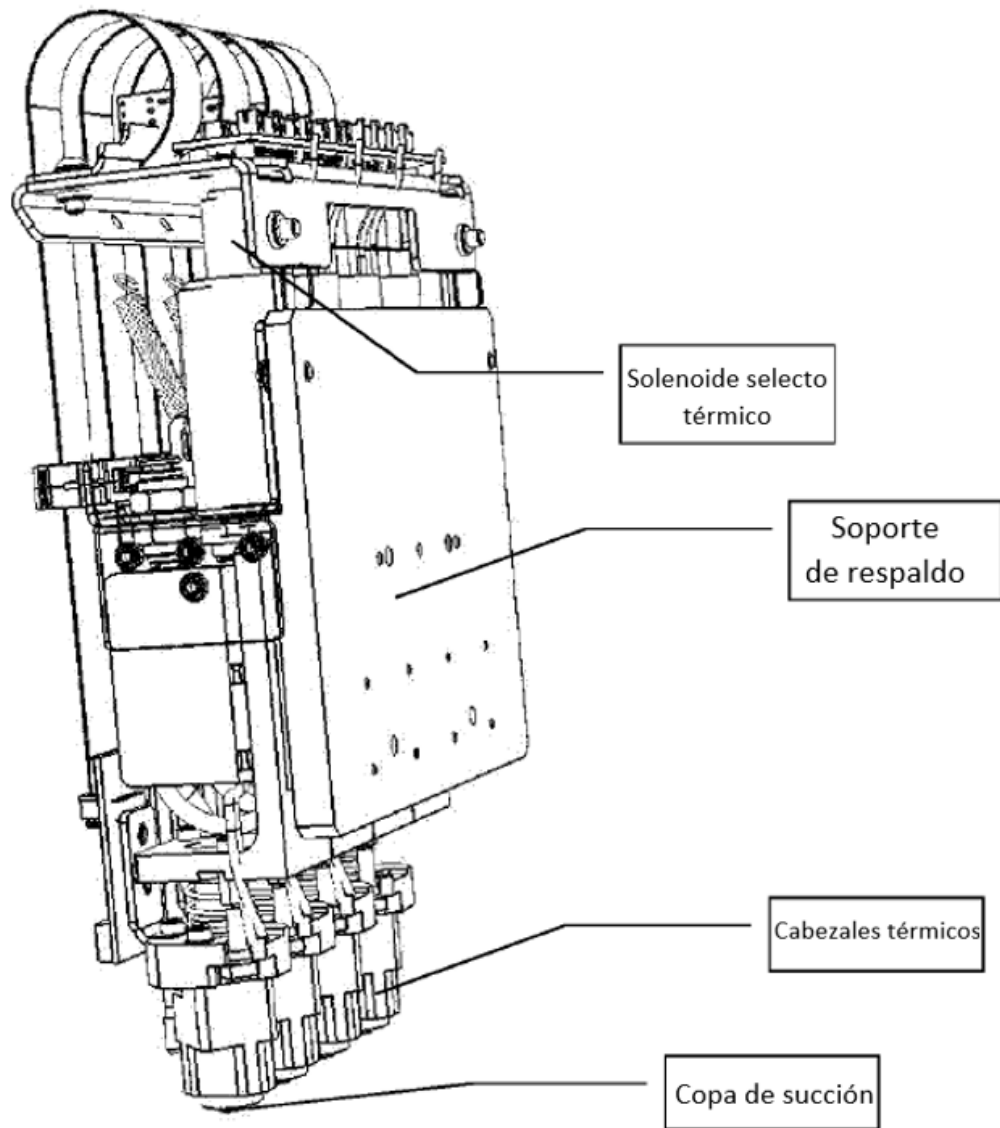


Figura 7 Ilustración del sellador térmico y del módulo de tranferencia de la tapa

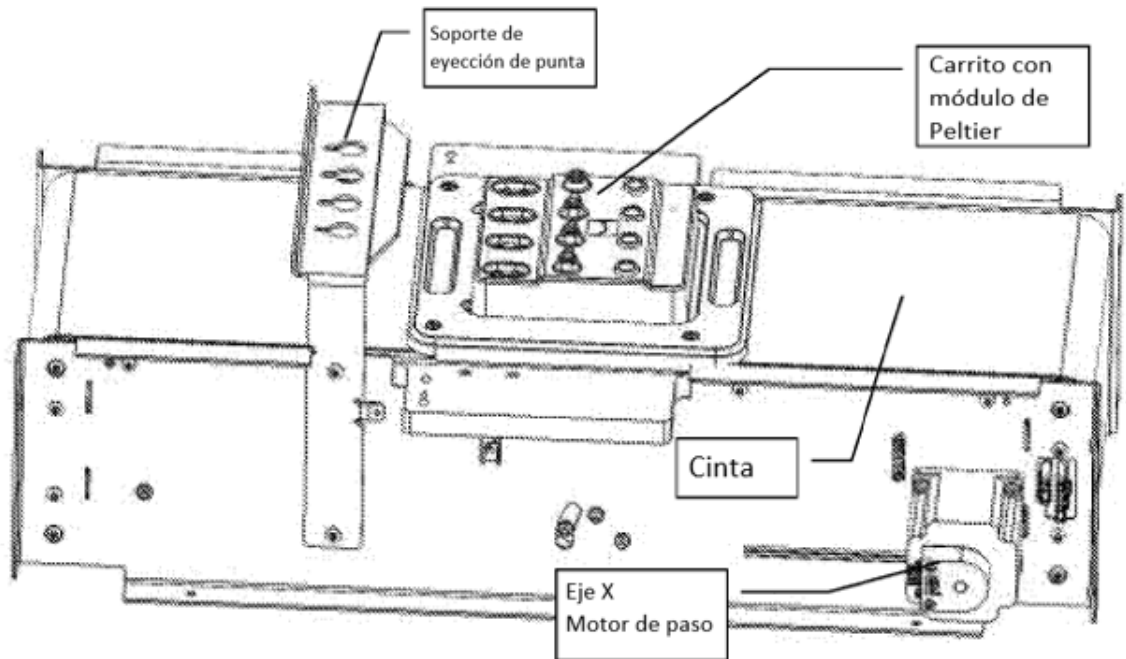


Figura 8 Ilustración del conjunto de eje transversal

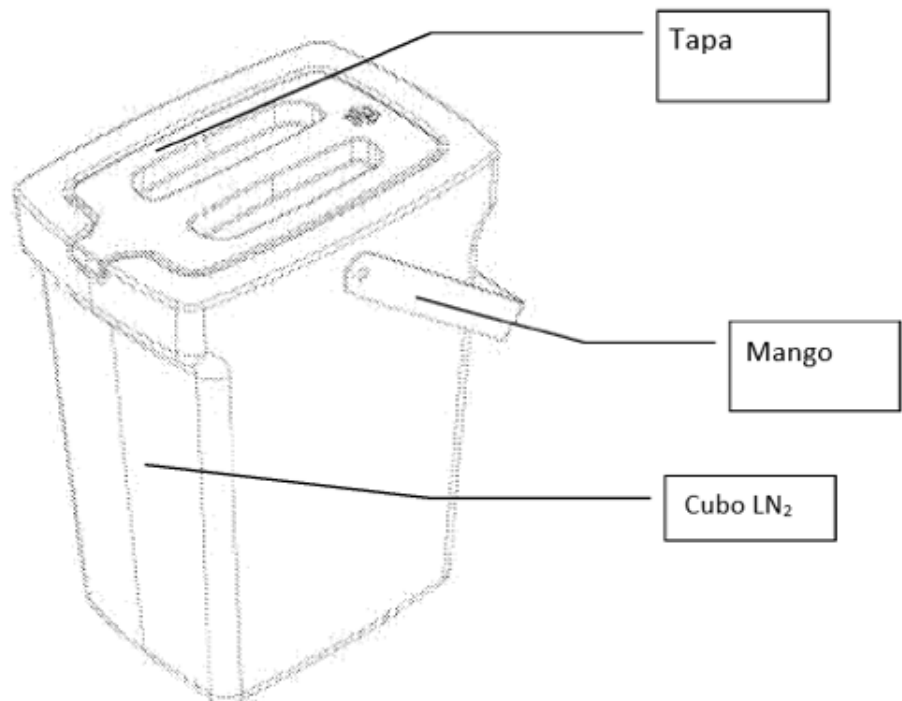


Figura 9 Ilustración del cubo de transferencia LN₂

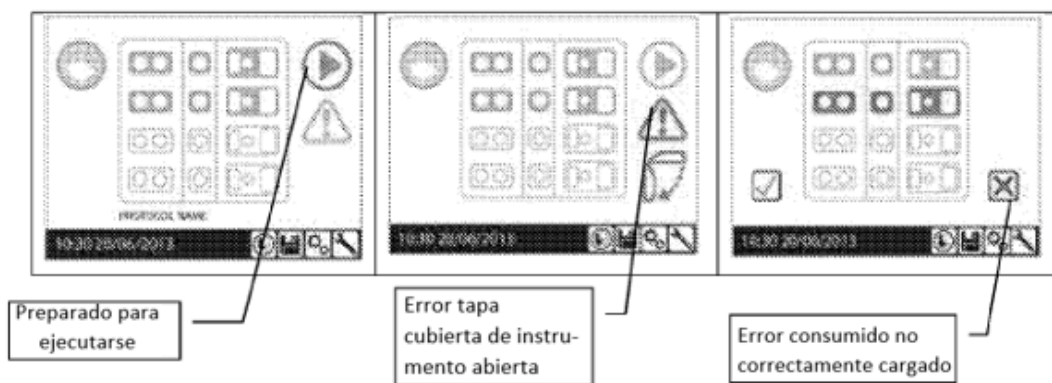


Figura 10 Ilustración de los ejemplos de la pantalla de interfaz del usuario

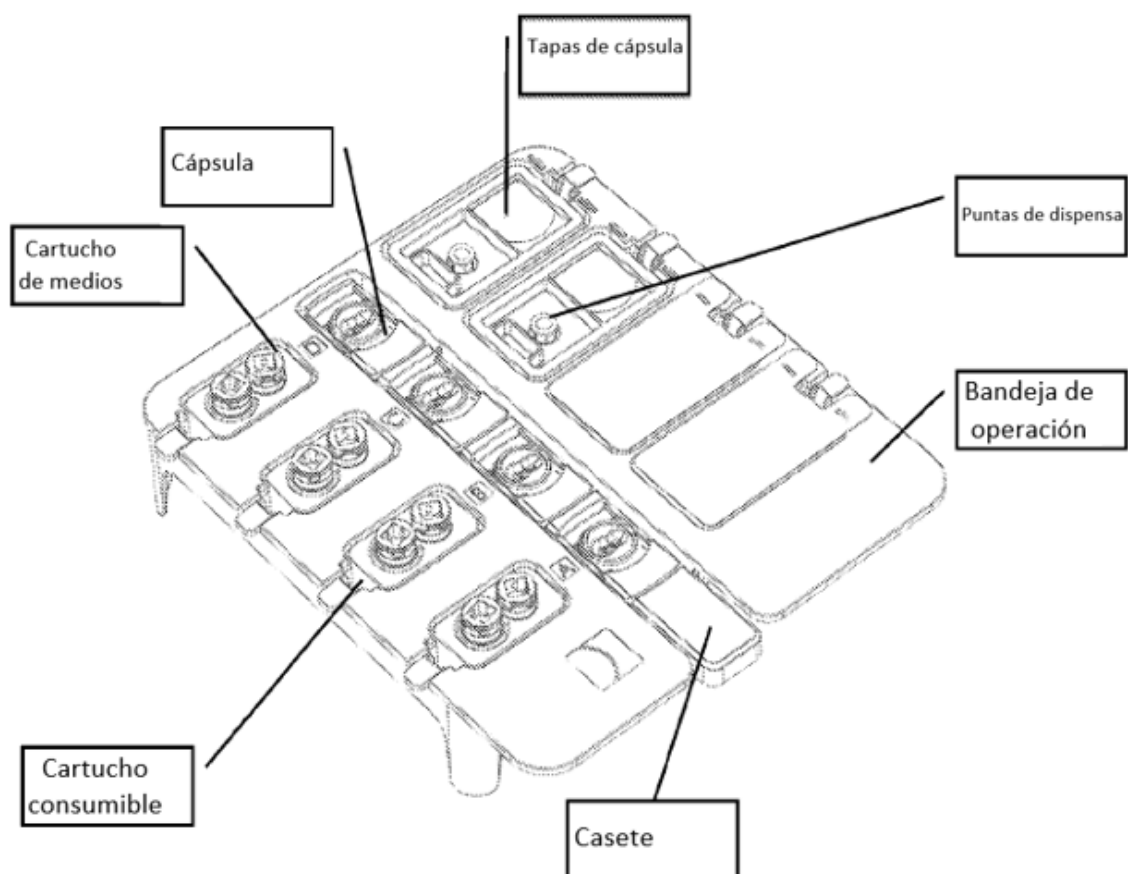


Figura 11 Ilustración de la bandeja de operación con los consumibles y los medios cargados

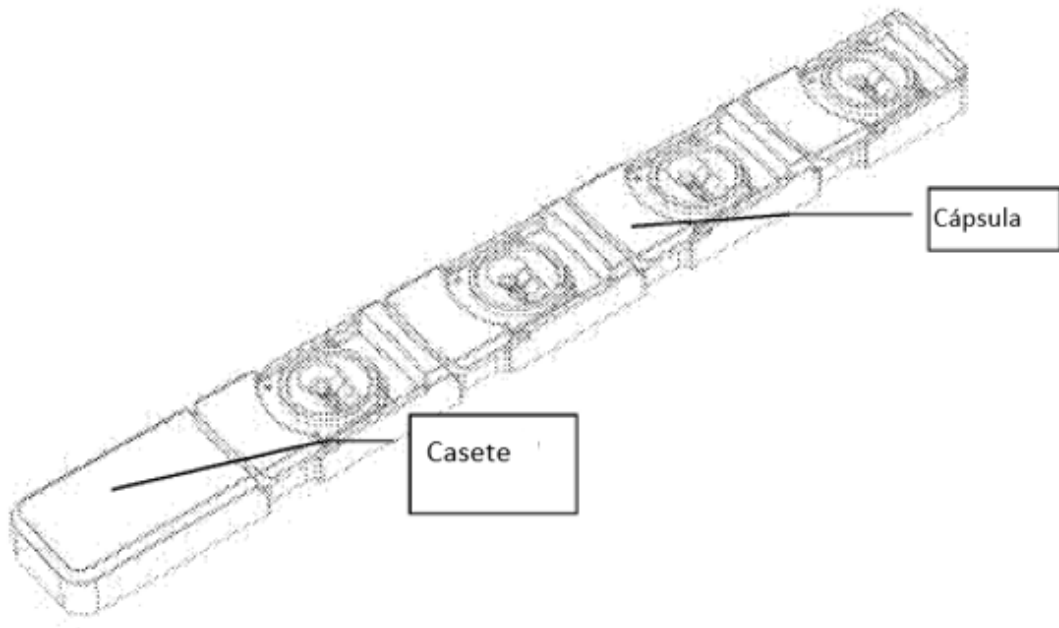


Figura 12 Ilustración del casete con 4 cápsulas cargadas

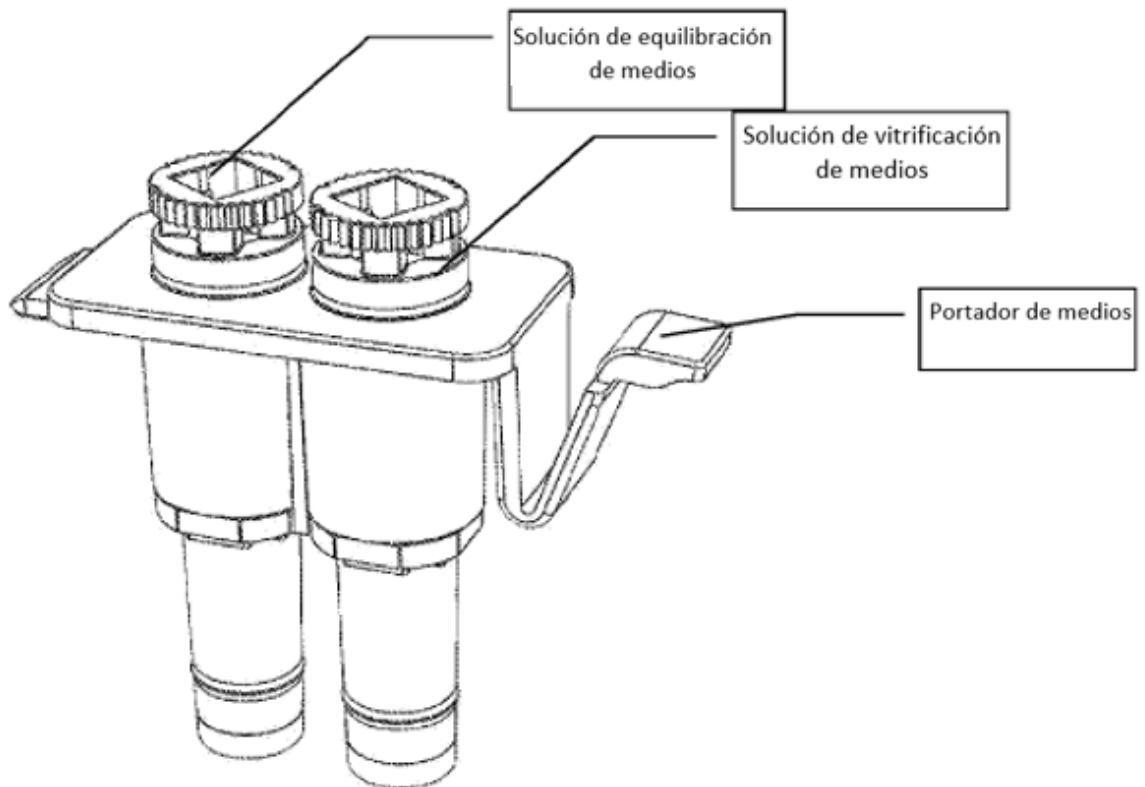


Figura 13 Ilustración del cartucho de medios

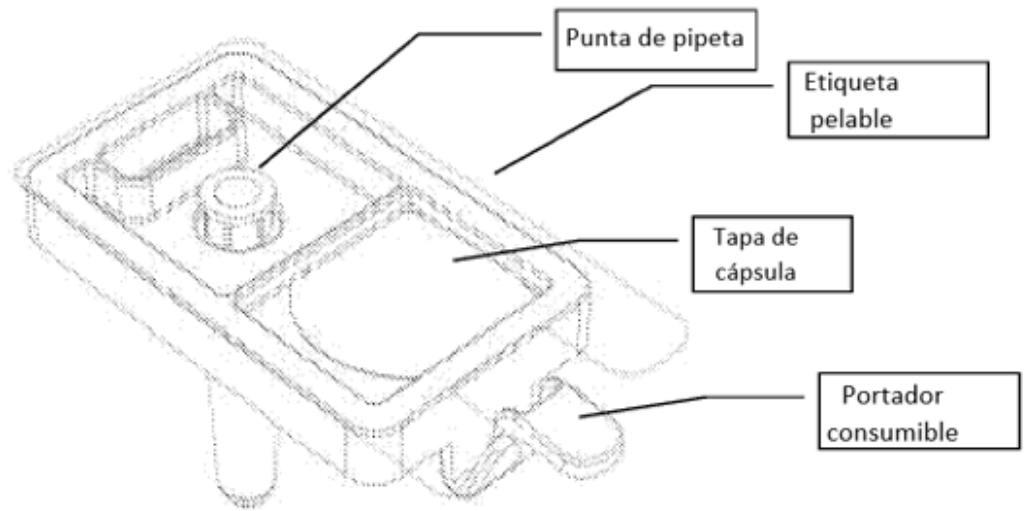


Figura 14 Ilustración del cartucho consumible

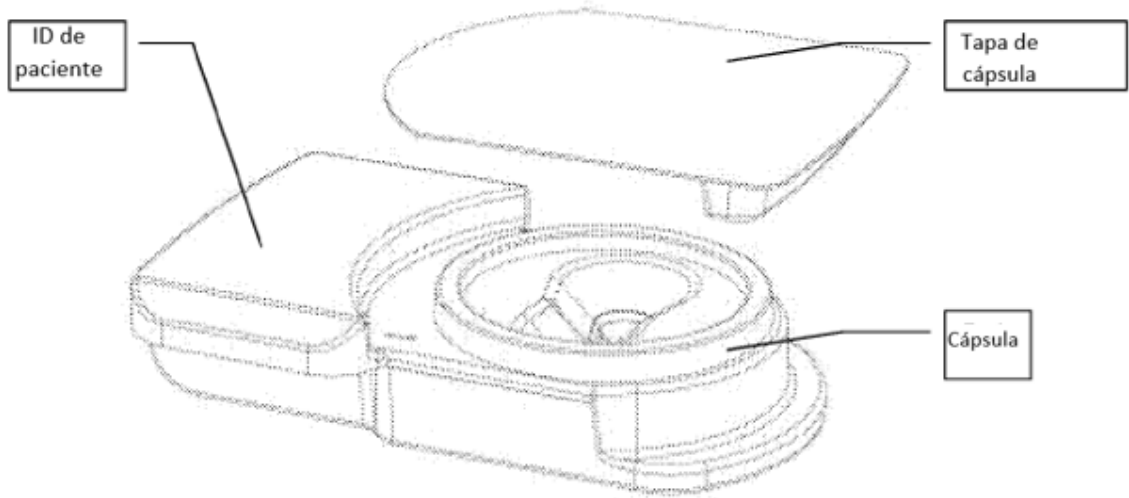


Figura 15 Ilustración de la cápsula y la tapa

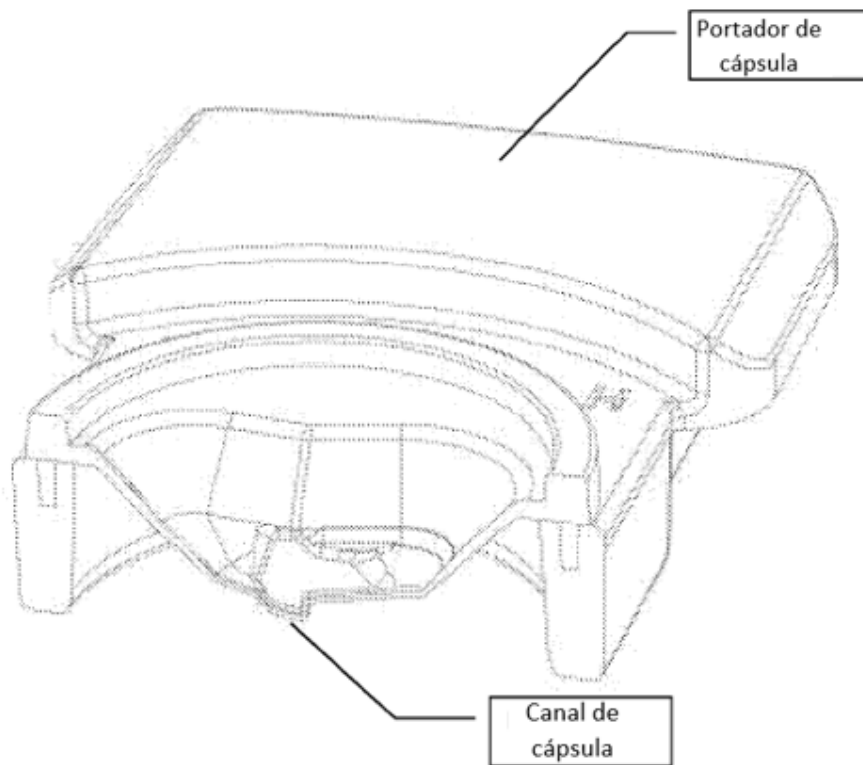


Figura 16 Ilustración de la sección transversal XX de la cápsula

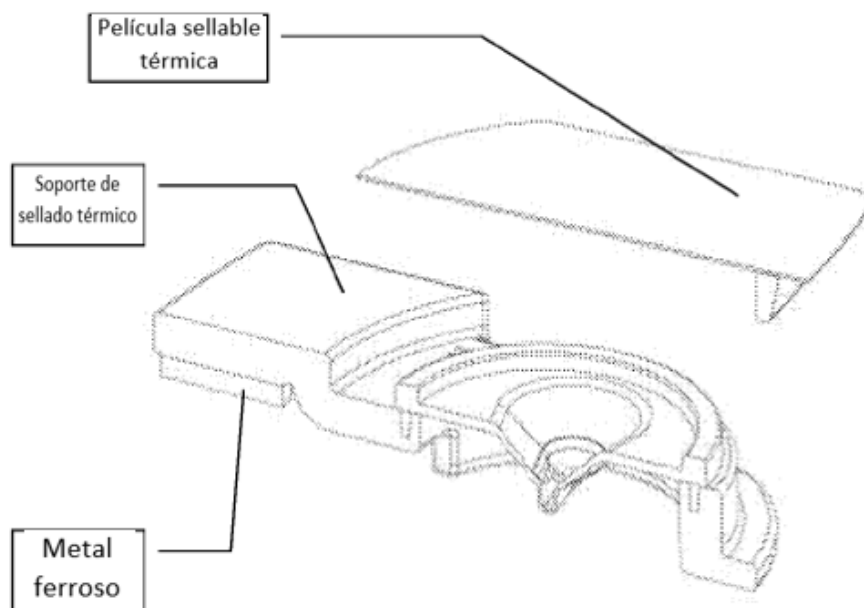


Figura 17 Ilustración de la sección transversal YY de la cápsula

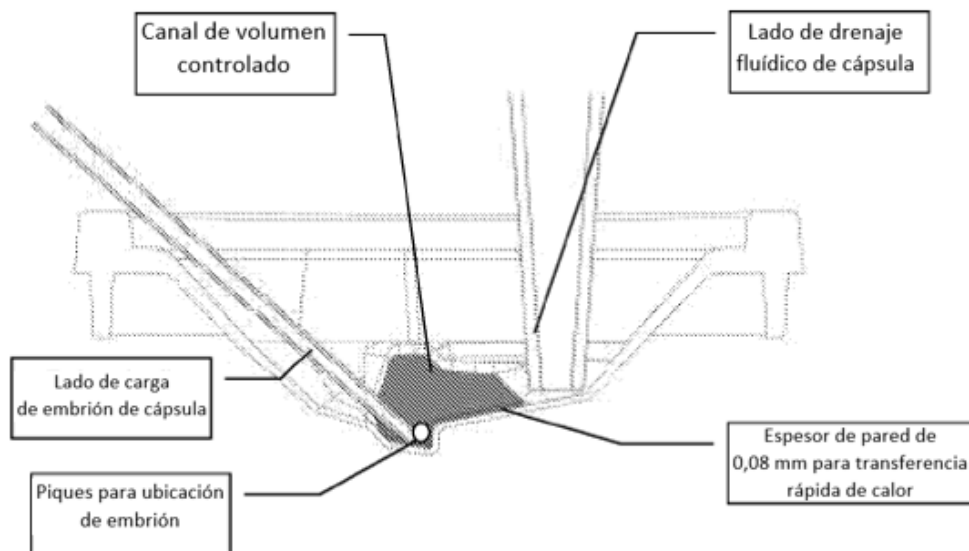


Figura 18 Ilustración de la sección transversal en la cápsula y canal de volumen controlado

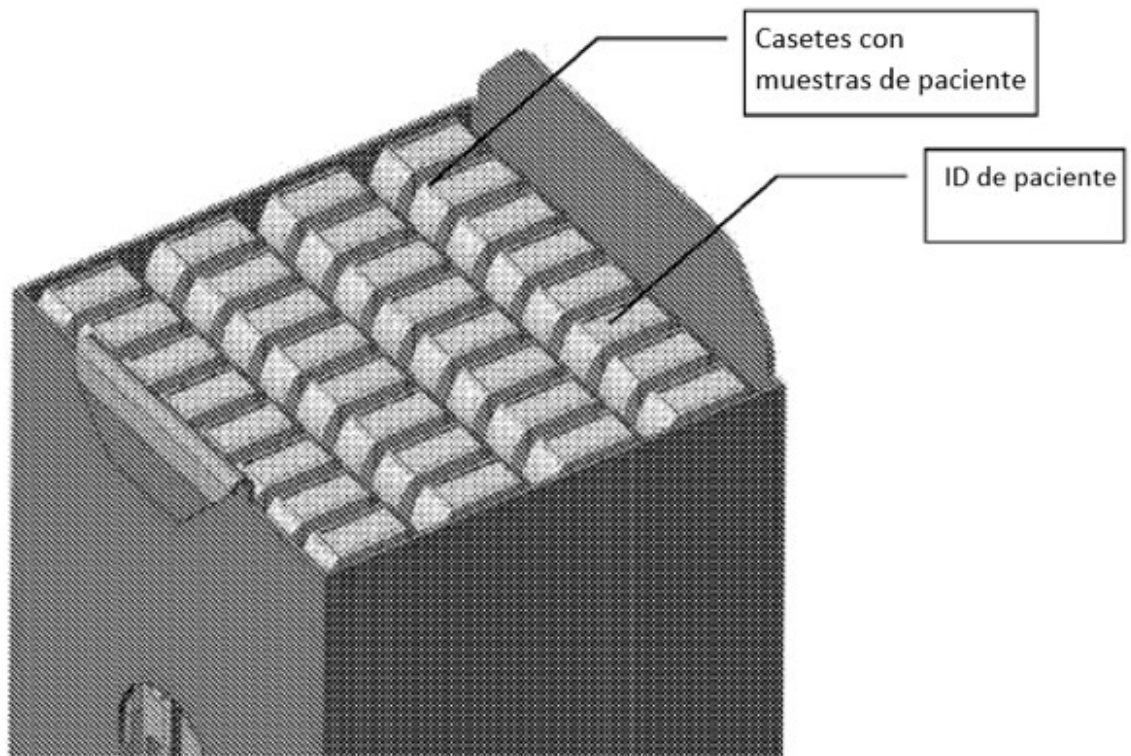


Figura 19 Ejemplo de un contenedor con todos los casetes cargados